



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad-Iztapalapa

Departamento de Ingeniería Eléctrica

Área de Ingeniería Biomédica

**Tesis para Obtener el Grado de Maestro en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)**

**Estudio de la disolución de
un cálculo renal usando
microscopía de fuerza atómica (AFM)**

P R E S E N T A

Ing. Mario Alberto Ramírez Baeza

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Nikola Batina

CODIRECTOR DE TESIS

M.C. Miguel Cadena Méndez

México, D.F.

Marzo 2009



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad-Iztapalapa

Departamento de Ingeniería Eléctrica

Área de Ingeniería Biomédica

**Tesis para Obtener el Grado de Maestro en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)**

**Estudio de la disolución de
un cálculo renal usando
microscopía de fuerza atómica (AFM)**

P R E S E N T A

Ing. Mario Alberto Ramírez Baeza

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Nikola Batina

CODIRECTOR DE TESIS

M.C. Miguel Cadena Méndez

S I N O D A L E S

**Dr. Nikola Batina
Presidente**

**Dr. Rafael Godínez Fernández
Secretario**

**Dr. Luis Felipe Jiménez Gracia
Vocal**

México, D.F.

Marzo 2009

D E D I C A T O R I A

**Este trabajo está dedicado para todas
aquellas almas libres que viven
haciendo sus propias reglas.**

**A personas que saben que
estando unidas se pueden
lograr cosas “imposibles”.**

**A mi familia que
tanto amo y que siempre me
impulsan a materializar mis sueños.**

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias:

A la vida, por poner en mi camino personas y circunstancias necesarias para mi superación personal y profesional.

A mis padres, mi hermano y toda mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, los amo uchpm.

A mis asesores, por su apoyo, orientación y amistad, en la realización del trabajo de investigación plasmado en la presente tesis.

Al Dr. Sergio Ureta, por proporcionar el cálculo renal estudiado.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda, enseñanzas e intercambio de ideas, que me fueron muy útiles durante esta investigación.

A los amigos que he conocido a lo largo de mi vida, por cada segundo que podemos disfrutar juntos a pesar de nuestras ocupaciones y los diferentes caminos de vida que decidimos seguir, por cada charla, sonrisa y lágrima compartida, y por las noches bohemias con todo lo que abarcan.

A CONACyT, por la beca de maestría No. 199054.

A todas las personas que han tocado mi vida, les agradezco por las enseñanzas que van dejando a su paso.

CONTENIDO

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 INTRODUCCIÓN A LA FISIOLÓGÍA RENAL	17
2.2 LITIASIS RENAL	19
2.3 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM). Aspectos Generales.	23
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	30
5. OBJETIVOS PARTICULARES	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES USANDO AFM EN AIRE; <i>ex situ</i> .	32
6.1.1 Preparación de la Muestra	32
6.1.2 Obtención de las Imágenes	33
6.1.3 Análisis de los Resultados	33
6.2 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES USANDO AFM EN LÍQUIDO; <i>in vitro</i> .	34
6.2.1 Diseño y Construcción de una celda de fluido para AFM.	34
6.2.1.1 Descripción	34
6.2.1.2 Planos de Construcción de la Celda de Fluido	35
6.2.2 Preparación de la Muestra	37
6.2.3 Acoplamiento de la Celda de Fluido en el Microscopio	37
6.2.4 Obtención de las Imágenes	38
6.2.5 Recopilación de los datos	39
6.2.6 Análisis de Resultados	40
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	43

7.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (<i>Equisetum Arvense</i>)-----	43
7.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	44
7.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	44
7.4 EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	45
7.5 EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.-----	45
8. RESULTADOS -----	46
8.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (<i>Equisetum Arvense</i>)-----	46
8.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	47
8.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	49
8.4 EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	56
8.5 EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.-----	63
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS -----	71
9.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (<i>Equisetum Arvense</i>)-----	71
9.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	72
9.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	73
9.3.1 Análisis de Rugosidad -----	73
9.3.2 Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección----	76

9.3.3	Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura-----	79
9.3.4	Estudio de Disolución a Partir de Vectores de Disolución -----	82
9.4	EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol-----	88
9.4.1	Análisis de Rugosidad -----	88
9.4.2	Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección----	91
9.4.3	Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura-----	94
9.4.4	Análisis de Disolución a Partir de Vectores de Disolución -----	98
9.5	EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.-----	103
9.5.1	Análisis de Rugosidad -----	103
9.5.2	Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección---	106
9.5.3	Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura-----	108
9.5.4	Estudio de Disolución a Partir de Vectores de Disolución -----	111
9.6	COMPARACIÓN DE LOS FENÓMENOS DISOLUTIVOS OBSERVADOS EN LOS EXPERIMENTOS CON BASE EN ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA APLICADA A LOS VECTORES DE VELOCIDAD PROMEDIO DE DISOLUCIÓN. -----	116
10.	DISCUSIÓN -----	120
11.	CONCLUSIONES -----	124
12.	PERSPECTIVAS -----	125
	ANEXO 1. Datos de la extracción del cálculo renal utilizado en los experimentos.	126
	ANEXO 2. Datos de la punta para AFM <i>tapping mode</i> utilizada en los experimento en aire -----	128
	ANEXO 3. Datos de la punta para AFM <i>contact mode</i> , utilizada en los experimentos en líquido. -----	129

ANEXO 4. Rugosidad	131
ANEXO 5. ANÁLISIS DE SECCIÓN	132
REFERENCIAS	133

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Sistema Urinario Humano. Imagen extraída de la referencia 24.-----	177
Figura 2.2	Corte longitudinal de un riñón. Se observan sus principales estructuras y el sitio donde se encuentran las nefronas. Imagen extraída de la referencia 24. -----	17
Figura 2.3	Flujo sanguíneo a través de una nefrona. Imagen extraída de la referencia 24. -----	18
Figura 2.4	Partes que constituyen una nefrona. Imagen extraída de la referencia 24. -----	19
Figura 2.5	Fotografías de cálculos renales tomadas por R. I. Gibson. (A) Cálculo de oxalato de calcio monohidratado. (B) Cálculo de oxalato de calcio di-hidratado con apatita. (C) Cálculo de brushita. (D) Cálculo de estruvita. -----	21
Figura 2.6	Microscopio de Fuerza Atómica (AFM). Modelo Nanoscope IV Multimode Scanning Probe Microscope (SPM), Digital Instruments. -----	24
Figura 2.7	Esquema a detalle de la cabeza del microscopio de fuerza atómica. -----	25
Figura 2.8	Aditamentos extras para el manejo del microscopio de fuerza atómica. -----	25
Figura 2.9	Esquema general del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica para la generación de las imágenes. -----	26
Figura 2.10	Imagen donde se observa la información que genera el AFM. -----	27
Figura 2.11	Imagen presentada en su forma 3D. Tamaño: 530 x 530 nm. -----	27
Figura 2.12	Vista lateral del barrido. Se observa que la imagen generada con la punta derecha sigue de manera más fiel la superficie analizada. -----	28
Figura 2.13	Imagen del soporte de la punta de AFM. A la izquierda, la empleada en modo de contacto intermitente. A la derecha la empleada en modo de contacto. -----	28
Figura 2.14	Tres tipos comunes de puntas para AFM. (A) Punta normal de 3µm de alto. (B) Superpunta. (C) Ultrapalanca de 3 µm de alto. Micrografías electrónicas por Jean-Paul Revel, Caltech. -----	28
Figura 2.15	Comparación esquemática de la imagen resultante empleando los distintos modos de operación de AFM; contacto, no-contacto e intermitente. -----	29
Figura 6.1	Fotografías: arriba, un cálculo renal; abajo, una muestra del cálculo montada para su estudio en AFM. Ambas imágenes muestran la comparación con una moneda de 1 peso mexicano. -----	32
Figura 6.2	Fotografía de la superficie del cálculo renal con la punta de AFM (Tamaño: 540 x 400µm) que muestra la zona de la superficie que será estudiada. -----	33
Figura 6.3	Fotografía de una celda de fluido comercial de modo de contacto intermitente para el microscopio AFM Multimode DI. -----	34
Figura 6.4	Vista inferior del diseño de la tapa de la celda de fluido. -----	35
Figura 6.5	Diseño de la base de la celda de fluido. -----	35
Figura 6.6	Esquema de dimensiones de la tapa de la celda de fluido (vista superior). -----	36
Figura 6.7	Esquema de dimensiones de la tapa de la celda de fluido (vista inferior). -----	36
Figura 6.8	Dimensiones de la ranura porta-punta de la tapa de la celda de fluido (vista inferior). -----	36
Figura 6.9	Esquema de dimensiones de la base de la celda de fluido. Se observa una vista superior y un corte transversal. -----	37
Figura 6.10	Fotografía del montaje de la muestra. -----	37
Figura 6.11	Acoplamiento de la celda de fluido para realizar experimentos. -----	38

Figura 6.12 Fotografía que muestra la inyección de líquido dentro de la celda de fluido. Se utilizó una micro-jeringa de 97 mm de largo y 350 µm de grosor.-----	39
Figura 6.13 Perfil superficial con 3 puntos de prueba.-----	40
Figura 6.14 Correcta colocación de los perfiles para al análisis de disolución.-----	41
Figura 6.15 Ejemplo de vectores de disolución horizontal y su interpretación. -----	42
Figura 6.16 Ejemplo de vectores de disolución horizontal y su interpretación. -----	42
Figura 8.1 Imágenes 3D de la superficie del cálculo renal a diferentes tiempos de tratamiento con el té de cola de caballo. a) sin tratamiento. b) 4 hrs. c) 8 hrs. d) 11 hrs y 30 min. e) 27 hrs. -----	47
Figura 8.2 Imágenes 3D de la superficie del cálculo renal a diferentes tiempos de tratamiento con una solución de $3 \times 10^{-3} \text{M}$ de Alopurinol. a) sin tratamiento. b) 1 hora y 20 min. c) 64 hrs. -----	48
Figura 8.3 Imágenes de AFM obtenidas <i>in vitro</i> de la superficie del cálculo renal sumergida en Alopurinol. Dimensiones: 1.432 x 1.432 µm. -----	49
Figura 8.4 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 1. Dimensiones: 719 x 719 nm. ----	50
Figura 8.5 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 1. Dimensiones: 719 x 719 nm. ----	51
Figura 8.6 Sección 1 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.-----	52
Figura 8.7 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.-----	52
Figura 8.8 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	53
Figura 8.9 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm. -----	53
Figura 8.10 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm. -----	54
Figura 8.11 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	54
Figura 8.12 Imágenes de AFM obtenidas <i>in vitro</i> de la superficie del cálculo renal sumergido en Alopurinol. Dimensiones: 1.057 x 1.057 µm. -----	56
Figura 8.13 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 2. Dimensiones: 530 x 530 nm. --	57
Figura 8.14 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 2. Dimensiones: 530 x 530 nm. --	58
Figura 8.15 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm. -----	59
Figura 8.16 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm. -----	59

Figura 8.17 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	60
Figura 8.18 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm. -----	60
Figura 8.19 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm. -----	61
Figura 8.20 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	61
Figura 8.21 Imágenes de AFM obtenidas <i>in vitro</i> de la superficie del cálculo renal sumergida en Ácido Cítrico. Dimensiones: 1.162 x 1.162 μm . -----	64
Figura 8.22 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 3. Dimensiones: 583.5 x 583.5 nm. -----	65
Figura 8.23 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 3. Dimensiones: 583.5 x 583.5 nm. -----	65
Figura 8.24 Sección 1 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm. -----	66
Figura 8.25 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm. -----	67
Figura 8.26 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	67
Figura 8.27 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm. -----	68
Figura 8.28 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm. -----	69
Figura 8.29 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.-----	69
Figura 9.1 Gráficas de la rugosidad R_q (a) y de la tendencia de la rugosidad acumulada en el tiempo de R_q (b), para la superficie del cálculo renal tratado con té de cola de caballo. -----	72
Figura 9.2 Gráficas de la rugosidad R_q (a) y de la rugosidad acumulada en el tiempo de R_q (b), para la superficie del cálculo renal tratado con Alopurinol. -----	73
Figura 9.3 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.-----	74
Figura 9.4 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).-----	75

Figura 9.5 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.	76
Figura 9.6 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.	76
Figura 9.7 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.	77
Figura 9.8 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.	77
Figura 9.9 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.	77
Figura 9.10 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.	78
Figura 9.11 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A. a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).	80
Figura 9.12 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A. a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).	80
Figura 9.13 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B. a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).	81
Figura 9.14 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B. a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).	81
Figura 9.15 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.	84
Figura 9.16 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.	85
Figura 9.17 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.	89
Figura 9.18 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).	90
Figura 9.19 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.	91
Figura 9.20 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.	91
Figura 9.21 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.	92
Figura 9.22 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.	92
Figura 9.23 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.	93
Figura 9.24 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.	93
Figura 9.25 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).	95

Figura 9.26 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	95
Figura 9.27 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	97
Figura 9.28 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	97
Figura 9.29 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.-----	99
Figura 9.30 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.-----	100
Figura 9.31 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.-----	104
Figura 9.32 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).-----	105
Figura 9.33 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.-----	106
Figura 9.34 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.-----	106
Figura 9.35 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.-----	106
Figura 9.36 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.-----	107
Figura 9.37 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.-----	107
Figura 9.38 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.-----	107
Figura 9.39 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	109
Figura 9.40 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	109
Figura 9.41 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	109
Figura 9.42 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).-----	110
Figura 9.43 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Ácido Cítrico.-----	112
Figura 9.44 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Ácido Cítrico.-----	113

Figura 10.1 Diagramas que ejemplifican las diferencias entre el fenómeno de disolución superficial ocasionado por el Ácido Cítrico y por el Alopurinol.----- 123

INDICE DE TABLAS

Tabla 8.1 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al té de cola de caballo.....	46
Tabla 8.2 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol.....	48
Tabla 8.3 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.....	55
Tabla 8.4 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.....	55
Tabla 8.5 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.....	62
Tabla 8.6 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.....	62
Tabla 8.7 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.....	70
Tabla 8.8 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.....	70
Tabla 9.1 Cálculo de los cambios de la rugosidad de la superficie del cálculo renal en el tiempo de exposición al té de cola de caballo.	71
Tabla 9.2 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol.....	72
Tabla 9.3 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.....	74
Tabla 9.4 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.....	74
Tabla 9.5 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con alopurinol.	78
Tabla 9.6 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.	80
Tabla 9.7 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.....	82
Tabla 9.8 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo A.....	86
Tabla 9.9 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo B.....	87
Tabla 9.10 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.....	89
Tabla 9.11 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.....	89
Tabla 9.12 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con alopurinol.	94
Tabla 9.13 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.	96
Tabla 9.14 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.....	97
Tabla 9.15 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo al tiempo de exposición al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.....	101
Tabla 9.16 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo al tiempo de exposición al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.....	102

Tabla 9.17 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al ácido cítrico para las imágenes del Grupo A.	104
Tabla 9.18 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.....	104
Tabla 9.19 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con ácido cítrico.....	108
Tabla 9.20 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.	110
Tabla 9.21 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.....	110
Tabla 9.22 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo A.....	114
Tabla 9.23 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo B.....	115
Tabla 9.24 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 1 con alopurinol.	116
Tabla 9.25 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 1 con alopurinol.	116
Tabla 9.26 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 2 con alopurinol.	117
Tabla 9.27 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 2 con alopurinol.	117
Tabla 9.28 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 3 con ácido cítrico.....	117
Tabla 9.29 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 3 con ácido cítrico.....	117

RESUMEN

Estudiar la litiasis renal es de gran importancia, ya que es un problema de salud pública que a nivel mundial afecta entre 4 a 17 personas por cada 1000 habitantes y en el 50% de los casos la enfermedad es recurrente. Consiste en la generación de cálculos renales en el aparato urinario superior (riñones y uréteres). Los posibles tratamientos pueden variar desde los que son invasivos y que requieren de anestesia, como son la cirugía, la aplicación de ondas de choque extracorpóreas (ESWL) y la ureteroscopía, hasta la prescripción de diferentes medicamentos y sustancias.

Varios grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos tratando de entender como es el proceso de biomineralización los cálculos renales. Se ha utilizado la técnica de nanotecnología, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), para explicar la morfología y cinética del crecimiento de los cálculos renales y como se afecta este proceso debido a la acción de diferentes sustancias.

En el presente trabajo, se desarrolló una novedosa metodología por medio de AFM para poder estudiar el proceso de disolución de los cálculos renales, con la finalidad de abrir una línea de investigación que a la larga pueda contribuir en el diseño de medicamentos y estrategias para tratar de manera efectiva y no-invasiva la litiasis renal. Esta herramienta permitió obtener imágenes tridimensionales a nivel nanométrico, en aire y en líquido, de la superficie de un cálculo renal sin pulir, para observar y cuantificar sus características y estudiar los cambios que sufre la topografía del cálculo debido a la presencia de alguna sustancia. También se desarrollo una metodología para analizar las imágenes obtenidas con el microscopio y poder extraer valiosa información que empieza a revelar la cinética desconocida del fenómeno de disolución de los cálculos renales por el efecto de una sustancia.

1. INTRODUCCIÓN

La litiasis renal es una enfermedad multifactorial en la que se relacionan aspectos geográficos, epidemiológicos, raciales y hereditarios; que afecta a nivel mundial entre 4 a 17 personas, por cada 1000 habitantes. Consiste en la generación de cálculos renales en el aparato urinario superior (riñones y uréteres). Este padecimiento se presenta mayormente en hombres que en mujeres, y una vez que se ha eliminado el o los cálculos renales de un paciente, existe una posibilidad del 50% de que vuelva a generar un nuevo cálculo [1,2].

Estadísticas nacionales del egreso hospitalario del sistema nacional de salud (2003), muestran que de un total de 4,353,166 de pacientes atendidos en las diferentes instituciones de salud en México; hubo 315,232 egresos por enfermedades del sistema génito urinario, dentro de las cuales se incluye la litiasis renal [3].

Existen varias complicaciones que un paciente puede tener al padecer la litiasis renal. Estas pueden ser: infección del tracto urinario, obstrucción del uréter, daño renal y uretral en forma de lesión al tejido y disminución en tamaño y funcionalidad o pérdida del riñón afectado.

Un cálculo renal es una masa sólida de micro-cristales formados por un conjunto de sustancias orgánicas (proteínas, lípidos, ácido úrico, etc.) y sales inorgánicas que se unen por medio de un proceso llamado biomineralización [4-6]. Para prevenir, detener y destruir su crecimiento existen diversos tratamientos que dependen básicamente de las características del cálculo renal y de su localización. Los posibles tratamientos pueden variar desde los que son invasivos y que requieren de anestesia, como son la cirugía, la aplicación de ondas de choque extracorpóreas (ESWL) y la ureteroscopía [7, 8]; hasta la prescripción de medicamentos tradicionales (Por ejemplo: Alopurinol [9, 10]) y medicamentos alternativos, homeopáticos y naturistas que aunque se sigue estudiando su función, actualmente se utilizan en la sociedad mexicana; entre los que encontramos sustancias como citrato, magnesio, jugo de arándano, entre otros; que por sus propiedades químicas ayudan en el tratamiento de los cálculos renales al disminuir la concentración de ácido úrico y oxalatos en la orina, inhiben la formación de los cálculos y posiblemente modifican la estructura de los mismos, ayudando a su desintegración y excreción [11-16].

En la actualidad no se entiende completamente los mecanismos de la biomineralización que genera los cálculos renales y tampoco se entiende los mecanismos

que logran inhibirla, es por esto que se sigue realizando investigación enfocada a estudiar más a fondo estos fenómenos. Por ejemplo, se han realizado estudios *in vitro* generando cristales de oxalato de calcio monohidratado (COM), componente común en la mayoría de los cálculos renales, para observar por medio de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), su morfología y cinética de crecimiento, y como se afecta este proceso debido a la presencia de diferentes moléculas [14, 15, 17-21]. En estos estudios se ha logrado identificar que primero se forman los cristales de manera independiente y después de van agregando uno sobre otro para formar estructuras con diferentes morfologías, por ejemplo estructuras con tendencia esférica o ocasionando la formación de dendritas. También se ha podido identificar que sustancias como el citrato, detienen el crecimiento de los cristales COM y ocasionan un proceso de disolución en ellos.

También se han realizado estudios utilizando AFM, para estudiar la morfología de cálculos renales humanos, formados principalmente por cristales COM. En el trabajo realizado por H. H. Dorian *et al* [22], muestran que la estructura de un cálculo renal está formada por anillos concéntricos que parecen formar regiones de diferente “porosidad”. Estas diferencias las correlacionan con diferencias en la densidad de empaquetamiento o por las direcciones en que se acomodan las estructuras al formar el cálculo renal. S. Sandersius y P. Rez, en su estudio de la morfología de los cálculos renales por AFM, indican que un posible mecanismo para la formación de los cálculos podría ser una nucleación heterogénea de cristales en la nefrona, con una subsecuente agregación o aglomeración en un sitio que favorece la formación de los cálculos como es la papila renal [23].

En resumen, se han realizado diversos trabajos donde se aplica microscopía de fuerza atómica para estudiar la biomineralización de los cálculos renales. En los trabajos realizados *in vitro* han centrado sus esfuerzos en analizar la morfología de los cristales COM, la cinética de su crecimiento y su inhibición ocasionada por alguna sustancia. En los estudios donde se observó la topografía de cálculos renales reales, se ha identificado su morfología y una posible explicación de cómo se biomineralizan dentro del cuerpo humano.

Ahora una pregunta que surge es: ¿se puede estudiar la disolución de los cálculos renales humanos por medio de AFM? El presente trabajo aborda dicha problemática desde el punto de vista de explorar una nueva técnica para comprobar la capacidad de disolución de los cálculos por medio de diferentes sustancias bioquímicas. Para esto, es necesario identificar el efecto que ocasionan medicamentos ó sustancias comunes en la

estructura de los cálculos renales, con la idea de calcular la efectividad del tratamiento al utilizarlas. Una manera de hacer lo anterior, es conocer la topografía y estructura superficial de los cálculos renales e ir analizando cómo se modifican esas características en presencia de sustancias que disuelvan el cálculo. Para esto, primero es necesario diseñar la metodología que permita observar la topografía de un cálculo renal a nivel nanométrico por medio de AFM; y sus cambios en el tiempo, debidos a la acción de alguna sustancia; y la metodología de análisis de dichos resultados, para obtener información que permita estudiar y diferenciar el efecto disolutivo ocasionado por una sustancia u otra. Plantear esta metodología es el inicio en una línea de investigación que podría ayudar a entender el proceso de disolución de los cálculos renales, aportando información importante para el diseño de nuevos medicamentos y/o tratamientos efectivos y no invasivos para la litiasis renal. También podría servir como parte de un protocolo de prueba de la efectividad de los medicamentos existentes y de algunas sustancias que a menudo se utilizan para inhibir la formación de cálculos u ocasionar su disolución.

2. ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN A LA FISIOLÓGÍA RENAL

El sistema urinario se compone principalmente de riñones, uréteres, vejiga urinaria y uretra (ver figura 2.1). Un corte longitudinal del riñón (figura 2.2) nos muestra dos partes principales; la corteza y la médula renal. En estas regiones se encuentran las partes funcionales del riñón, llamadas nefronas, encargadas de la producción de orina. En cada riñón hay aproximadamente 1 millón de nefronas [24, 25].

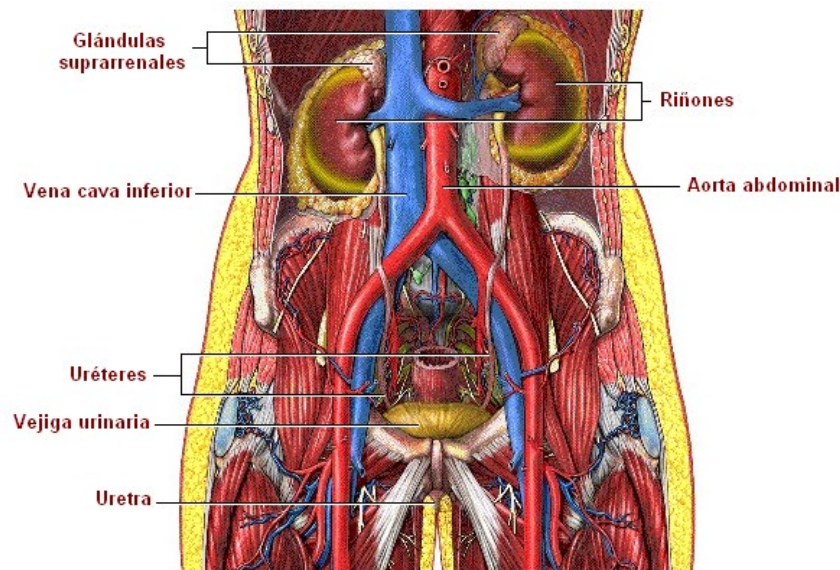


Figura 2.1 Sistema Urinario Humano. Imagen extraída de la referencia 24.

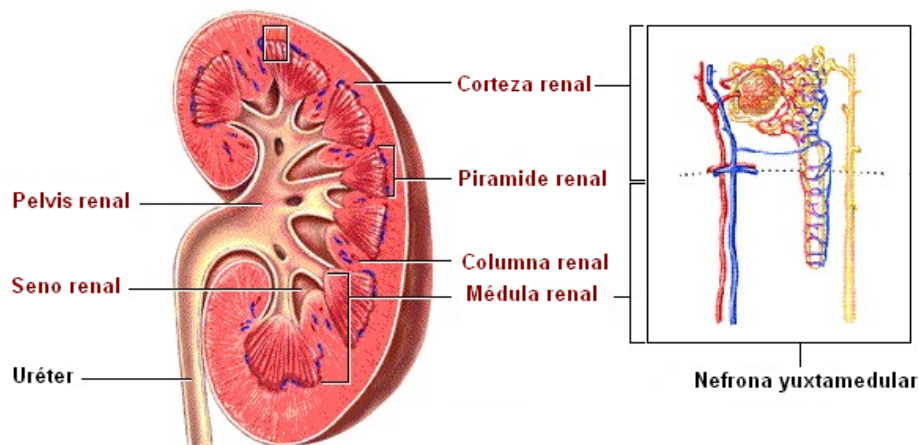


Figura 2.2 Corte longitudinal de un riñón. Se observan sus principales estructuras y el sitio donde se encuentran las nefronas. Imagen extraída de la referencia 24.

A través de los capilares de la nefrona, el flujo sanguíneo va desde la arteria interlobular, pasando por la arteria arciforme, la arteria interlobulillar, a la arteriola

aferente, glomérulo, arteriola eferente, los capilares peritubulares, los vasos rectos, vena interlobulillar, vena arciforme; hasta la vena interlobular (ver figura 2.3). Agua y diferentes solutos pasan de los capilares a la cápsula glomerular, después pasan por el túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y finalmente por el conducto colector cortical y medular (ver figura 2.4).

Los procesos que se realizan en las nefronas y los conductos colectores son el filtrado, la reabsorción y la secreción. Durante la filtración glomerular, agua y solutos (excepto proteínas), pasan de la sangre al interior de la cápsula de Bowman a través de la pared de los capilares glomerulares. Después el líquido filtrado avanza a lo largo del túbulo renal y a través del conducto colector. Las células del túbulo reabsorben la mayor parte del agua y muchos solutos útiles que fueron filtrados y pasan nuevamente a la sangre. También las células del túbulo y del conducto secretan materiales adicionales para ser desechados por el organismo en forma de orina, tales como desechos, fármacos e iones que el cuerpo no necesite.

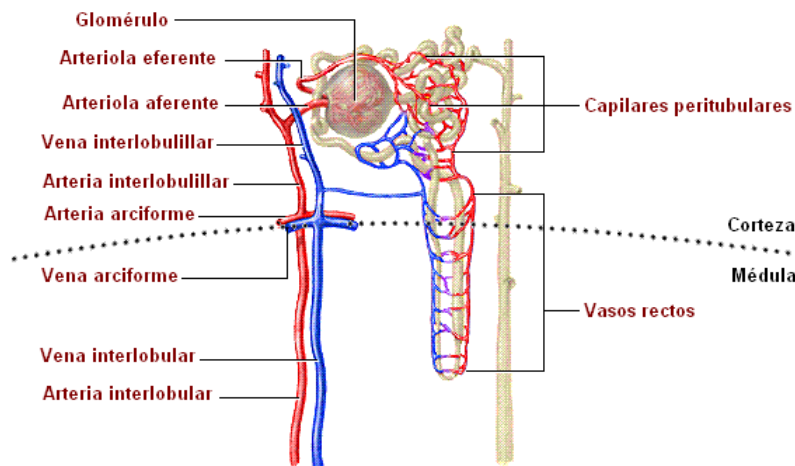


Figura 2.3 Flujo sanguíneo a través de una nefrona. Imagen extraída de la referencia 24.

Los componentes comunes presentes en el líquido del filtrado glomerular son agua, moléculas orgánicas como glucosa y aminoácidos, desechos a base de nitrógeno (urea, ácido úrico, creatinina) e iones de sodio, potasio, cloro y bicarbonato. Cuando la membrana de filtración está dañada o no funciona correctamente, se incrementa el nivel de proteínas en el líquido filtrado y hay presencia de células sanguíneas en él. En promedio la filtración glomerular proporcionada por los 2 riñones es de 125 ml/min; y el 99% regresa al torrente sanguíneo debido a la reabsorción tubular.

La concentración y volumen final de la orina se ajusta dentro del conducto colector medular, en el que pasa solo el 5% (en condiciones normales) del volumen total filtrado

en la cápsula de Bowman. La orina normal está compuesta aproximadamente por 95% agua y 5% sólidos. Tiene urea, ácido úrico, creatinina, iones de sodio, potasio, cloro, calcio y fosfato; además de contener otras sustancias que dependen de la dieta de la persona.

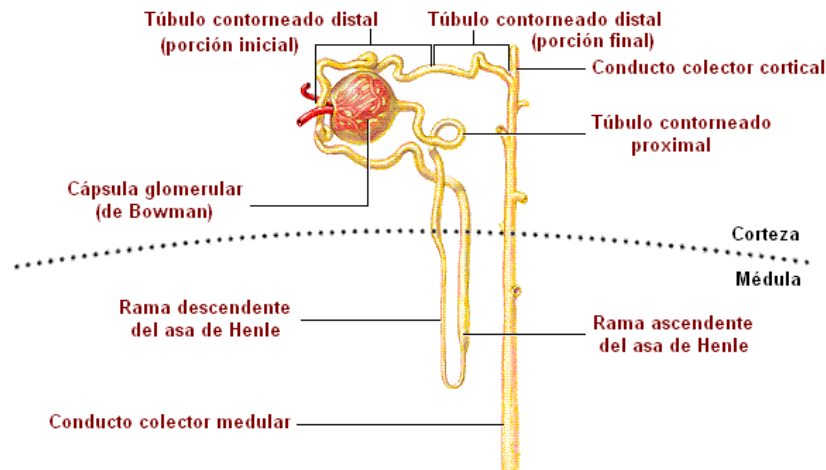


Figura 2.4 Partes que constituyen una nefrona. Imagen extraída de la referencia 24.

2.2 LITIASIS RENAL

La litiasis renal (formación de cálculos renales) representa una de las entidades clínicas, que con mayor frecuencia se encuentran en la práctica diaria del médico general y del especialista en urología. Sin embargo, entre los mismos existe a menudo un profundo desconocimiento de la fisiopatología y de los principios de estudio y manejo de esta enfermedad [6].

Es una enfermedad multifactorial y entre los factores que la ocasionan se encuentra la herencia, edad y sexo, región geográfica, ingesta de agua, dieta; entre otros.

La teoría más aceptada acerca de la formación de cálculos, sugiere que se debe cumplir una sucesión de etapas que son: sobresaturación, nucleación, crecimiento, agregación y retención.

Una sustancia está sobresaturada cuando su concentración es justo la suficiente para prevenir la precipitación. La concentración a la cual empieza a cristalizarse un compuesto se denomina *Producto de Solubilidad Termodinámica* (K_{sp}). La orina contiene inhibidores que permiten concentraciones mayores que la K_{sp} sin que ocurra precipitación, pero este mecanismo protector no es perfecto y un compuesto finalmente se cristaliza cuando se sobresatura lo suficiente para superar el *Producto de formación* (K_f); es decir, la concentración a la cual la sustancia no puede permanecer en solución a

pesar de la acción de elementos inhibitorios de la cristalización. La concentración de la mayoría de los compuestos de la orina se encuentra en el intervalo entre la K_{sp} y la K_f .

Los compuestos en la orina se precipitan a manera de núcleos de cristales que crecen progresivamente. Este proceso se realiza sobre superficies preexistentes (células epiteliales, otros cristales, cuerpos extraños, etc.) y por ello se denomina nucleación heterogénea. Posteriormente, varios núcleos se agregan para formar un cálculo con un tamaño suficiente que le permita enclavarse en el sistema colector [6].

Aunque la agregación permite la formación de cálculos que pueden obstruir el sistema urinario, en muchos casos existen factores anatómicos del riñón que favorecen la retención de los mismos [6].

En la orina existen sustancias que modifican la formación de cálculos que han sido clasificadas en 3 grupos: inhibidoras, formadoras de complejos y promotoras. Las sustancias inhibidoras son las que al mezclarse con otros compuestos, aumentan la solubilidad o disminuyen la capacidad de agregación de los mismos. La cristalización del fosfato de calcio es inhibida por el magnesio, el citrato, el pirofosfato, la nefrocalcina y la uropontina. La cristalización de oxalato de calcio es inhibida por el citrato, el pirofosfato, los fragmentos de RNA y la nefrocalcina. Los formadores de complejos son sustancias que reaccionan con otras formando nuevos compuestos con menor probabilidad de precipitarse. Por ejemplo, el citrato y el magnesio reaccionan con el oxalato de calcio previniendo su cristalización. Los promotores son elementos que favorecen alguna etapa de la formación de un cálculo renal [6].

Aproximadamente un 70% de los cálculos renales están formados por oxalatos de calcio [$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$]. Estos se generan en un pH de la orina menor a 6.0 y pueden deberse a estados de hipercalcemia, hipercalcemia, hiperoxaluria, hiperuricosuria, hipocitraturia o hipomagnesuria [4, 6, 26].

Los cálculos de fosfato de calcio también se generan en un pH de la orina menor a 6.0 y representan aproximadamente el 10% de los casos de litiasis renal. Su formación se relaciona a fenómenos de hipercalcemia, hipocitraturia, hiperuricosuria, hiperparatiroidismo y acidosis tubular renal. Aquí se encuentran cálculos de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$] y de brushita [$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] [4, 6, 26].

Aproximadamente otro 10% de los casos de litiasis renal lo forman cálculos de estruvita [$\text{Mg}(\text{NH}_4)(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], también denominados cálculos infecciosos. Su formación requiere que existan bacterias productoras de ureasa, enzima que degrada la urea en amoníaco y CO_2 . Posteriormente cada molécula de CO_2 produce una molécula

de ácido carbónico (CO_3) y a su vez, cada molécula de amoníaco origina 2 de hidróxido de amoníaco. El aumento de la concentración relativa de la base (hidróxido de amoníaco) sobre el ácido (CO_3) alcaliniza la orina a un pH mayor de 7.1, el cual favorece la precipitación urinaria de magnesio, amonio y fosfato. También su formación se asocia con fenómenos de hipercalciuria, hipocitraturia e hiperuricosuria.

Los cálculos de ácido úrico representan entre el 5 y 10% del total. La cristalinización del ácido úrico ocurre como consecuencia de una disminución en el pH urinario que disminuye las formas ionizadas del ácido úrico y estimula su precipitación. También pueden ser ocasionados por fenómenos de hiperuricosuria e hipocitraturia.

El 1% de los casos de litiasis es debido a la generación de cálculos de cistina en pacientes que presentan cistinuria. La figura 2.5 muestra imágenes de algunos cálculos renales [4, 6, 26].



Figura 2.5 Fotografías de cálculos renales tomadas por R. I. Gibson. (A) Cálculo de oxalato de calcio monohidratado. (B) Cálculo de oxalato de calcio di-hidratado con apatita. (C) Cálculo de brushita. (D) Cálculo de estruvita.

Los cálculos adquieren importancia cuando obstruyen el flujo urinario o producen ulceración y sangrado. Pueden existir sin causar ningún síntoma ni lesionar el riñón de forma importante. En general, los cálculos más pequeños son los más peligrosos, porque penetran en los uréteres y producen dolores denominados cólicos (una de las formas más intensas de dolor), así como obstrucción ureteral. Los cálculos de mayor tamaño no pueden pasar a los uréteres y es más probable que permanezcan alojados silenciosamente en la pelvis renal. Con frecuencia la primera manifestación de estos cálculos grandes es la hematuria. Además, los cálculos predisponen a la infección sobreañadida, tanto por su carácter obstructivo como el traumatismo que producen.

Para diagnosticar diferentes padecimientos del sistema renal, primero se solicitan estudios de laboratorio de orina, si los resultados muestran anormalidades o condiciones que reflejen algún padecimiento, como puede ser un pH menor a 6.0 o mayor a 7.2 (posible litiasis renal) o la presencia de sangre en la orina, se realiza algún estudio para obtener imágenes de las vías urinarias del paciente [4, 8].

Uno de los estudios de laboratorio que se aplica, es la urografía excretora que obtiene diversas radiografías de las vías urinarias de una persona después de haberle inyectado un líquido de contraste. Las imágenes obtenidas permiten conocer el funcionamiento del sistema renal del paciente, así como la posición, tamaño y forma de los cálculos renales en caso de que se presenten.

Para el tratamiento de la litiasis renal y tratar de evitar su recurrencia, se toman medidas generales que se orientan hacia el control de la dieta (por ejemplo disminuir consumo de proteínas, aumentar fibra, alimentos bajos en sodio, calcio, oxalato; ingesta de citratos); y una ingesta alta de líquidos (3 l/día) para disminuir la saturación de componentes de los cálculos en la orina [6, 27].

También se recetan medicamentos que contengan alopurinol cuando existe un fenómeno de hiperuricosuria (ácido úrico elevado en la orina), tomando dosis de 100 a 200 mg/día en casos leves, de 300 a 600 mg/día en casos de gravedad moderada y de 700 a 900 mg/día en casos severos [6, 9]. Esta sustancia fue probada en el presente trabajo.

Administrado por vía oral se absorbe con rapidez en el tracto gastrointestinal alto. Se detecta en la sangre después de 30-60 minutos de su administración. Es metabolizado por la xantina oxidasa a oxipurinol, el cual es activo como hipouricémico y además inhibiendo esta enzima. El oxipurinol tiene una vida media prolongada en la sangre, lo cual permite la administración del medicamento una vez al día. Se distribuye en todos los

líquidos orgánicos, con excepción de los cerebrales donde llega a un 50% de los otros. El alopurinol reduce la formación del ácido úrico, inhibiendo la xantina oxidasa (esta enzima actúa convirtiendo a la hipoxantina en xantina y a ésta en ácido úrico) y en consecuencia disminuye los niveles de ácido úrico en sangre y en orina.

El alopurinol también inhibe la síntesis de ácido úrico actuando a través de la enzima hipoxantina guanina-fosforribosiltransferasa. No poseen esta enzima los niños con Lesh-Nyhan y tienen deficiencia parcial de ella algunos adultos, con lo cual no se benefician de éste segundo efecto. Normalmente empieza a disminuir la uricemia a las 48-72 horas posteriores al inicio de la terapia; se consigue un nivel normal en 1 a 3 semanas. Su uso continuo durante varios meses suele ser necesario para prevenir ataques de gota. En algunos casos pueden necesitarse varios años para un adecuado control. Se elimina por vía renal aproximadamente el 70% de lo ingerido, el resto como distintos metabolitos y el 2% por las heces [9].

Dependiendo básicamente de las características del cálculo, puede ser necesario aplicar tratamientos invasivos y que requieren de anestesia, como la cirugía, la aplicación de ondas de choque extracorpóreas (ESWL) y la ureteroscopía; para extraer o ayudar en la desintegración y excreción del cálculo renal [7, 8, 10-12, 28].

En la aplicación de ondas de choque extracorpóreas (ESWL), estas penetran el cuerpo y se impactan sobre el cálculo renal, de manera que se pulveriza el cálculo de forma gradual. Un estudio por tomografía computarizada (CT) permite predecir el número de ondas de choque que serán necesarias para el éxito del tratamiento ESWL; debido a que el estudio CT permite identificar el cálculo renal en el riñón del paciente; mostrando su localización, tamaño y densidad radiológica [28].

La ureteroscopía, consiste en introducir un ureteroscopio flexible por la uretra hasta llegar al lugar en el que se encuentra alojado el cálculo renal, para visualizarlo; y con ayuda de otros instrumentos, desbaratar y sacar el cálculo renal a través de la uretra.

2.3 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM). Aspectos Generales.

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es una técnica de nanotecnología utilizada en el estudio de diferentes tipos de muestras a nivel nanométrico. Fue inventada por Binnig y colaboradores en 1986 [29]. Su principal objetivo, es la obtención de imágenes topográficas de alta resolución y la medición de las fuerzas de interacción entre la punta del microscopio y la superficie de la muestra, sin alterarla o dañarla; para estudiar diferentes fenómenos del comportamiento de los materiales, como abrasión, corrosión, adhesión, limpieza, fricción, grabado, entre otros.

Las figuras 2.6 y 2.7 muestran, respectivamente, el modelo Nanoscope IV fabricado por Digital Instruments de un microscopio de fuerza atómica y un esquema a detalle de la cabeza del microscopio con sus principales componentes [30].

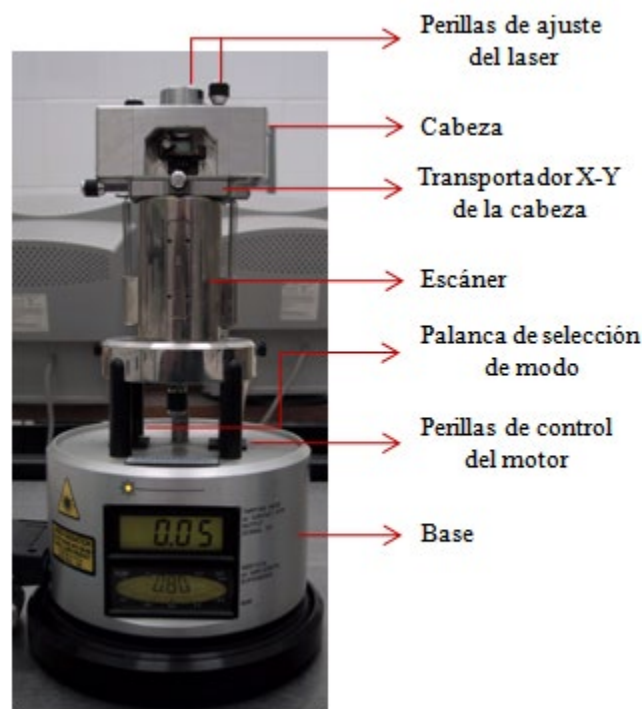


Figura 2.6 Microscopio de Fuerza Atómica (AFM). Modelo Nanoscope IV Multimode Scanning Probe Microscope (SPM), Digital Instruments.

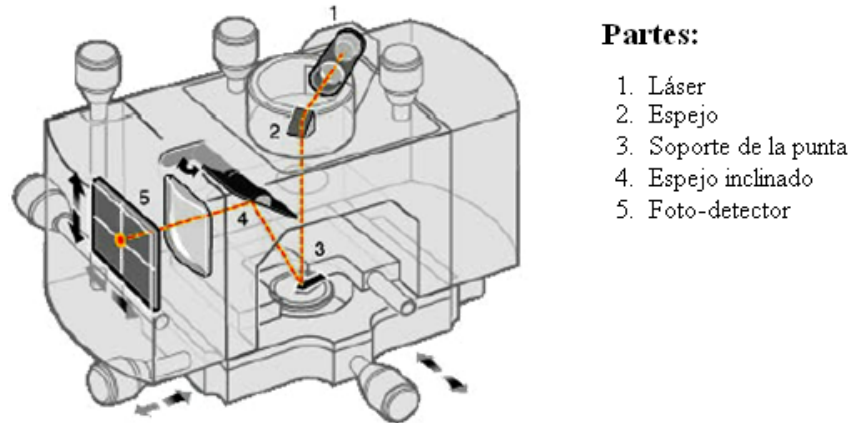


Figura 2.7 Esquema a detalle de la cabeza del microscopio de fuerza atómica.

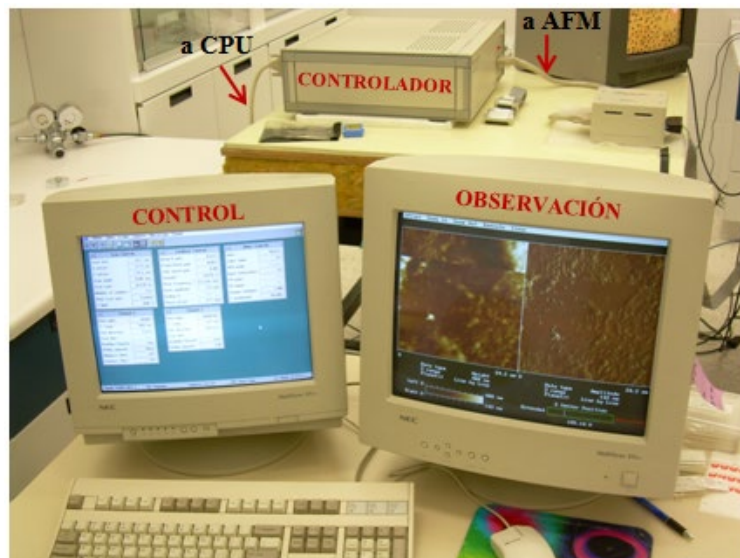


Figura 2.8 Aditamentos extras para el manejo del microscopio de fuerza atómica.

El microscopio está conectado a una computadora a través de un controlador. El controlador manda las señales de operación de la computadora al microscopio y envía los datos necesarios para la generación de las imágenes, del microscopio a la computadora. Se tiene un monitor que despliega los controles del microscopio y otro que muestra las imágenes que se generen de la superficie de un material (figura 2.8).

Para generar las imágenes tridimensionales de la topografía de un material, este microscopio sondea la superficie de una muestra con una punta fina situada en el extremo de un soporte flexible al que se dirige un rayo láser que se refleja hacia un foto-detector (figura 2.9). El escáner (piezo-eléctrico) se mueve en las direcciones X y Y para ir

moviendo la muestra bajo la punta a lo largo y ancho del área de barrido de interés; y en la dirección Z dependiendo de los cambios en la altura de los componentes de la superficie. Mientras se realiza el rastreo del material, existen fuerzas de interacción entre la punta y la superficie de la muestra que producen deflexiones en el soporte de la punta ocasionando que el láser se mueva sobre el foto-detector. Estos movimientos son medidos por un computador para generar la imagen tridimensional de la topografía de la muestra.

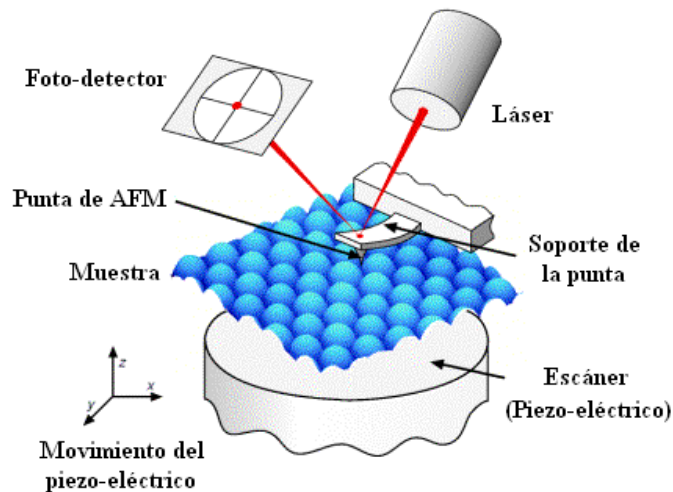


Figura 2.9 Esquema general del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica para la generación de las imágenes.

El computador forma una matriz de 512 x 512 mediciones, tomadas durante el barrido sin importar el área de estudio; por lo tanto, mientras menor sea dicha área, mayor será la resolución de la imagen que se obtenga. Cada medición genera un punto dentro de la imagen y se le da una tonalidad de color dependiendo de la altura del componente de la superficie de la muestra; de tal forma, que los colores claros corresponden a los puntos altos de la superficie mientras que los colores oscuros son los puntos más bajos (figura 2.10). Utilizando el software de análisis del microscopio, se pueden presentar las imágenes tomadas de forma tridimensional (figura 2.11).

La resolución de la imagen que se obtenga, también depende de la punta que se utilice, de tal forma que mientras sea más fina, seguirá con una mayor fidelidad la superficie que se esté analizando (figura 2.12). Por lo general cuando el microscopio funcione en modo de contacto, las puntas utilizadas son de Si_3N_4 ; mientras que para modo de contacto intermitente se utilizan puntas de Silicio. La forma de la punta dependerá del

tipo de superficie a analizar. Para un análisis en el modo de contacto, en caso de una muestra plana y que no sea suave, la punta tiene la forma de una pirámide invertida con un ángulo entre las caras cercano a 70° [31]. En el caso de que se opere el AFM en modo de contacto intermitente, para el análisis de superficies suaves o más rugosas, las puntas que se utilizan son mucho más delgadas y largas. En general, las puntas son cónicas y tienen un largo aproximado de entre 10 y 15 μm , con un ángulo interior cercano a los 35° . El grosor de la punta a la mitad de la altura, oscila entre 3.2 y 4.7 μm (figuras 2.13 y 2.14).

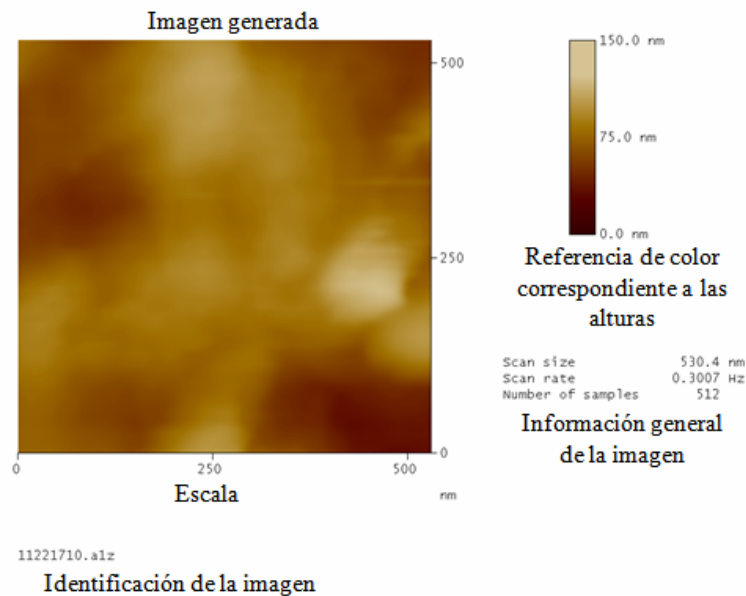


Figura 2.10 Imagen donde se observa la información que genera el AFM.

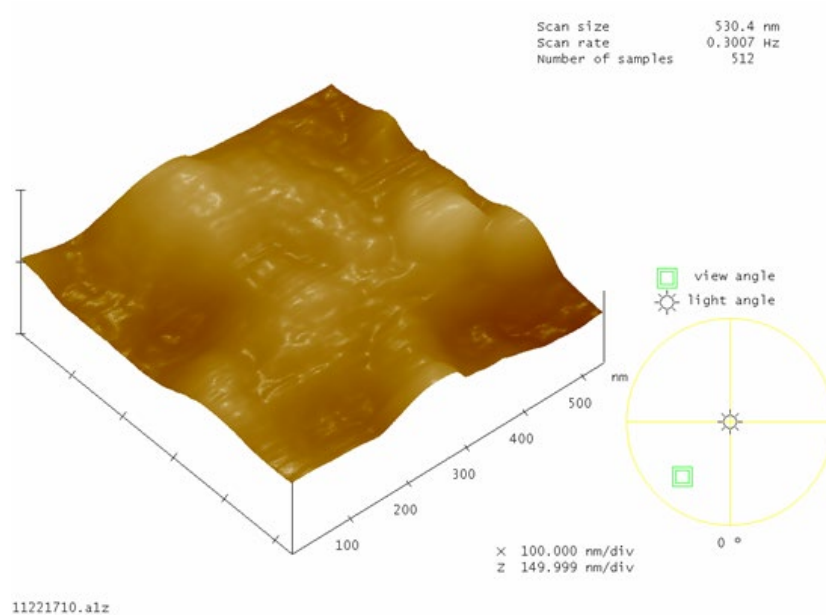


Figura 2.11 Imagen presentada en su forma 3D. Tamaño: 530 x 530 nm.

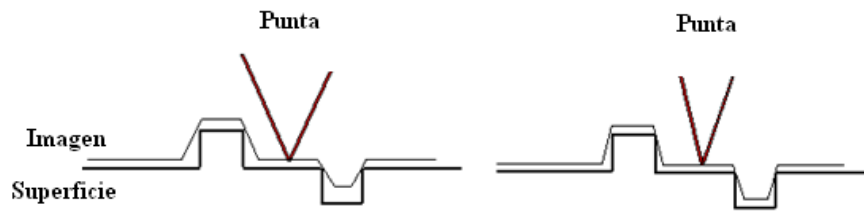


Figura 2.12 Vista lateral del barrido. Se observa que la imagen generada con la punta derecha sigue de manera más fiel la superficie analizada.

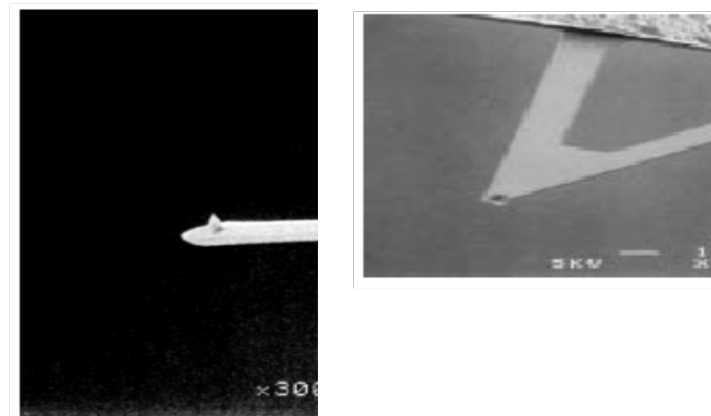


Figura 2.13 Imagen del soporte de la punta de AFM. A la izquierda, la empleada en modo de contacto intermitente. A la derecha la empleada en modo de contacto.

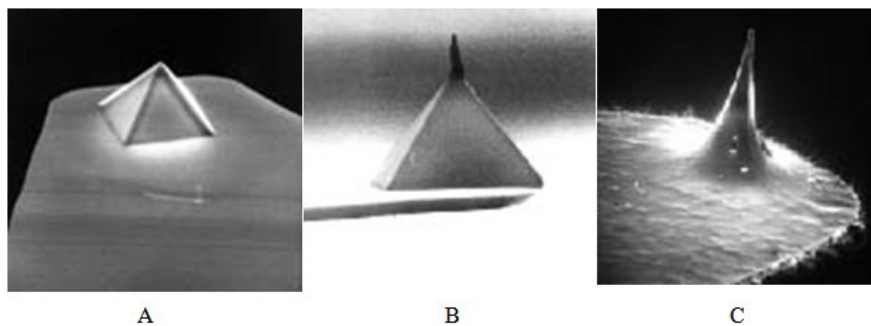


Figura 2.14 Tres tipos comunes de puntas para AFM. (A) Punta normal de 3 μm de alto. (B) Superpunta. (C) Ultrapalanca de 3 μm de alto. Micrografías electrónicas por Jean-Paul Revel, Caltech.

El microscopio de AFM puede trabajar en diferentes medios, en aire, en líquido y en Vacío (UHV-Ultra High Vacuum). Dependiendo de las características de la muestra que se quiera analizar y la información que se requiera de la superficie, el microscopio se puede operar en 3 modalidades; el modo de contacto (*contact mode*), de no-contacto (*non-contact mode*) y de contacto intermitente (*tapping mode*) [31-33]. La figura 2.15 muestra una comparación esquemática de la imagen resultante al utilizar los distintos modos de operación del AFM.

En el modo de contacto, la superficie de la muestra está en contacto todo el tiempo con la punta de AFM. En esta modalidad la constante elástica del soporte de la punta es menor que la constante elástica de los átomos que forman la muestra; por lo tanto un problema que se puede presentar mientras la punta recorre la superficie, es que está se encuentre abruptamente con una protuberancia muy alta y dado a que el barrido no se detiene; la punta no tendría tiempo de levantarse y se llevaría consigo parte del material, dañando la superficie. Por esta razón, esta modalidad se utiliza para estudiar muestras con una topografía muy plana o de gran dureza.

En el modo de no-contacto, la punta del microscopio no entra en contacto con la superficie de la muestra; sino que, el soporte de la punta vibra cerca del material que se quiere caracterizar. Esta modalidad usa la detección de la frecuencia de resonancia del soporte como una medida indirecta de la topografía superficial, ya que esta frecuencia varía debido a las fuerzas de atracción o repulsión que existan entre la punta y los átomos de la superficie de la muestra. Es complicado operar el AFM en esta modalidad al estar en el medio ambiente, debido a que siempre se tiene una pequeña capa de agua sobre la superficie del material que forma un puente de capilaridad entre la muestra y la punta, ocasionando que se toquen.

En el modo de contacto intermitente, el soporte de la punta oscila a frecuencias del orden de kHz mientras desciende hacia la superficie de la muestra y conforme se acercan, la amplitud de la oscilación disminuye hasta detectar la superficie. La punta al estar vibrando toca intermitentemente la superficie y entran en contacto solo en un lapso pequeño de tiempo para generar la imagen, reduciendo la fuerza lateral sobre la punta y el riesgo de producir un daño inelástico a la muestra, como sería romper parte del material; por lo que es ideal para analizar muestras suaves.

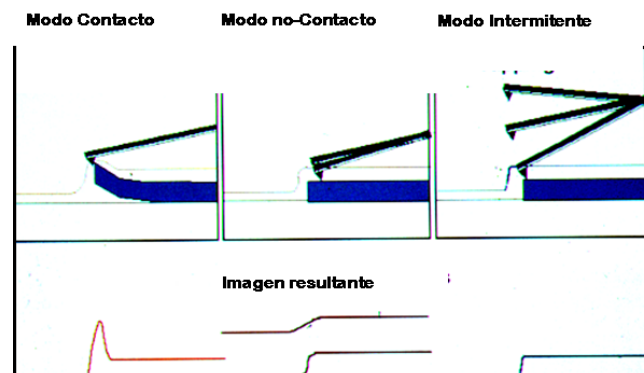


Figura 2.15 Comparación esquemática de la imagen resultante empleando los distintos modos de operación de AFM; contacto, no-contacto e intermitente.

3. HIPÓTESIS

Utilizando microscopía de fuerza atómica AFM, se puede desarrollar una metodología para estudiar a nivel molecular y atómico, los cambios que se presenten en la estructura y topografía de la superficie de los cálculos renales debidos a la influencia de diferentes sustancias.

4. OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema por medio de microscopia AFM que permita el estudio directo de cálculos renales en condiciones fisiológicas *in vitro* bajo la influencia de diferentes medicamentos y sustancias. Probar la metodología de estudio que se desarrolle, empleando alguna sustancia que modifique la estructura y topografía de la superficie de los cálculos renales.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el uso óptimo de la microscopía AFM (en aire y en líquido) y la preparación de la muestra (cálculo renal), para visualizar sus características topográficas.

Elegir la sustancia que probará la metodología que se desarrolle para el estudio de descomposición de cálculos renales.

Darle seguimiento a los cambios de las características topográficas de cálculos renales con AFM en líquido; en presencia de la sustancia de prueba elegida para su disolución.

6. METODOLOGÍA

Se puede estudiar la topografía y estructura superficial a nivel molecular de un material, usando técnicas de nanotecnología como la microscopía de fuerza atómica (AFM) [14, 17-21, 32-36]. El microscopio de fuerza atómica, sondea la superficie de un material (muestra) con una punta fina situada en el extremo de un soporte flexible. Mientras la punta rastrea el material, existen fuerzas (Por ejemplo: fuerzas de van der Waals) entre la punta y la superficie de la muestra que producen deflexiones en el soporte. Estas deflexiones son medidas por un detector y permiten a un computador construir una imagen tridimensional de la topografía de la muestra [32, 33].

Aprovechando esta generación de imágenes tridimensionales, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que es posible desarrollar una metodología a nivel de laboratorio, utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM); para estudiar a nivel molecular y atómico, los cambios que se presenten en la estructura y topografía de la superficie de los cálculos renales debidos a la influencia de diferentes sustancias que se deseen probar en estudios futuros.

Esta comienza con la extracción quirúrgica del cálculo renal para causar el menor daño posible en la superficie del mismo. De ahí se extrae un pequeño pedazo y se prepara para su visualización en el microscopio de AFM. Se obtienen imágenes tridimensionales a nivel nanométrico de su superficie, de manera que pueda observarse el efecto conforme pasa el tiempo de acción de algún tratamiento. Al final, esta secuencia de imágenes se analiza para cualificar y cuantificar en el tiempo, el efecto de disolución que se haya presentado.

Los experimentos se realizaron con la muestra preparada para su visualización con AFM en aire (*ex situ*) y en líquido (*in vitro*). Con las pruebas realizadas en aire, se pudo observar la superficie de un cálculo renal y la fractura de los cristales que la componen debido al efecto de algunas sustancias [37]; motivando al equipo de trabajo a realizar experimentos *in vitro* en búsqueda de ampliar los resultados obtenidos.

Con los resultados adquiridos a partir de los experimentos *in vitro*, se plantearon maneras de poder cualificar y cuantificar el efecto producido por diferentes sustancias en contacto constante con la muestra, planteando una metodología para estudiar la disolución de los cálculos renales (objetivo principal de este trabajo) y describiendo de manera preliminar el efecto de disolución que se observa en la superficie de un cálculo renal

formado por oxalato de calcio e hidroxapatita, debido a la presencia de alopurinol y de ácido cítrico.

Usando esta metodología desarrollada, en estudios futuros con un mayor número de muestras, se podría llegar a conclusiones generalizadas sobre el efecto de diferentes medicamentos y sustancias actualmente empleadas en la cura de la litiasis renal, ayudar a diseñar tratamientos más efectivos para la disolución de los cálculos e incluso evitar la recurrencia que algunos pacientes presentan frente a esta enfermedad.

6.1 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES USANDO AFM EN AIRE; *ex situ*.

6.1.1 Preparación de la Muestra

Un cálculo renal fue extraído quirúrgicamente de un paciente tratado por el servicio de Urología del Hospital Español en la Ciudad de México (Anexo 1). Para preparar la muestra y poderla someter a la técnica de microscopía de fuerza atómica (debido a las especificaciones del microscopio), se cortó un pedazo del cálculo extraído a manera de rebanada (dimensiones aproximadas 5.6 x 2.4 x 2 mm), se montó en resina epóxica dejando libre la superficie externa del cálculo y se colocó en un disco portamuestras del microscopio AFM. La figura 6.1 muestra el tamaño relativo de un cálculo renal y el tamaño de la muestra ya fijada por la resina epóxica (las dimensiones son relativas a un peso mexicano con un diámetro de 20 mm). Es importante resaltar que la superficie de la muestra no fue pulida para no alterarla y evitar modificarla de alguna manera durante la preparación; a diferencia a otros estudios realizados anteriormente por otros grupos de investigación, donde la superficie del cálculo se pulió para obtener una superficie plana [22, 23, 38].



Figura 6.1 Fotografías: arriba, un cálculo renal; abajo, una muestra del cálculo montada para su estudio en AFM. Ambas imágenes muestran la comparación con una moneda de 1 peso mexicano.

6.1.2 Obtención de las Imágenes

Se utilizó el microscopio Nanoscope IV (DI, USA) en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) para obtener imágenes tridimensionales de la superficie del cálculo renal; sin tratamiento y después de haberse expuesto durante diferentes tiempos a la sustancia de prueba de cada experimento. Se utilizó una punta de silicio especialmente diseñada para *tapping mode* (ver anexo 2). En el microscopio se utilizó un escáner modelo 5001EV, que permite un área de barrido de $10 \times 10 \mu\text{m}$ y un movimiento vertical máximo de $2.5 \mu\text{m}$.

El tratamiento no fue aplicado mientras la muestra estuviera en el microscopio, pero utilizando un sistema de video de alta resolución, se tomaron fotografías de $540 \times 400 \mu\text{m}$ (figura 6.2) para marcar la zona de la superficie que sería estudiada y la ubicación del soporte que sujeta la punta del microscopio AFM sobre la muestra, con base en esas fotografías poder posicionar la punta sobre la misma zona del cálculo renal después de cada aplicación del medicamento.

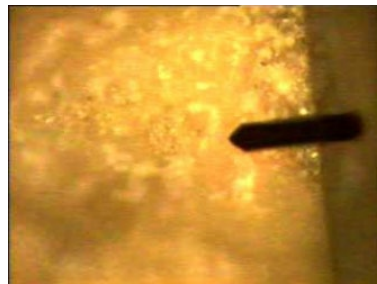


Figura 6.2 Fotografía de la superficie del cálculo renal con la punta de AFM (Tamaño: $540 \times 400 \mu\text{m}$) que muestra la zona de la superficie que será estudiada.

6.1.3 Análisis de los Resultados

Una vez obtenidas las imágenes, se utilizó el software del Nanoscope IV versión 5.12b10, para medir la rugosidad R_q (RMS) de la superficie (anexo 4) en cada intervalo del experimento y poder determinar el efecto disolutivo que se haya ocasionado después de cada aplicación del tratamiento de prueba.

Después se obtuvo una curva que describiera el comportamiento del fenómeno de disolución del cálculo renal ocasionado por la sustancia de prueba, a partir de los cambios que sufrió la rugosidad en cada intervalo de tiempo y que se fueron sumando al valor de la rugosidad R_q medida al inicio de cada experimento de la superficie del cálculo renal sin tratamiento.

6.2 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES USANDO AFM EN LÍQUIDO; *in vitro*.

Para entender el mecanismo de cómo una sustancia disuelve un cálculo renal, se necesita plantear una metodología para evaluar en tiempo real este proceso de disolución. Se sabe que se puede utilizar AFM en líquido, pero hasta ahora en la literatura solo se ha estudiado la cinética del crecimiento de cristales generados *in vitro* (Por ejemplo: oxalato de calcio) [14, 15, 17-21].

Este estudio plantea el diseño de una celda de fluido para AFM y una metodología para evaluar en tiempo real el proceso de disolución de los cálculos renales utilizando microscopía de fuerza atómica mientras una sustancia de prueba afecta directamente la superficie de la muestra.

6.2.1 Diseño y Construcción de una celda de fluido para AFM.

6.2.1.1 Descripción

La celda de fluido es un artefacto que sirve para visualizar la superficie de una muestra sumergida en líquido, en el microscopio de AFM. De esta manera se pueden observar los cambios que el cálculo renal vaya sufriendo conforme pase el tiempo de exposición a alguna sustancia.

El diseño se basó en una celda de fluido comercial de vidrio para su uso en electroquímica en AFM (figura 6.3), de la marca DI (Digital Instruments).

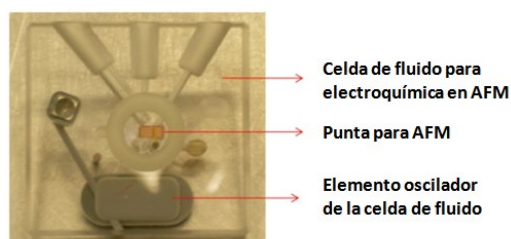


Figura 6.3 Fotografía de una celda de fluido comercial de modo de contacto intermitente para el microscopio AFM Multimode DI.

La celda que se construyó consta de 2 partes (a diferencia de la celda comercial que solo tiene 1), una tapa que sostiene la punta de contacto del microscopio (figura 6.4) y una base para sujetar la muestra del cálculo renal y contener el líquido (figura 6.5). Ambas piezas fueron armadas en acrílico y deben estar perfectamente pulidas.

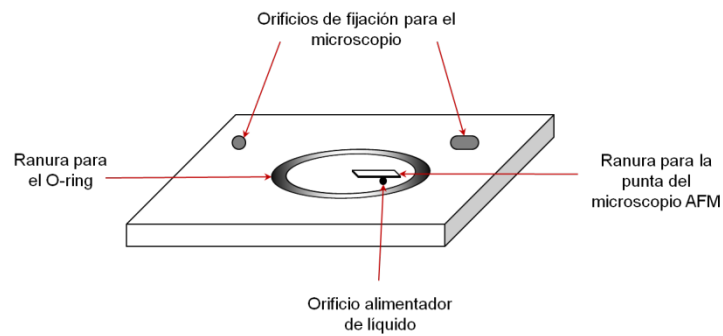


Figura 6.4 Vista inferior del diseño de la tapa de la celda de fluido.

La tapa (figura 6.4) tiene 2 hendiduras que sirven para mantenerla en su posición dentro de la cabeza del microscopio; una ranura donde se coloca un O-ring de teflón (para evitar fugas de líquido); otra ranura para colocar la punta de contacto del microscopio y un orificio por donde se introducirá líquido durante los experimentos en caso de ser necesario.

La base de la celda (figura 6.5) tiene la misma ranura para el o-ring que la tapa de la celda y de esa manera se pueden acoplar las dos partes. En el centro tiene un “pozo” que servirá para montar la muestra de la piedra renal. La altura de la base estará determinada por el movimiento en Z que permite el escáner del microscopio.



Figura 6.5 Diseño de la base de la celda de fluido.

6.2.1.2 Planos de Construcción de la Celda de Fluido

En las figuras 6.6, 6.7 y 6.8 se puede observar las dimensiones de la placa de acrílico para formar la tapa de la celda, así como los detalles de la vista inferior que es la que estará en contacto con la base de la misma. La profundidad de las ranuras de sujeción de la celda y del O-ring es de 1 mm.

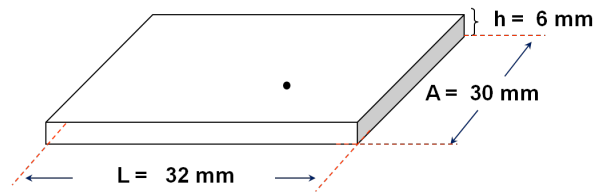


Figura 6.6 Esquema de dimensiones de la tapa de la celda de fluido (vista superior).

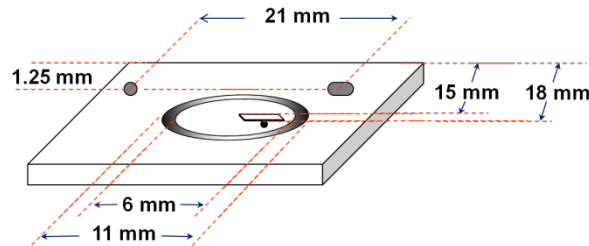


Figura 6.7 Esquema de dimensiones de la tapa de la celda de fluido (vista inferior).

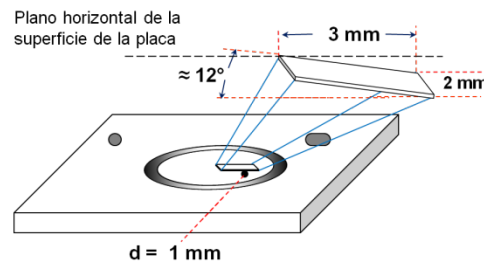


Figura 6.8 Dimensiones de la ranura porta-punta de la tapa de la celda de fluido (vista inferior).

La punta del microscopio será fijada con un pegamento epóxico en la ranura que le corresponde de la tapa de la celda. Este pegamento permitirá muy buena sujeción de la punta y será fácil removerla de su lugar. Es necesario que la punta quede con un ángulo aproximado de 12° con respecto a la horizontal, para que el laser pueda ser correctamente reflejado hacia el fotodetector del microscopio [30].

La figura 6.9 muestra las dimensiones de la base de la celda. Aquí se puede observar la ranura para el O-ring y el “pozo” donde deberá ser colocada la muestra del cálculo renal. De la misma manera que con la punta del microscopio, la muestra se adherirá con un pegamento epóxico a la base.

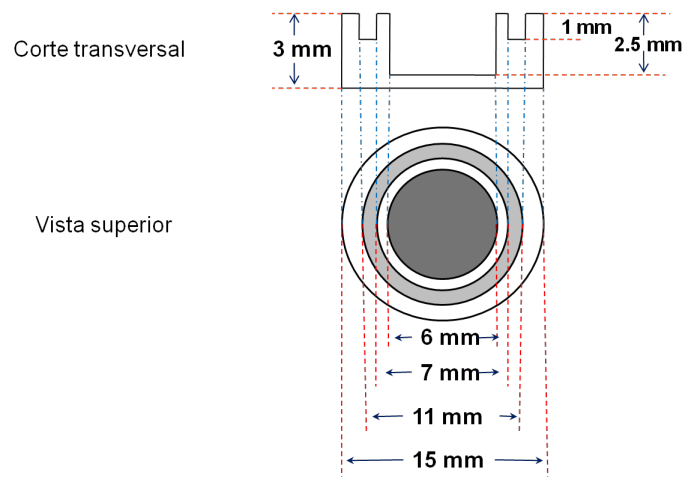


Figura 6.9 Esquema de dimensiones de la base de la celda de fluido. Se observa una vista superior y un corte transversal.

6.2.2 Preparación de la Muestra

Utilizando el mismo cálculo renal que en los experimentos en aire (sección 6.1.1), se extrae una muestra que sus dimensiones no excedan 4 x 4 x 3 mm y se monta sobre la base de la celda de fluido anteriormente descrita (ver figura 6.10). La superficie del cálculo renal no se pule para evitar modificarla.

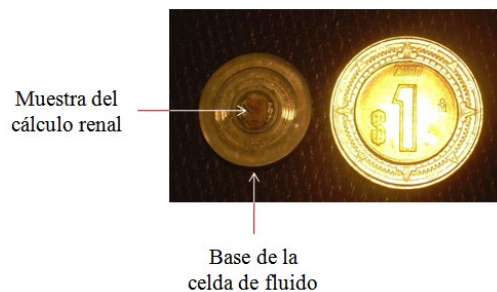


Figura 6.10 Fotografía del montaje de la muestra.

6.2.3 Acoplamiento de la Celda de Fluido en el Microscopio

Para utilizar esta celda de fluido basado en su diseño, se fijan la punta en la tapa, la muestra del cálculo renal en la base y la base se pega a un disco metálico porta muestras para el microscopio AFM. Después se aplica el líquido sobre la muestra ya fijada y se acoplan las dos partes por medio del O-ring para luego introducir la celda en el microscopio y empezar a obtener las imágenes de la superficie del cálculo (figura 6.11).

El primer problema que se tuvo al utilizar la celda de la manera descrita, es que el O-ring impide un libre desplazamiento de la punta hacia cualquier lugar del cálculo renal. La superficie del cálculo es muy rugosa; por lo tanto, es necesario poder elegir cualquier

sitio de la superficie para encontrar uno donde se puedan obtener las imágenes de AFM; por lo tanto, en los experimentos se evita el uso de este elemento.

Entonces primero se introduce al microscopio la base de la celda con la muestra fijada, se ponen 25 μ l. de la sustancia de prueba sobre la muestra y se coloca la parte superior de la celda que sostiene la punta.

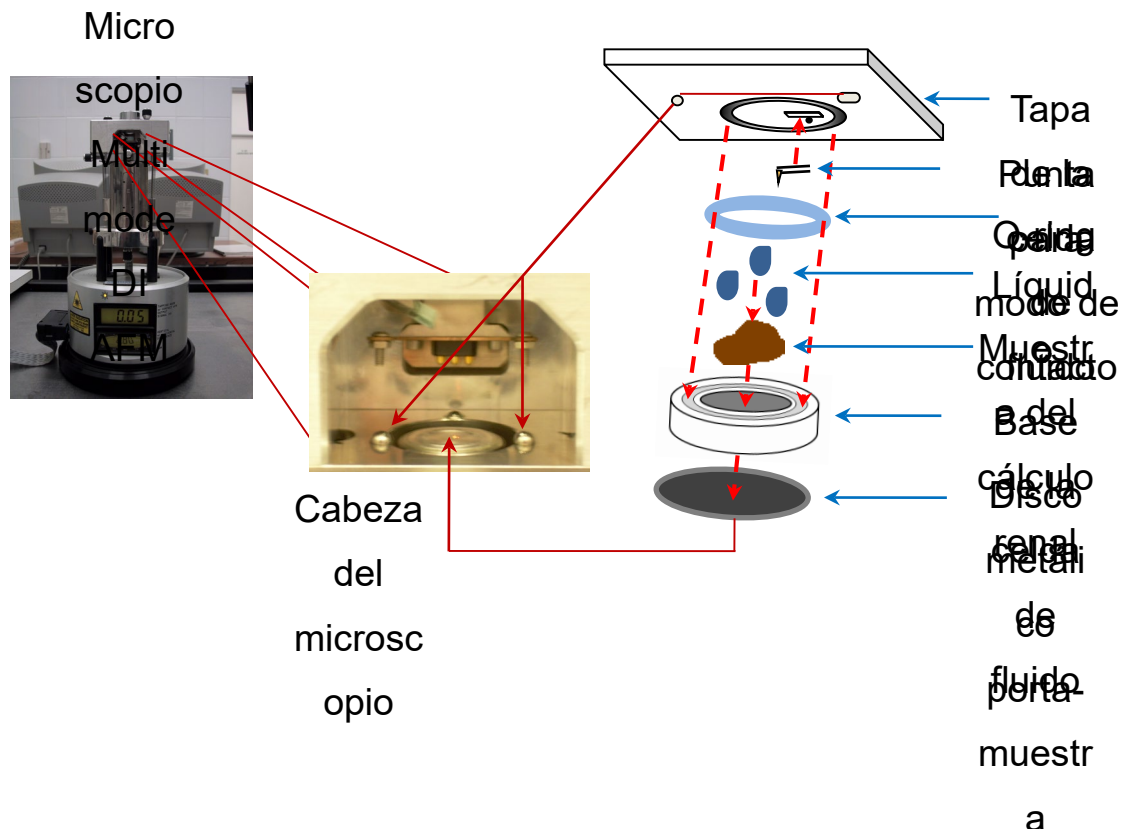


Figura 6.11 Acoplamiento de la celda de fluido para realizar experimentos.

6.2.4 Obtención de las Imágenes

Se utilizó el microscopio Nanoscope III (DI, USA) en fluido, para obtener imágenes 3D de la superficie del cálculo renal mientras era afectado por una sustancia de prueba. El escáner montado en el microscopio fue el modelo 3030J, que permite un área de barrido máxima de $125 \times 125 \mu\text{m}$ y un movimiento vertical de $5 \mu\text{m}$. Se usó una celda de fluido comercial de la empresa Digital Instruments que por lo general se utiliza para realizar electroquímica (figura 6.3), debido a que con la celda de fluido diseñada no se alcanzó a desarrollar el nivel de calidad requerido para los experimentos y que fue

necesario utilizar el microscopio AFM en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) debido a la gran irregularidad de la superficie de la muestra.

Para obtener las imágenes de la superficie del cálculo renal en líquido, se usa el microscopio en modo de contacto intermitente con una punta de Si_3N_4 diseñada para operar el AFM en modo de contacto (Anexo 3). En este trabajo se usó este tipo de punta debido a su baja constante elástica (0.12 kN/m) que permite una menor oscilación de la punta que una especialmente diseñada para contacto intermitente (constante elástica nominal de la punta utilizada en los experimentos en aire es de 40 kN/m); tratando de evitar lo más posible las ondas que esta oscilación genera en la sustancia de prueba que pudieran interferir o distorsionar el haz del rayo laser del microscopio. Por esta misma razón se fija una frecuencia de barrido baja, en este caso fue de aproximadamente 0.3 Hz .

Una vez que el microscopio esta escaneando la superficie seleccionada del cálculo; al final del barrido de cada imagen, se inyecta a través de la celda de fluido la cantidad necesaria de solución para que la punta y la muestra sigan inmersos en líquido (figura 6.12). Para esto, se utilizó una micro-jeringa de 97 mm de largo y con un grosor aproximado de $350 \mu\text{m}$.

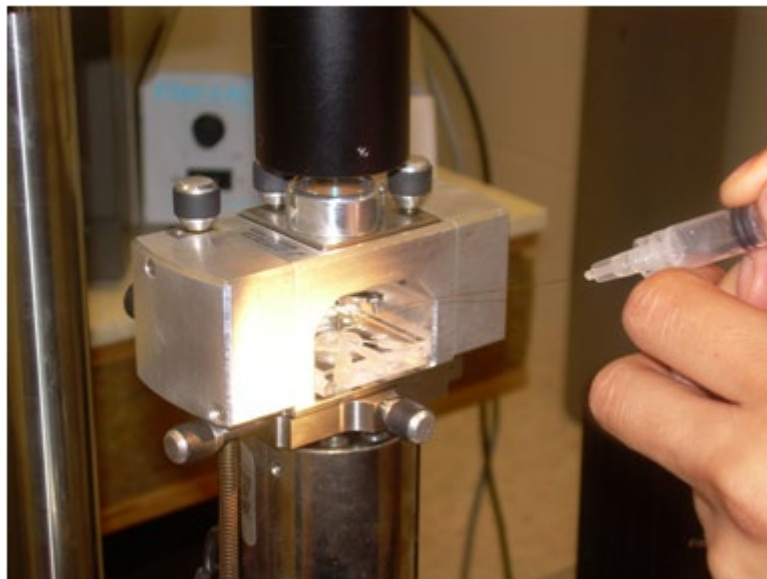


Figura 6.12 Fotografía que muestra la inyección de líquido dentro de la celda de fluido. Se utilizó una micro-jeringa de 97 mm de largo y $350 \mu\text{m}$ de grosor.

6.2.5 Recopilación de los datos

Para recopilar los datos, se separan las imágenes en dos grupos dependiendo de la dirección de barrido en que se generaron; ya fuera ascendente o descendente, con la

finalidad de estudiarlas por separado para asegurar que se hayan adquirido bajo las mismas circunstancias.

Al adquirir las imágenes de manera continua, se presenta un ligero desplazamiento ocasionando que todas las imágenes no sean exactamente del mismo sitio de la superficie del cálculo renal; por lo tanto, se les hace un acercamiento en una zona que sea común para todas del mismo tamaño, utilizando el software para el análisis de las imágenes del microscopio Nanoscope III. En este estudio la versión utilizada es la 5.30r3.sr3.

Usando el mismo software, se mide la rugosidad superficial RMS (anexo 4) de cada imagen para tener un parámetro que defina de manera general el fenómeno de disolución que se presente en la superficie bajo estudio. Para estudiar con mayor detalle este proceso en algunos puntos de la superficie, a las imágenes se les hacen 2 cortes diagonales de sección (anexo 5), obteniendo perfiles de la superficie del cálculo que permiten realizar mediciones de longitud (L , L') y altura (a , a') entre los puntos que tengan mayor o menor altura (figura 6.13).

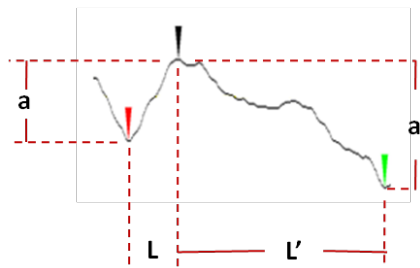


Figura 6.13 Perfil superficial con 3 puntos de prueba.

6.2.6 Análisis de Resultados

Se realizan 4 análisis de los datos, útiles para comprender el comportamiento de la disolución superficial del cálculo que se presentó en cada experimento, de manera que sea posible determinar la mecánica de este proceso.

Primero se analiza este fenómeno con base en la rugosidad superficial RMS (R_q) de las imágenes. Aquí se grafican de manera acumulativa, los cambios que haya sufrido la rugosidad para determinar su tendencia y una función matemática que defina el comportamiento del fenómeno disolutivo que haya ocasionado cada sustancia de prueba en el cálculo bajo estudio.

Luego se acomodaron los perfiles superficiales de manera descendente de acuerdo al tiempo en que fueron obtenidos, bajo el supuesto de que al estar el cálculo renal sumergido en un ambiente líquido diferente a las condiciones internas del riñón en el que

se generó, no existe un proceso de biomineralización; teniendo esto en cuenta, los perfiles no deben cruzarse ya que esto implicaría que el cálculo renal siguiera creciendo *in vitro* (figura 6.14). De esta manera se puede observar de manera gráfica la disolución presente en cada sección de las imágenes, y se calcula la velocidad promedio de disolución durante todo el experimento de los picos y valles de la superficie del cálculo que se hayan marcado.

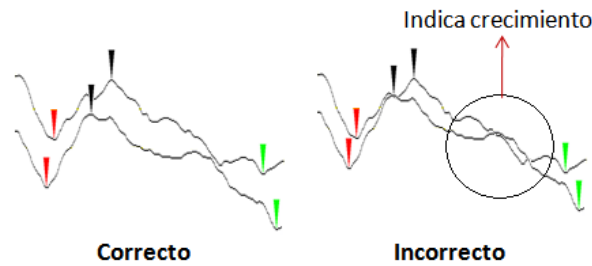


Figura 6.14 Correcta colocación de los perfiles para al análisis de disolución.

Después las alturas que se midieron a partir de los perfiles se grafican en el tiempo, para observar la tendencia de sus cambios y determinar si se sigue un patrón de disolución similar en todos los puntos de prueba. Cada segmento ascendente de las gráficas representa un aumento en la altura medida entre un pico y un valle de la superficie, indicando una mayor disolución en el punto más bajo del perfil (valle); cuando la pendiente es descendente, indica una mayor disolución en un pico.

Por último, se tiene un análisis en el que se obtuvieron los vectores de disolución superficial para cada imagen obtenida en secuencia durante cada experimento. Estos vectores se calcularon a partir del tiempo transcurrido entre una imagen y otra, y las mediciones de distancia (para obtener los vectores horizontales) y de altura (para obtener los vectores verticales) realizadas entre los marcadores de los extremos y el marcador central de cada perfil.

Cada vector de disolución horizontal se dirige hacia fuera de la imagen si la distancia entre un punto de altura máxima (pico) y un punto de altura mínima (valle) de cada perfil se volvió mayor; y hacía dentro, si la distancia entre ellos disminuyó. Se observó que por lo general, mientras más grande sea la magnitud del vector indica una menor uniformidad en la disolución de las partículas. La figura 6.15 ejemplifica los vectores horizontales y muestra la manera indirecta en que representan la uniformidad de la disolución en cada zona.

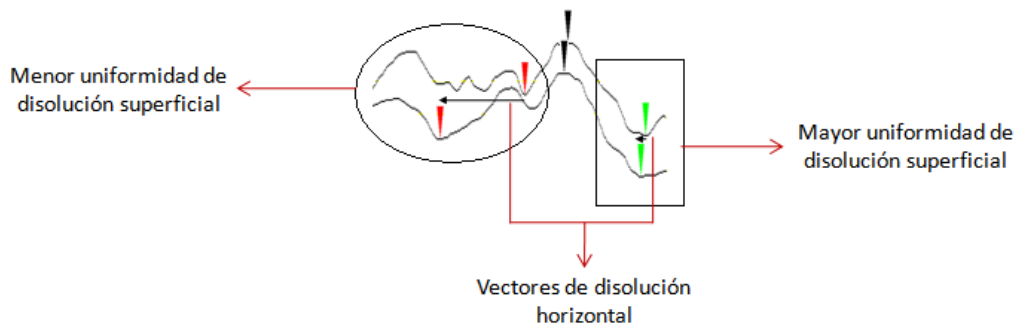


Figura 6.15 Ejemplo de vectores de disolución horizontal y su interpretación.

Los vectores verticales están colocados en el punto en donde se haya presentado una mayor disolución vertical, ya sean las zonas altas o bajas del perfil; tomando en cuenta que un vector de disolución de poca magnitud indica que tanto el punto de altura máxima como el punto de altura mínima, se disolvieron casi a la misma velocidad. La figura 6.16 muestra los casos en que la disolución fue mayor en las partes más altas del perfil, y donde la mayor disolución vertical se presentó en las zonas bajas de la superficie.

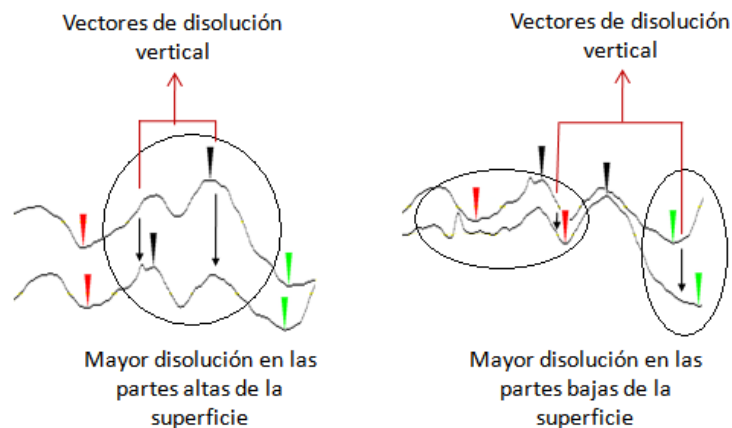


Figura 6.16 Ejemplo de vectores de disolución horizontal y su interpretación.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

El propósito de los experimentos en aire fue determinar si era posible obtener imágenes de la topografía superficial de un cálculo renal por medio de microscopía de fuerza atómica, y si a partir de esas imágenes se podían observar y cuantificar cambios en la superficie debidos al efecto disolutivo que pudiera ocasionar alguna sustancia.

Para ello se realizaron 2 experimentos empleando la metodología descrita en la sección 6.1, probando una sustancia diferente en cada uno. La primera sustancia de prueba utilizada fue un té hecho con una yerba conocida coloquialmente como Cola de Caballo (*Equisetum Arvense*) que dentro de la medicina tradicional mexicana se usa para el tratamiento de las piedras de riñón; Experimento 1 [16]. En el segundo experimento (Experimento 2) se usó el medicamento comercial Puribel 300, de la compañía farmacéutica I.M. Bruluart, cuya sustancia activa es el Alopurinol y que es recetado contra la litiasis renal [9].

Los siguientes 3 experimentos se realizaron para probar las bondades de la metodología desarrollada de la sección 6.2 y evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la cinética del fenómeno de disolución que ocasionaron en la muestra del cálculo renal las sustancias de prueba. En 2 de los experimentos se utilizó como sustancia de prueba una solución de 10^{-3}M de Alopurinol que se probó en 2 zonas diferentes de la superficie del cálculo, son los experimentos 3 y 4. En el tercer experimento se usó una solución de 10^{-3}M de Ácido Cítrico (Experimento 5), y se comparó el fenómeno de disolución observado con los experimentos anteriores.

7.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (*Equisetum Arvense*)

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.1, se preparó la muestra del cálculo renal y se obtuvo una imagen de su superficie antes de iniciar el tratamiento. Luego se obtuvieron imágenes de la misma zona después de sumergir la muestra durante 4, 8, 11.5 y 27 horas en un té preparado especialmente para cada tiempo.

El té de cola de caballo se prepara hirviendo durante 15 minutos en medio litro de agua 12 gramos de la planta [16].

Para preparar el té, se adecuaron las instrucciones a condiciones de laboratorio y se hirvió durante 15 min., en 80 ml. de agua Milli-Q (agua de alta pureza), 2 gr. de la

hierba y después se dejó reposar hasta que se enfriara a temperatura ambiente antes de utilizarlo para tratar el cálculo renal. Su pH en estas condiciones es de 6.3.

7.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol

Para este experimento se preparó con el medicamento comercial Puribel-300, de la compañía farmacéutica I.M. Bruluart, una solución de alopurinol ($C_5H_4N_4O$, peso molecular 136.112 g/mol). En casos de litiasis graves, se receta de 700 a 900 mg/día de alopurinol y tomando en cuenta que la ingesta de líquidos recomendada por día es de 2 litros y que un 70% del medicamento se desecha en la orina, se calculó que en 100 ml de agua Milli-Q debería haber aproximadamente 40 mg de alopurinol, para simular la presencia del medicamento en los riñones. Las indicaciones del medicamento utilizado señalan que cada pastilla contiene 300 mg de alopurinol; y en conjunto la pastilla pesa alrededor de 523 mg; por lo tanto se disolvieron aproximadamente 70 mg de la pastilla molida en 100 ml de agua para obtener la solución deseada con una concentración de 10^{-3} M de alopurinol.

Se empleó la metodología descrita en la sección 6.1 para preparar una muestra y obtener imágenes de altura de AFM de la superficie del cálculo sin tratamiento y después de ser expuesto a la solución de alopurinol durante 1 hr 20 min y 64 horas.

7.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

En pro de conseguir mayor información sobre el comportamiento disolutivo del alopurinol sobre la superficie del cálculo renal, se realizó este experimento para complementar la información obtenida en el experimento en aire de la sección 7.2.

Se preparó una solución diluyendo 40 mg de alopurinol en 100 ml de agua ultra-pura Milli-Q para formar una solución de 10^{-3} M, tal como se explica en la sección anterior.

Siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2, se preparó una muestra del cálculo renal y se obtuvieron imágenes de AFM durante 226 minutos con la solución de Alopurinol obteniendo un total de 8 imágenes que posteriormente fueron divididas en 2 grupos de estudio (Grupo A y B) para recabar los datos necesarios para su análisis, tal como se describe en la metodología de la sección 6.2.5.

7.4 EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

En este experimento se busca conocer si el efecto de disolución del alopurinol encontrado en el experimento anterior se repite al obtener imágenes en otro punto de la superficie del cálculo renal.

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.2, se preparó una muestra del cálculo renal y se obtuvieron imágenes de AFM con una sustancia de 10^{-3}M de Alopurinol durante 313 minutos. Las imágenes que se obtuvieron durante la aplicación del tratamiento se dividieron en 2 grupos dependiendo de la dirección de barrido en la que fueron obtenidas (ascendente o descendente) de manera que las imágenes a comparar fueran obtenidas exactamente bajo las mismas circunstancias (ver sección 6.2.5).

7.5 EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.

En este experimento, se probará una solución de ácido cítrico con la misma concentración que la utilizada de alopurinol en los experimentos anteriores, para observar si existen diferencias en el efecto ocasionado por ambas sustancias. El ácido cítrico sirve como inhibidor para la biomineralización de los cálculos renales [6, 13-15].

Para preparar una solución de 10^{-3}M de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ con peso molecular de 192.12 uma), se diluyeron aproximadamente 9.6 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua Milli-Q.

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.2, se preparó una muestra del cálculo renal y se obtuvieron imágenes de AFM con la sustancia de ácido cítrico durante 226 minutos. Las imágenes que se obtuvieron durante la aplicación del tratamiento se dividieron en 2 grupos igual que en los experimentos 3 y 4.

8. RESULTADOS

En este capítulo se recopilan las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica para cada uno de los experimentos realizados, así como las mediciones obtenidas con el software de análisis de imágenes del microscopio, que cuantifican las características topográficas de la superficie del cálculo renal, que posteriormente fueron analizadas para describir el efecto de cada sustancia de prueba.

8.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (*Equisetum Arvense*)

Se obtuvieron imágenes de altura de AFM en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) que muestran la topografía superficial del cálculo renal. Las imágenes obtenidas son de una superficie aproximada de $1\mu\text{m}^2$ (figura 8.1).

Usando el software indicado (ver sección 6.1.3), se obtuvieron los datos de rugosidad superficial R_q (RMS) para cada imagen de altura (tabla 8.1).

Tabla 8.1 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al té de cola de caballo.

Exposición del cálculo renal al té	R_q (RMS) (nm)
Sin tratamiento	42.188
4 hr	102.130
8 hr	25.809
11.5 hr	36.652
27 hr	92.635

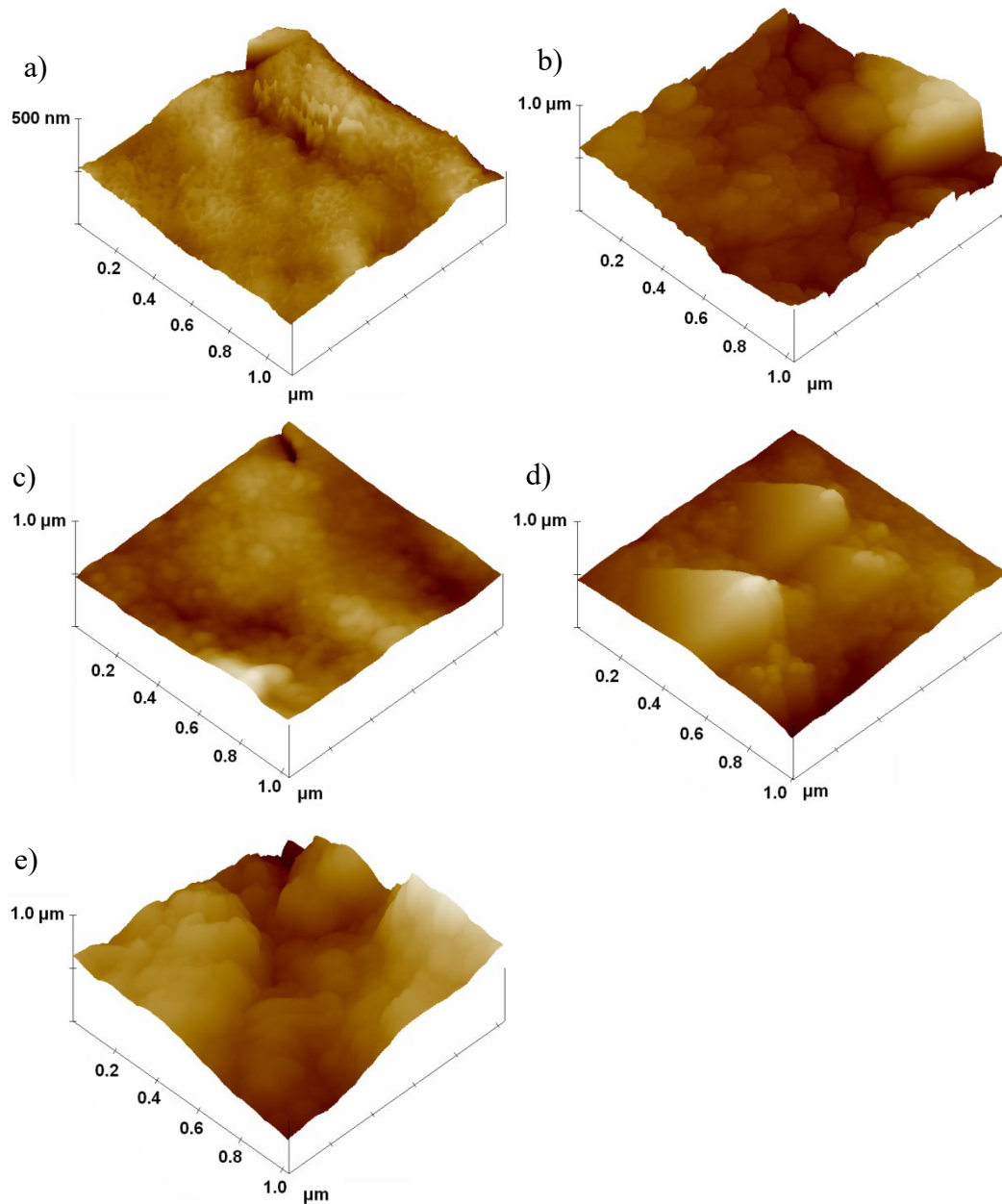


Figura 8.1 Imágenes 3D de la superficie del cálculo renal a diferentes tiempos de tratamiento con el té de cola de caballo. a) sin tratamiento. b) 4 hrs. c) 8 hrs. d) 11 hrs y 30 min. e) 27 hrs.

8.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol

Se obtuvieron imágenes de altura de AFM en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) que muestran la topografía superficial del cálculo renal a diferentes tiempos de exposición al alopurinol. Las imágenes obtenidas son de una superficie aproximada de $1\mu\text{m}^2$ y se muestran con los mismos parámetros de altura, color y contraste (figuras 8.2a-8.2c).

Usando el software del microscopio, se obtuvieron los datos de rugosidad superficial R_q (RMS) para cada imagen de altura (tabla 8.2), en donde se puede observar la presencia de cambios en la topografía superficial del cálculo.

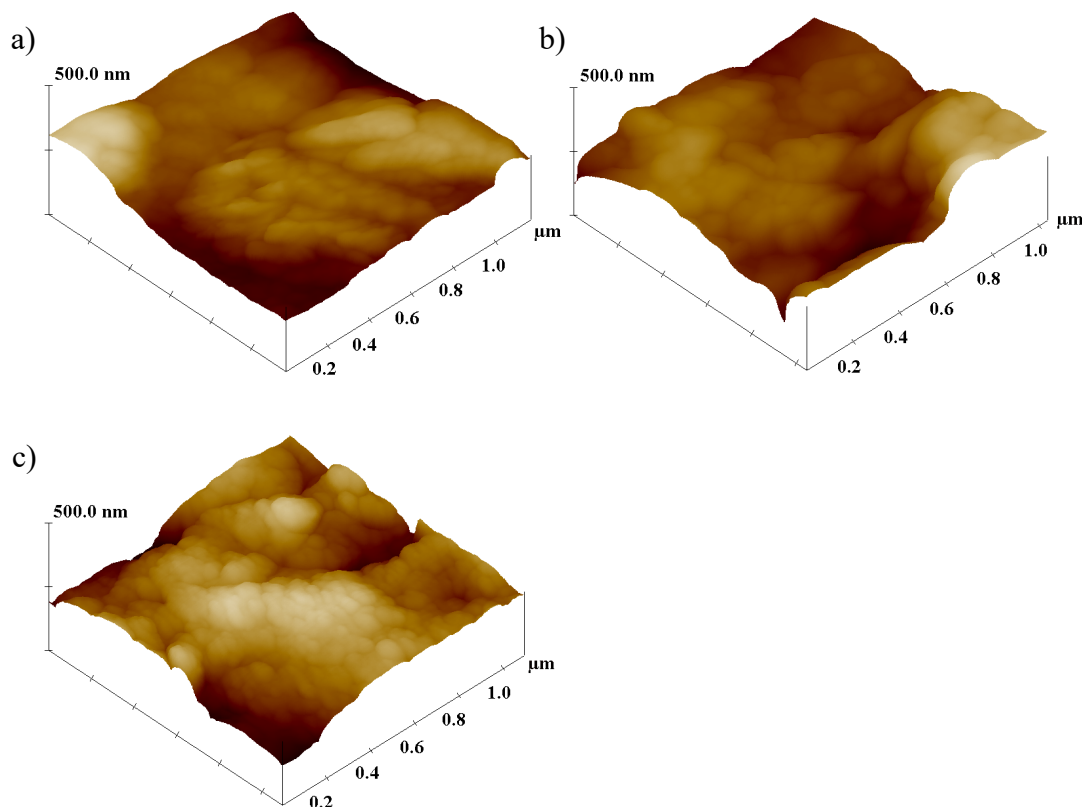


Figura 8.2 Imágenes 3D de la superficie del cálculo renal a diferentes tiempos de tratamiento con una solución de $3 \times 10^{-3} \text{M}$ de Alopurinol. a) sin tratamiento. b) 1 hora y 20 min. c) 64 hrs.

Tabla 8.2 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol	R_q (RMS) (nm)
Sin tratamiento	62.291
1 hr 20 min	97.743
64 hr	56.364

8.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

La figura 8.3 muestra las imágenes que se obtuvieron de manera continua de un área de aproximadamente $2\mu\text{m}^2$ del cálculo renal. Se puede observar que aunque fueron obtenidas sin mover manualmente la punta de AFM, no muestran exactamente el mismo sitio; por lo tanto, se hizo un acercamiento (marcado con un cuadro) en una zona que fuera común en todas las imágenes obteniendo superficies de $719 \times 719 \text{ nm}$.

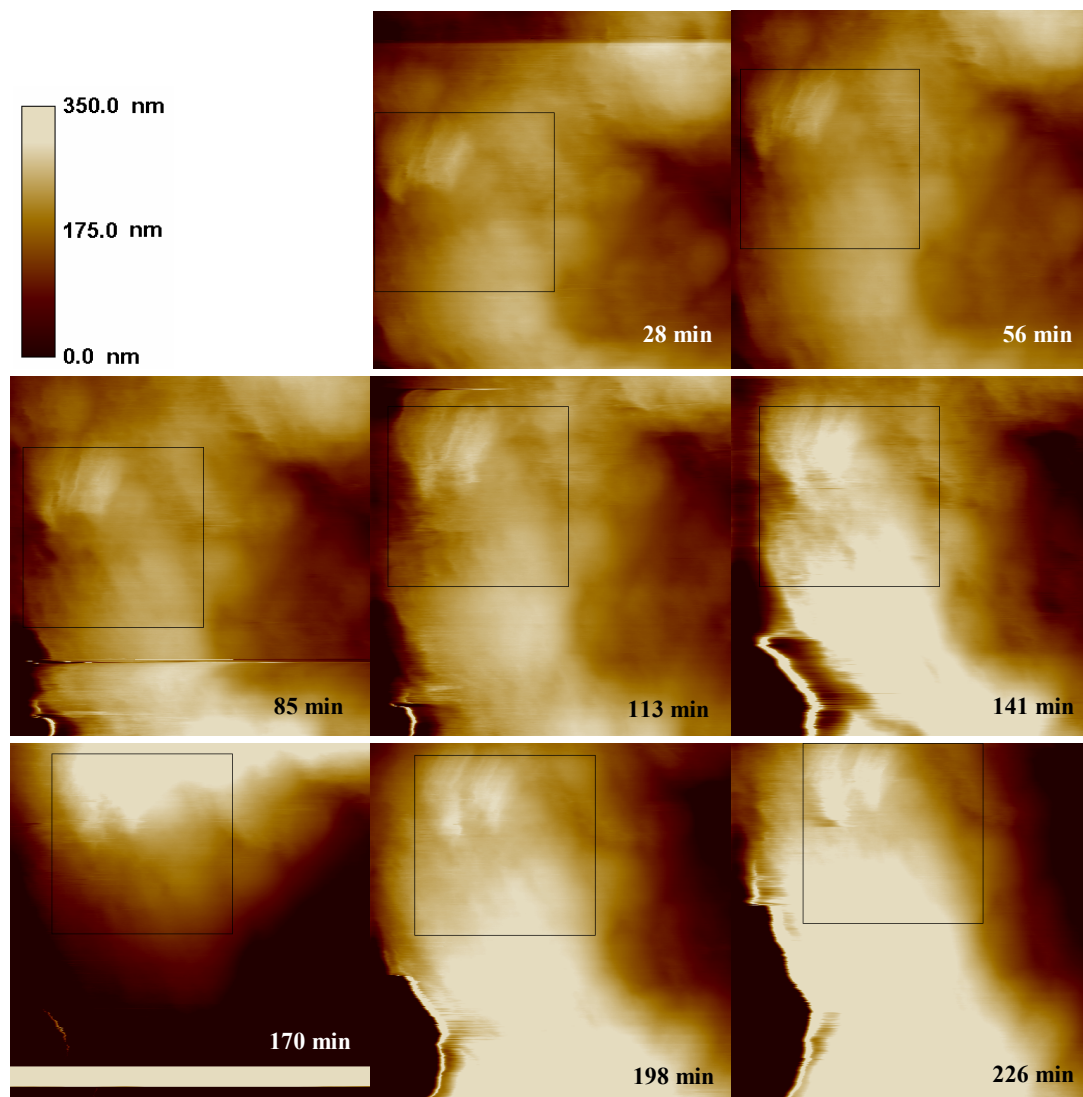


Figura 8.3 Imágenes de AFM obtenidas *in vitro* de la superficie del cálculo renal sumergida en Alopurinol. Dimensiones: $1.432 \times 1.432 \mu\text{m}$.

Las figuras 8.4 y 8.5, muestran de manera tridimensional las imágenes obtenidas con los acercamientos que serán analizadas como el Grupo A y B respectivamente.

Para caracterizar cada superficie de las imágenes y obtener datos útiles para conocer si se presentó un fenómeno de disolución, se sacaron dos cortes de sección diagonal para cada grupo de imágenes, de acuerdo a la sección 6.2.5. Las figuras 8.6 a 8.8 muestran la Sección 1, la Sección 2 y los perfiles de cada sección respectivamente, para el Grupo A. Para el Grupo B, las figuras 8.9 y 8.10 muestran los cortes de Sección 1 y 2 respectivamente; y en la figura 8.11 se presentan los perfiles obtenidos.

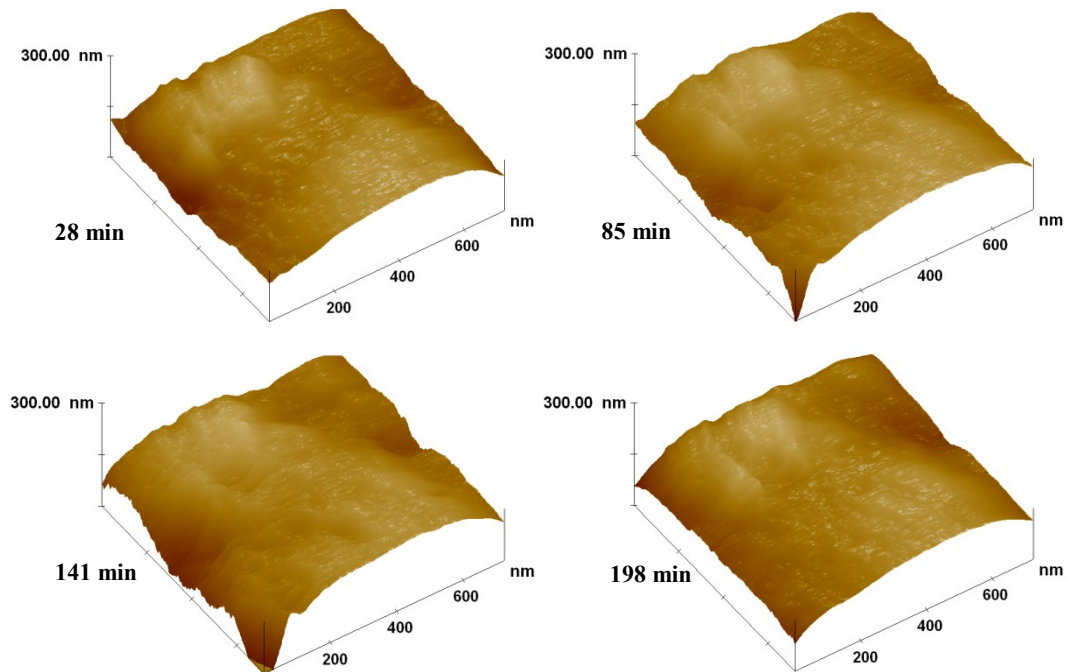


Figura 8.4 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 1. Dimensiones: 719 x 719 nm.

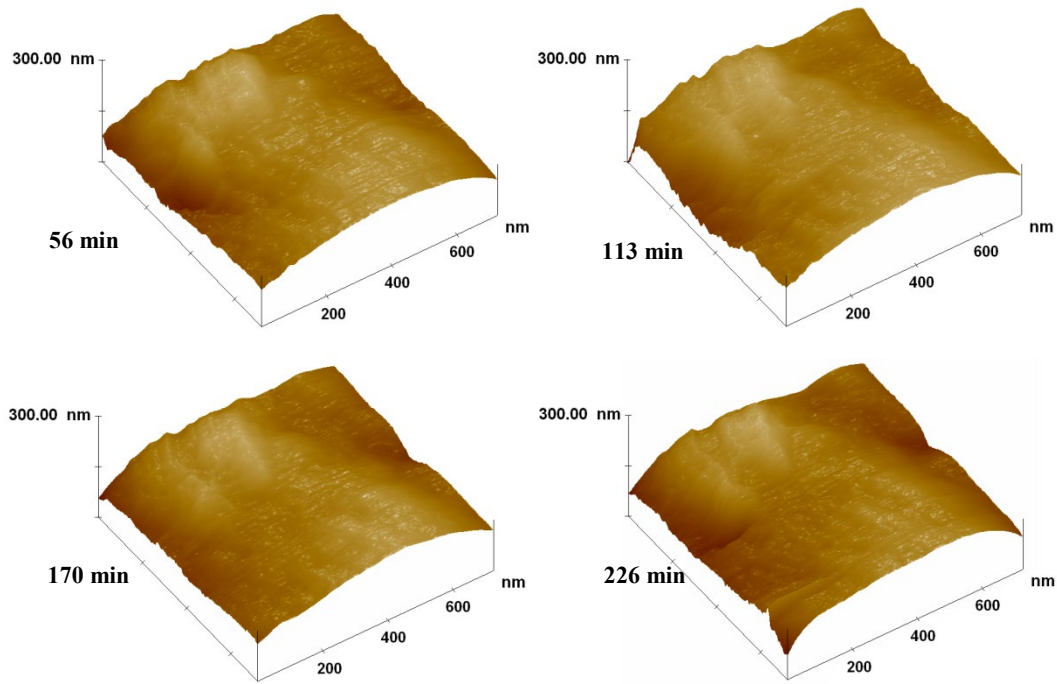


Figura 8.5 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 1. Dimensiones: 719 x 719 nm.

En cada sección se pusieron 3 marcadores. El marcador negro (marcador central), está sobre el punto más bajo del perfil, mientras que los marcadores rojo (izquierdo) y verde (derecho) están sobre los puntos de mayor altura a cada lado del marcador central.

Al comparar cada perfil de las secciones (figuras 8.8 y 8.11), se observa que existen algunos cambios entre ellos indicando que durante el experimento si se presentó una disolución de alguna manera en la superficie del cálculo renal.

Se tomaron mediciones de la distancia entre los marcadores, tomando como referencia el marcador negro, la altura que hay desde el marcador negro (punto más bajo) y los marcadores rojo y verde; y la rugosidad superficial R_q de cada imagen. Las tablas 8.3 (Grupo A) y 8.4 (Grupo B), muestran los datos obtenidos.

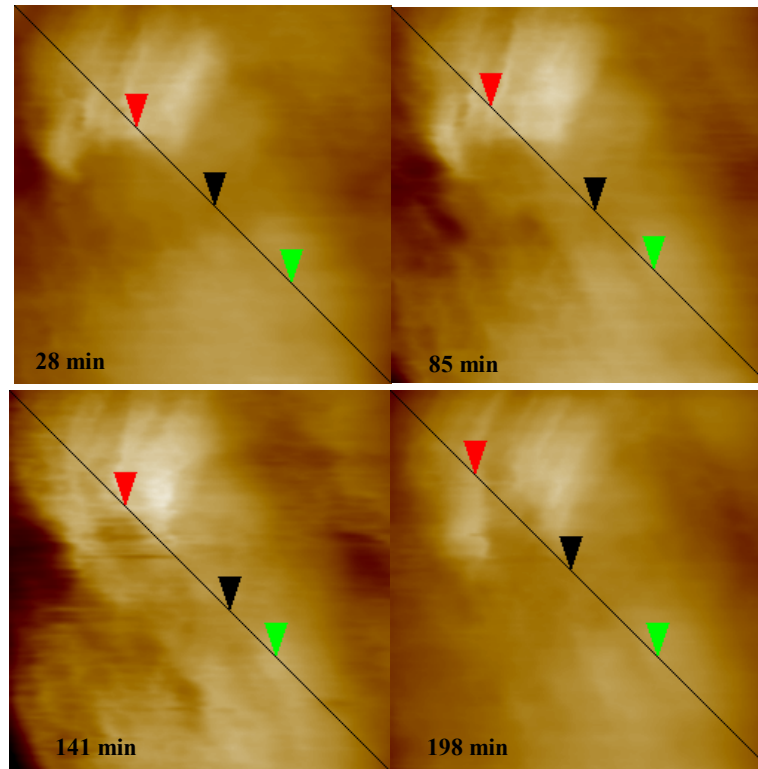


Figura 8.6 Sección 1 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.

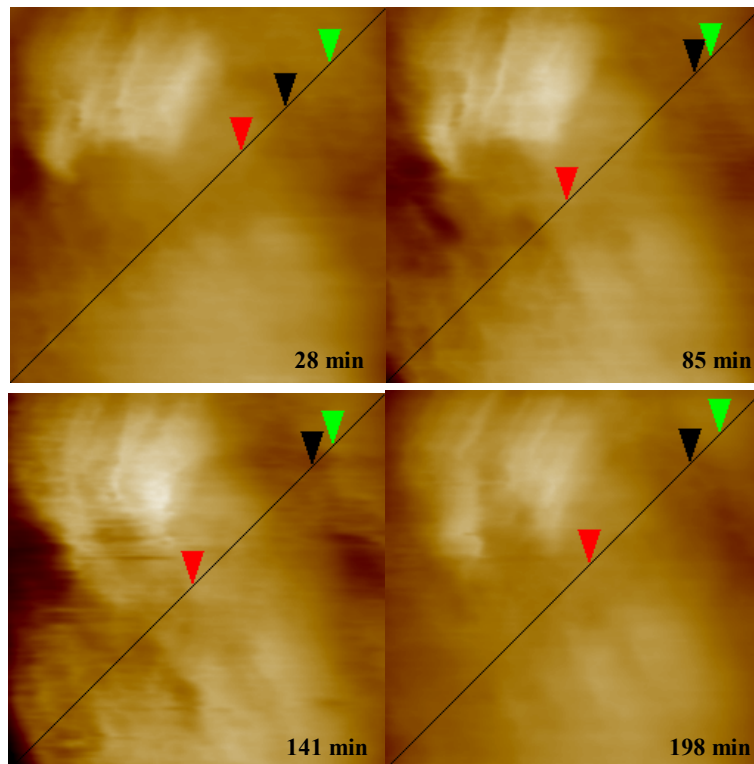


Figura 8.7 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.

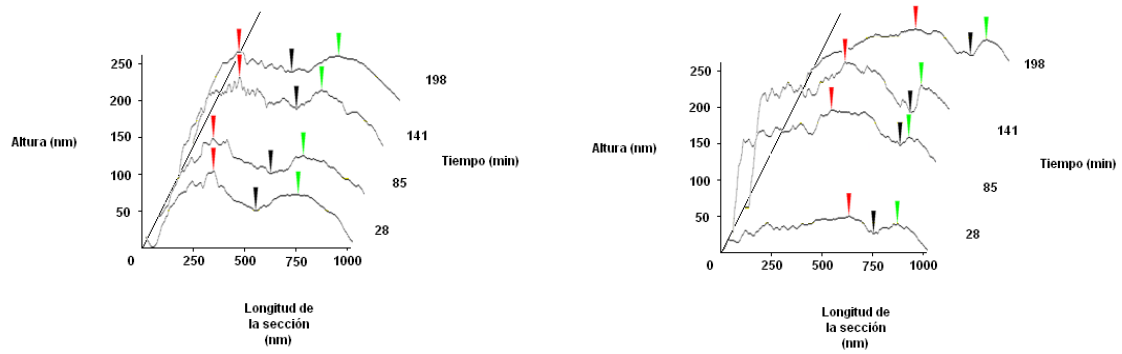


Figura 8.8 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

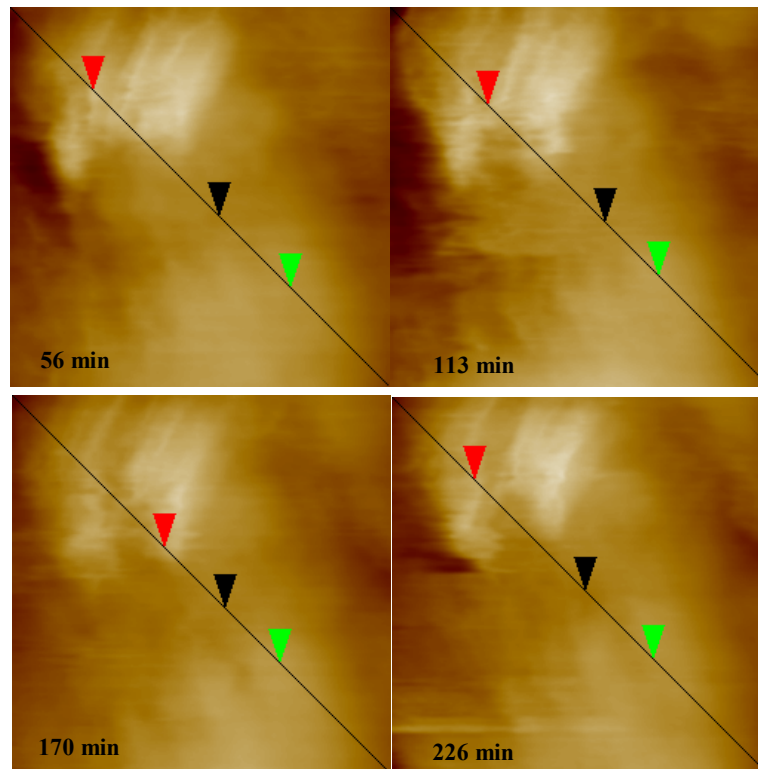


Figura 8.9 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.

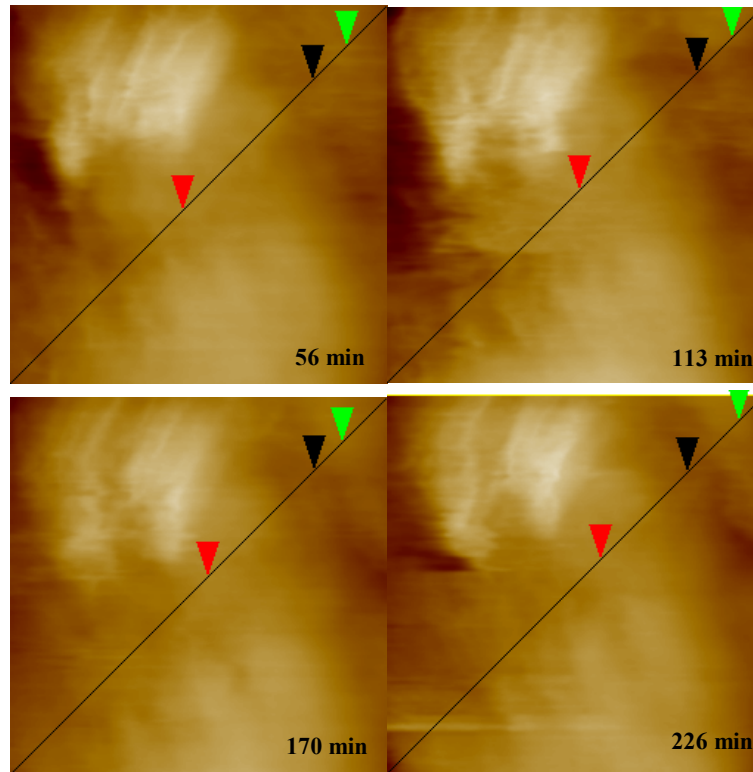


Figura 8.10 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 719 x 719 nm.

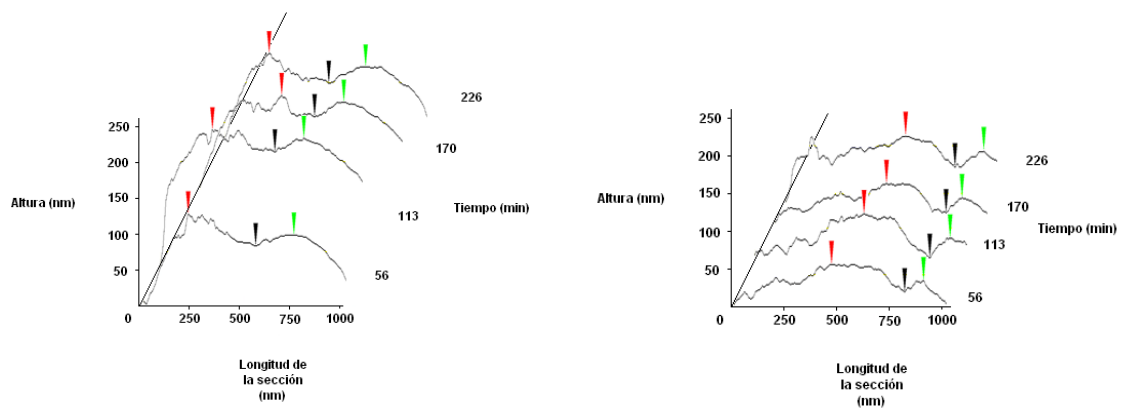


Figura 8.11 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

Tabla 8.3 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.

Tiempo transcurrido del experimento (min)	28	85	141	198
SECCIÓN 1				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	54.831	48.271	44.457	28.262
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	206.44	280.88	278.07	257
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	22.779	24.866	26.751	23.126
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	207.85	160.10	123.59	230.32
SECCIÓN 2				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	24.365	50.386	72.342	37.308
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	122.18	341.26	323.01	271.05
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	13.669	10.903	40.274	22.048
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	117.97	43.536	54.771	78.645
Rugosidad RMS (R_q) (nm)	26.023	31.670	37.189	24.529

Tabla 8.4 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.

Tiempo transcurrido del experimento (min)	56	113	170	226
SECCIÓN 1				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	44.711	31.417	30.06	42.056
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	337.05	311.77	164.31	297.73
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	15.540	18.782	21.152	23.578
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	191	144.65	146.06	183.97
SECCIÓN 2				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	37.159	59.055	39.480	42.276
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	348.29	313.18	283.68	235.94
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	14.491	26.810	20.248	21.762
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	89.880	96.902	75.837	137.63
Rugosidad RMS (R_q) (nm)	29.297	32.640	24.987	27.336

8.4 EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

La figura 8.12 muestra las imágenes que se obtuvieron de manera continua de un área de aproximadamente $1\mu\text{m}^2$ del cálculo renal. Se puede observar que en ellas se presentó un desplazamiento hacia arriba y a la derecha de la superficie a estudiar. Por lo tanto, se hizo un acercamiento en una zona que fuera común en todas las imágenes (marcada con un cuadro negro) para obtener superficies de $530 \times 530 \text{ nm}$; que fueron analizadas y comparadas entre sí.

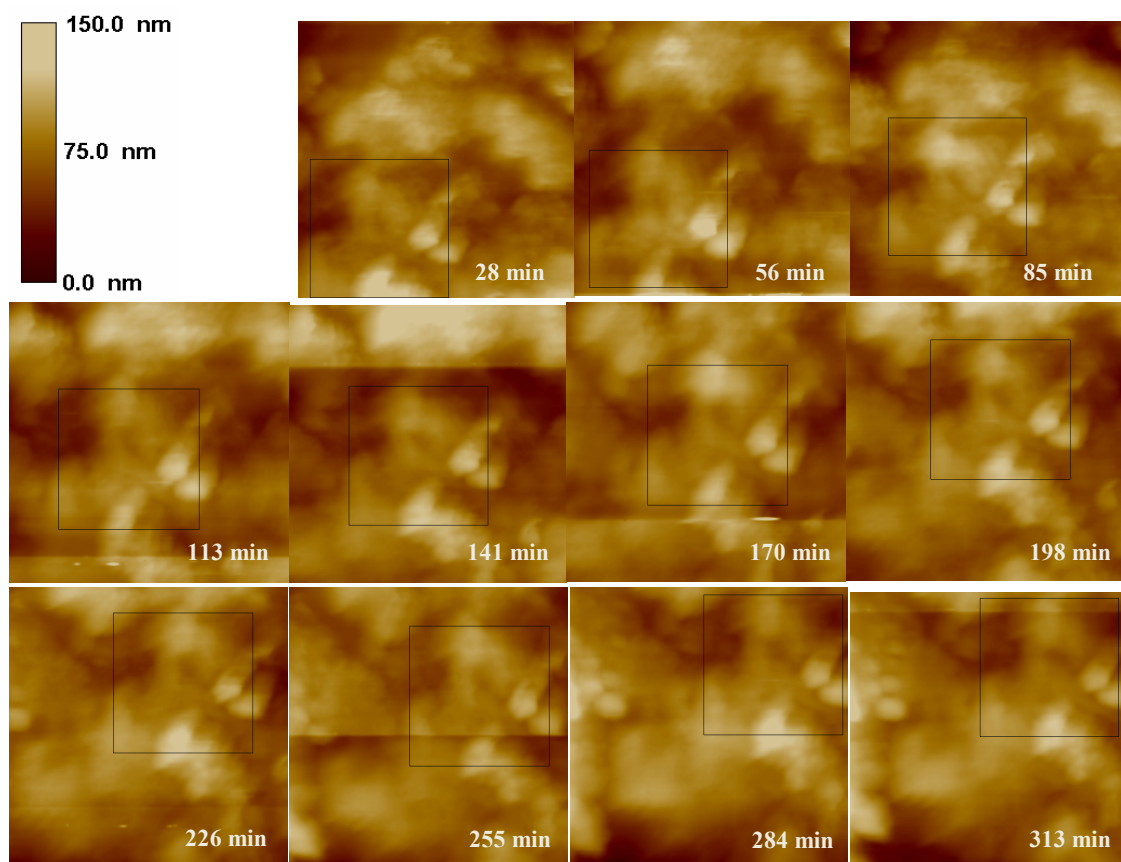


Figura 8.12 Imágenes de AFM obtenidas *in vitro* de la superficie del cálculo renal sumergido en Alopurinol. Dimensiones: $1.057 \times 1.057 \mu\text{m}$.

Las figuras 8.13 y 8.14, muestran de manera tridimensional las imágenes obtenidas con los acercamientos que serán analizadas como el Grupo A y B respectivamente.

Para caracterizar cada superficie de las imágenes y obtener datos útiles para conocer si se presentó un fenómeno de disolución, se sacaron dos cortes de sección

diagonal para cada grupo de imágenes, de acuerdo a la sección 6.2.5. Las figuras 8.15 a 8.17 muestran la Sección 1, la Sección 2 y los perfiles de cada sección respectivamente, para el Grupo A. Para el Grupo B, las figuras 8.18 y 8.19 muestran los cortes de Sección 1 y 2 respectivamente; y en la figura 8.20 se presentan los perfiles obtenidos.

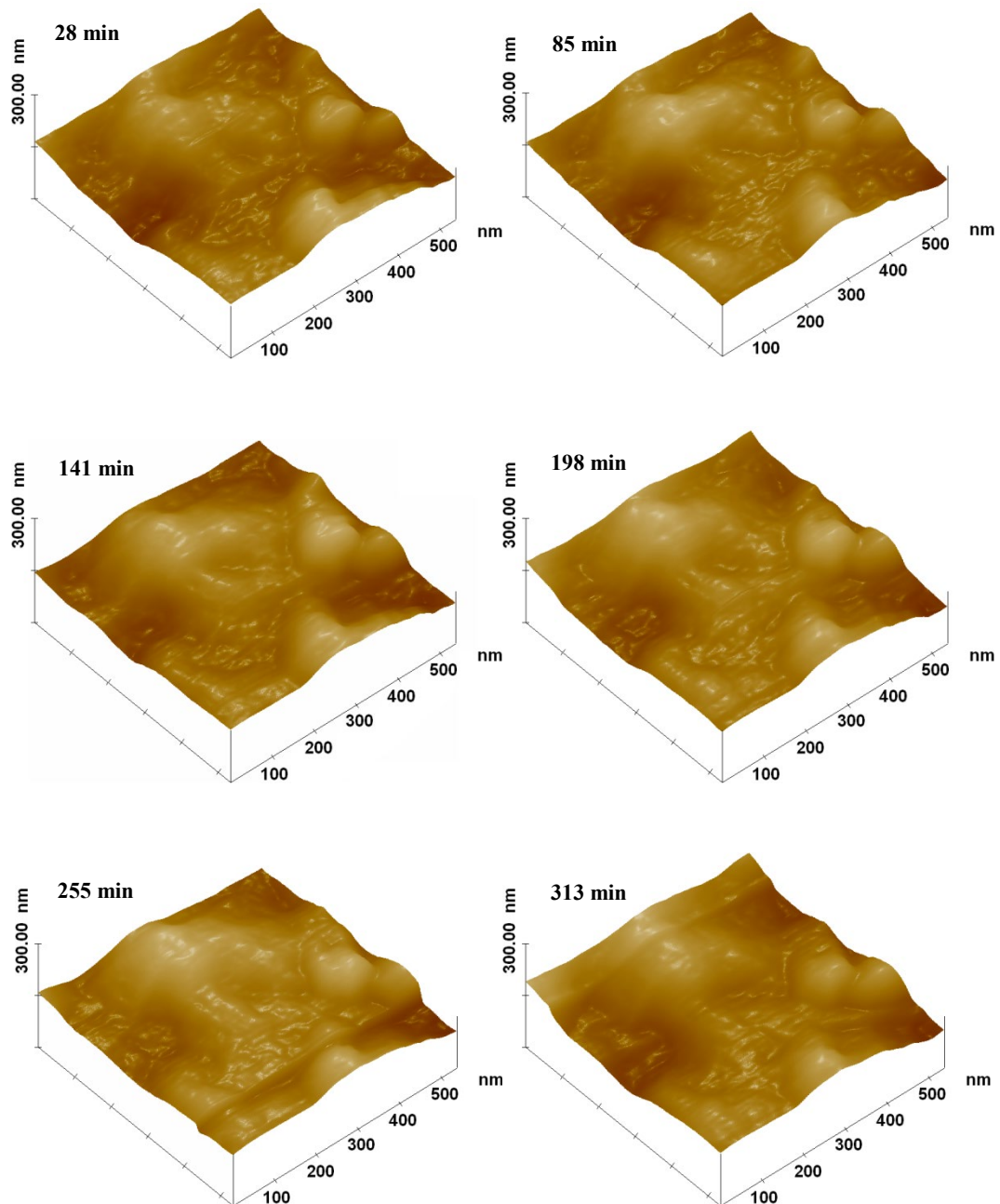


Figura 8.13 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 2. Dimensiones: 530 x 530 nm.

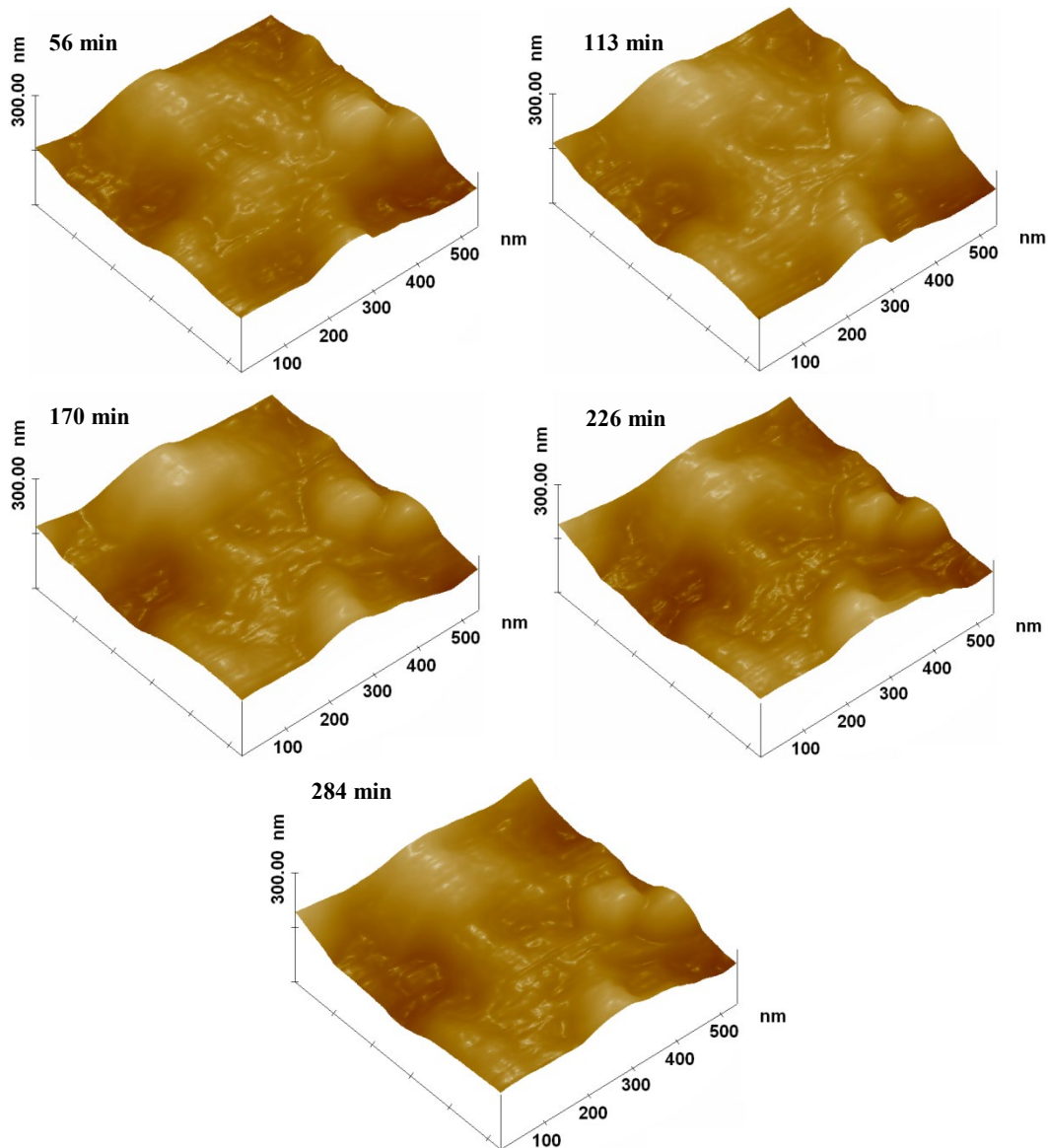


Figura 8.14 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 2. Dimensiones: 530 x 530 nm.

En cada perfil se pusieron 3 marcadores. El marcador negro (central), está sobre el punto más alto del perfil, mientras que los marcadores rojo (izquierdo) y verde (derecho) están sobre los puntos de menor altura a cada lado del marcador central.

Al comparar cada perfil de las secciones (figuras 8.17 y 8.20), se observa que aunque tienen una morfología similar, existen cambios significativos entre ellos indicando que la solución de Alopurinol afectó de alguna manera la superficie del cálculo renal. Se tomaron mediciones de la distancia entre los marcadores, la distancia que tienen con el extremo izquierdo de cada perfil (punto de referencia), la altura que hay desde el

marcador negro (punto más alto) y los marcadores rojo y verde; y la rugosidad superficial R_q de cada imagen (ver tabla 8.5 para el Grupo A y tabla 8.6 para el Grupo B).

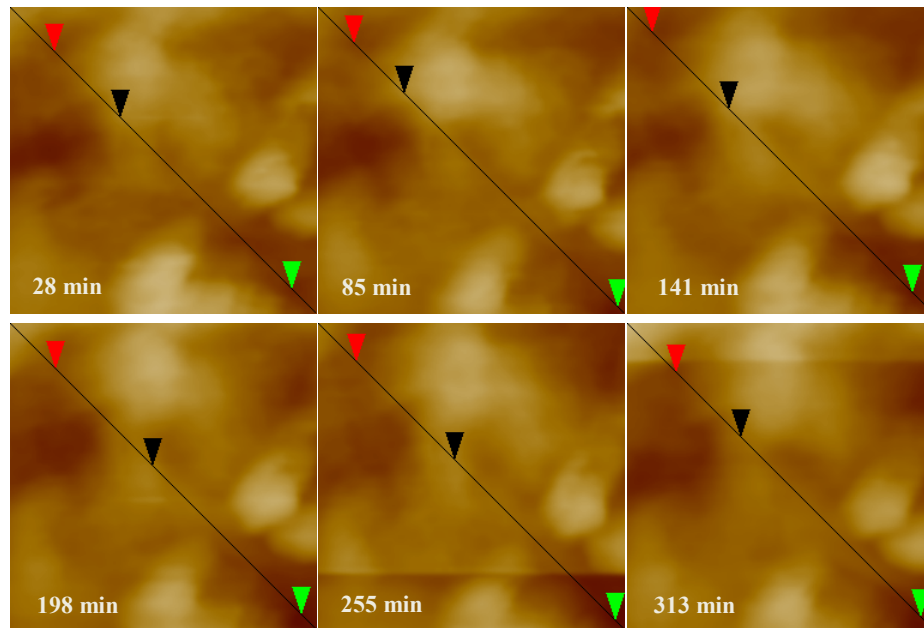


Figura 8.15 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm.

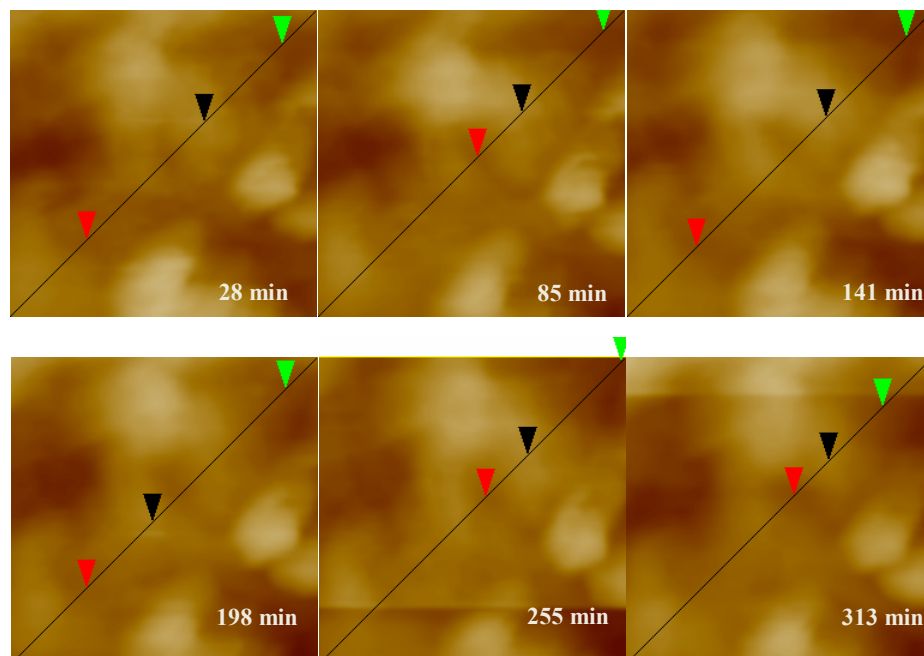


Figura 8.16 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm.

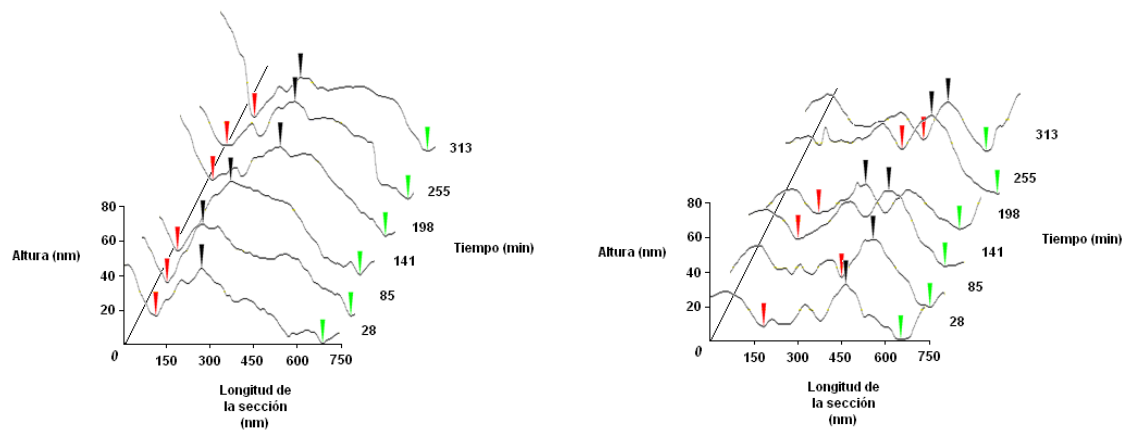


Figura 8.17 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

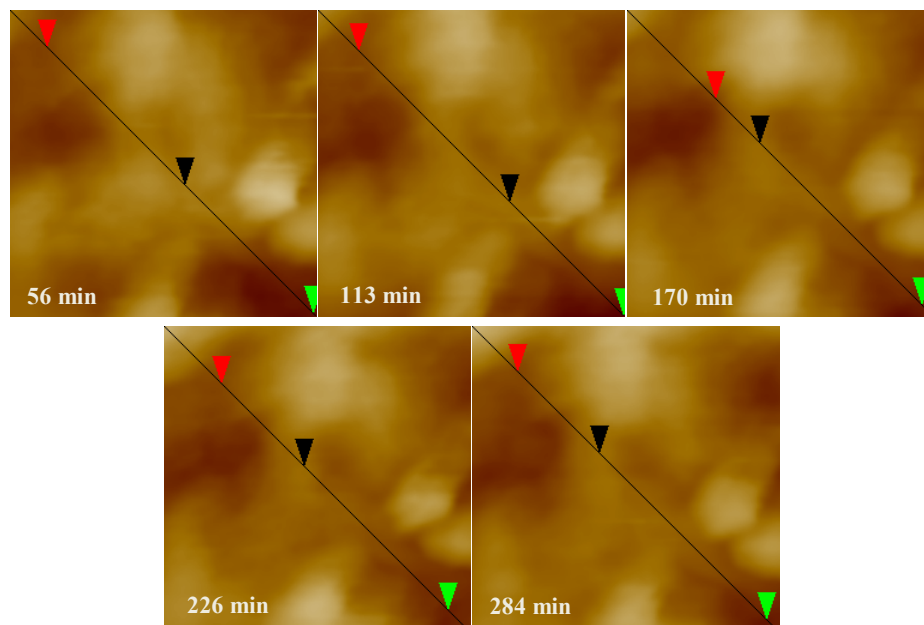


Figura 8.18 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm.

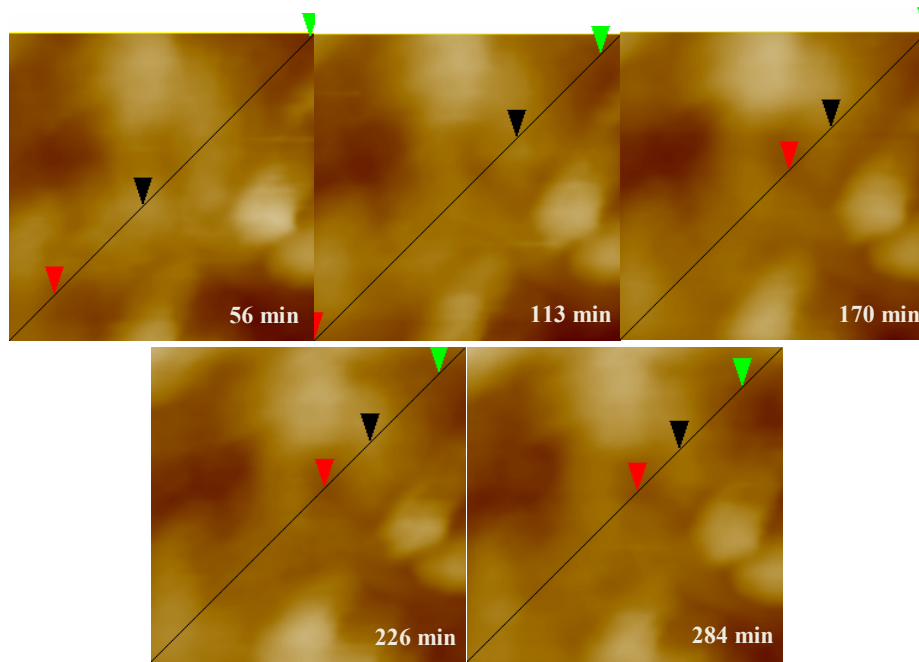


Figura 8.19 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más bajos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de mayor altura dentro de la sección. Dimensiones: 530 x 530 nm.

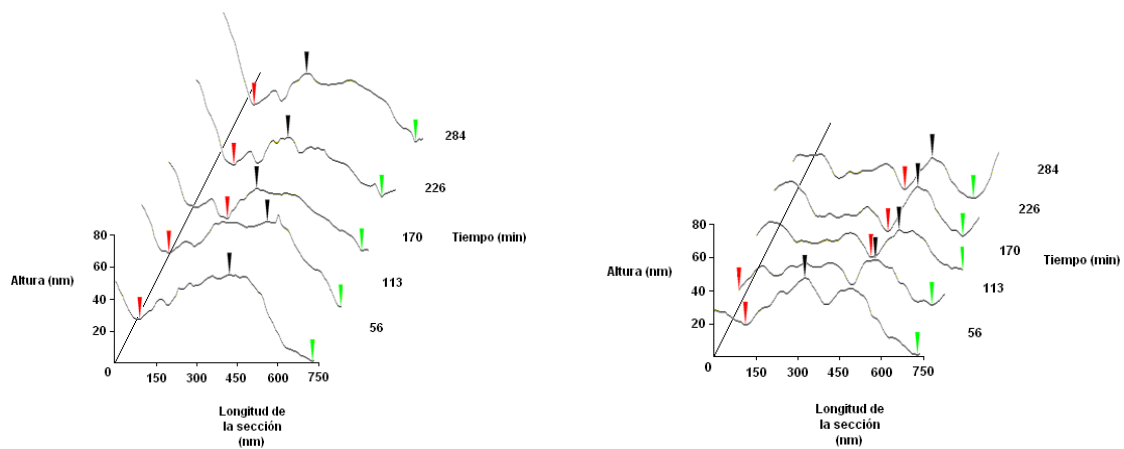


Figura 8.20 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

En algunos de los perfiles de la sección 1 (figuras 8.17 y 8.20), se observa en el extremo izquierdo, como la topografía superficial del cálculo sube, incluso elevándose por encima del marcador central que se tomó como punto máximo del perfil. Para fines prácticos, esa elevación no se tomó en cuenta al realizar las mediciones.

Tabla 8.5 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.

Tiempo de exposición al Alopurinol (min)	28	85	141	198	255	313
SECCIÓN 1						
Marcador rojo						
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	27.311	33.818	40.080	19.037	25.149	23.059
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	159.55	125.36	184.41	234.14	237.25	159.55
Marcador Verde						
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	43.215	52.927	53.904	51.382	55.744	42.324
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	420.62	516.97	448.59	364.68	393.69	440.31
SECCIÓN 2						
Marcador rojo						
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	24.445	21.674	27.989	16.800	19.370	21.636
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	284.90	109.82	314.95	162.65	101.53	83.917
Marcador Verde						
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	31.960	39.160	43.876	25.934	44.989	28.174
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	190.63	197.88	194.77	325.31	227.92	131.57
Rugosidad RMS (R_q) (nm)	15.015	14.213	15.988	15.132	14.547	15.800

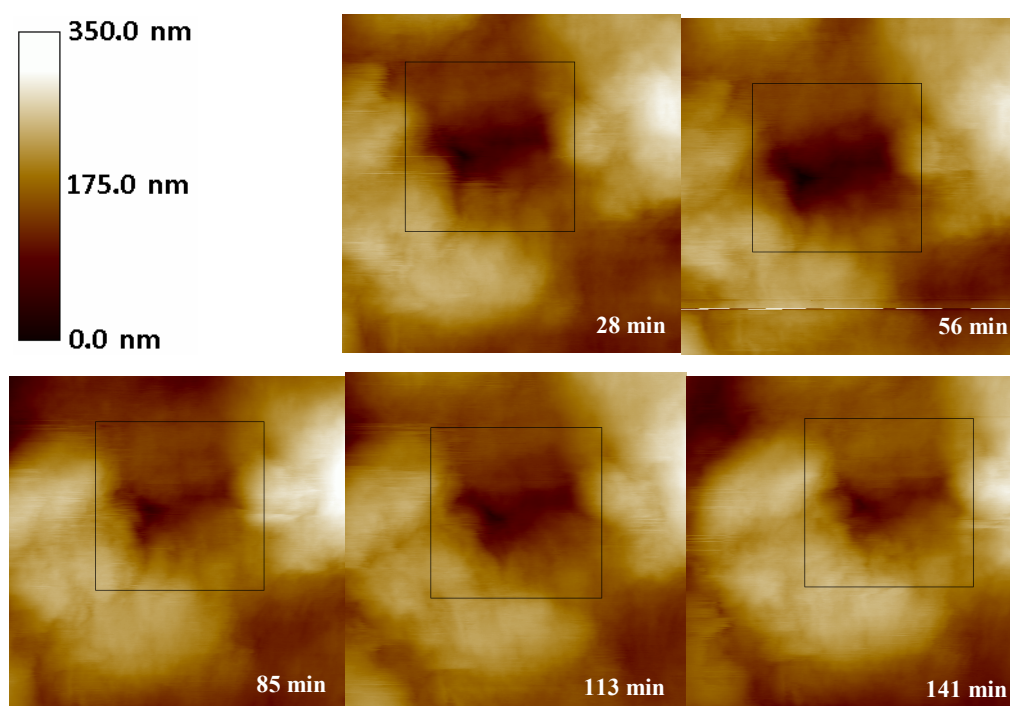
Tabla 8.6 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.

Tiempo de exposición al Alopurinol (min)	56	113	170	226	284
SECCIÓN 1					
Marcador rojo					
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	28.042	19.729	18.925	17.264	19.219
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	337.74	368.82	109.82	203.06	196.84
Marcador Verde					
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	53.909	53.189	38.928	36.902	42.430
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	312.88	275.58	393.69	351.21	408.19
SECCIÓN 2					
Marcador rojo					
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	28.261	18.131	16.204	26.684	19.028
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	215.49	495.21	101.53	108.78	99.457
Marcador Verde					
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	46.135	27.311	23.640	29.620	24.588
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	409.23	205.13	231.03	163.69	149.19

Rugosidad RMS (R_q) (nm)	16.190	15.450	15.697	15.482	15.054
------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

8.5 EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.

La figura 8.21 muestra las imágenes que se obtuvieron de manera continua de una superficie del cálculo renal de $1.162 \times 1.162 \mu\text{m}$ del cálculo. Se puede observar que aunque fueron obtenidas sin mover manualmente la punta de AFM, no muestran exactamente el mismo sitio; por lo tanto, se hizo un acercamiento (marcado con un cuadro) en una zona que fuera común en todas las imágenes obteniendo superficies de $583.5 \times 583.5 \text{ nm}$.



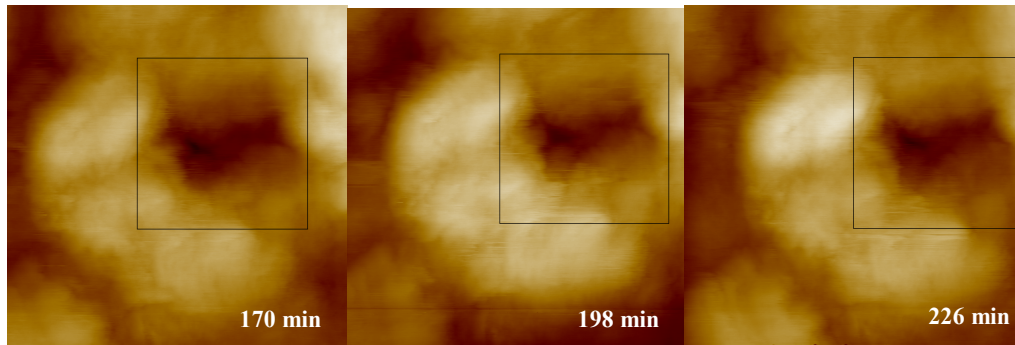


Figura 8.21 Imágenes de AFM obtenidas *in vitro* de la superficie del cálculo renal sumergida en Ácido Cítrico. Dimensiones: 1.162 x 1.162 μm .

Las figuras 8.22 y 8.23, muestran de manera tridimensional las imágenes obtenidas con los acercamientos que serán analizadas como el Grupo A y B respectivamente.

Para caracterizar cada superficie de las imágenes y obtener datos útiles para conocer si se presentó un fenómeno de disolución, se sacaron dos cortes de sección diagonal para cada grupo de imágenes, de acuerdo a la sección 6.2.5. Las figuras 8.24 a 8.26 muestran la Sección 1, la Sección 2 y los perfiles de cada sección respectivamente, para el Grupo A. Para el Grupo B, las figuras 8.27 y 8.28 muestran los cortes de Sección 1 y 2 respectivamente; y en la figura 8.29 se presentan los perfiles obtenidos.

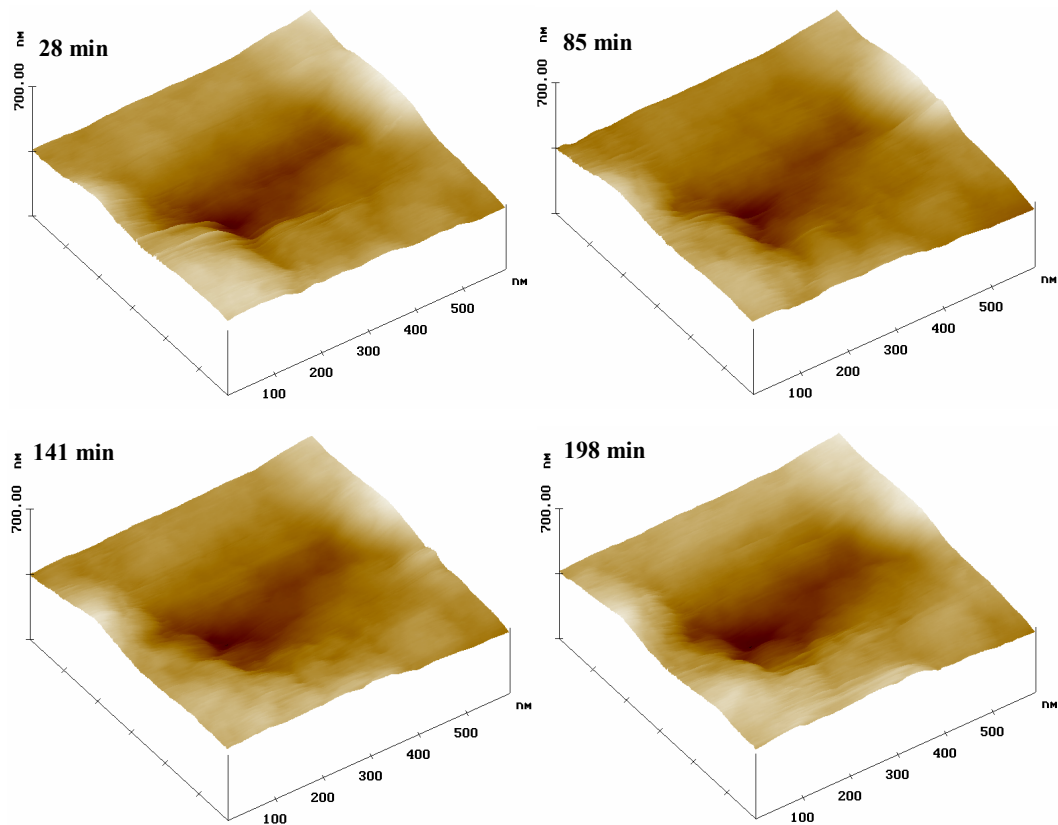


Figura 8.22 Imágenes 3D de AFM para el Grupo A del experimento 3. Dimensiones: 583.5 x 583.5 nm.

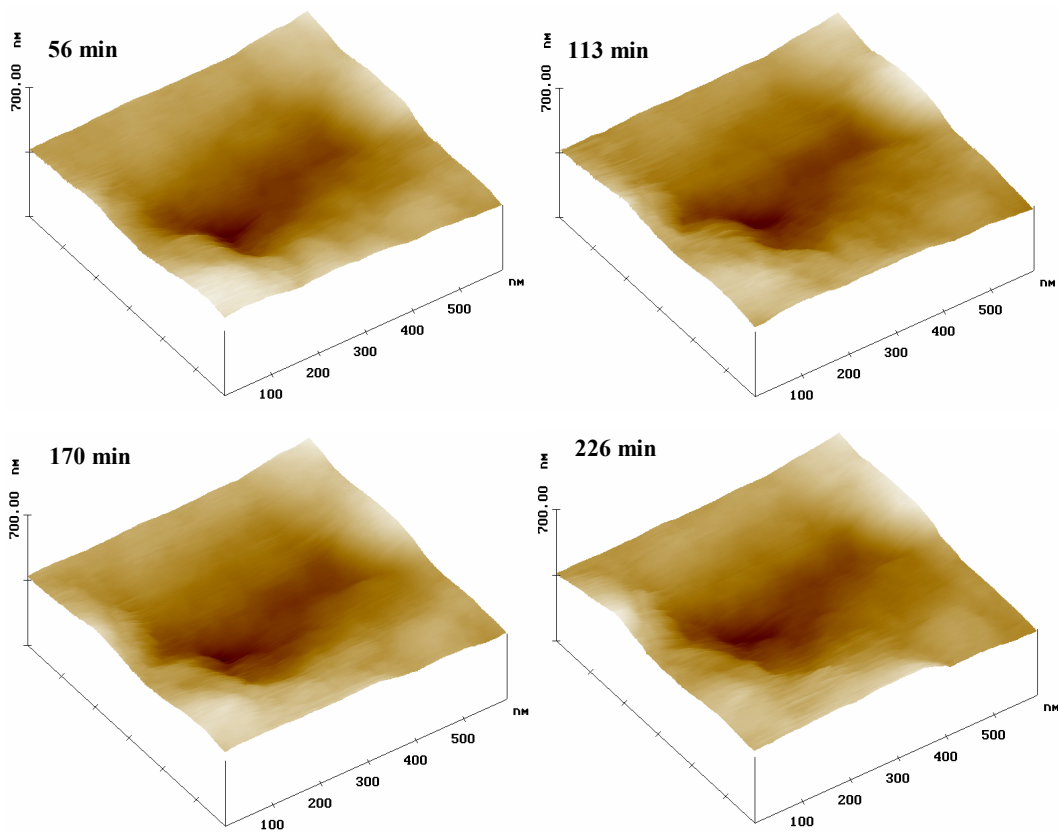


Figura 8.23 Imágenes 3D de AFM para el Grupo B del experimento 3. Dimensiones: 583.5 x 583.5 nm.

En cada sección se pusieron 3 marcadores. El marcador negro (central), está sobre el punto más bajo del perfil, mientras que los marcadores rojo (izquierdo) y verde (derecho) están sobre los puntos de mayor altura a cada lado del marcador central.

Al comparar cada perfil de las secciones (figuras 8.26 y 8.29), se observa que existen algunos cambios entre ellos indicando que durante el experimento si se presentó una disolución de alguna manera en la superficie del cálculo renal.

Se tomaron mediciones de la distancia entre los marcadores (tomando como referencia el marcador negro), la altura que hay desde el marcador negro (punto más bajo) y los marcadores rojo y verde; y la rugosidad superficial R_q de cada imagen. Las tablas 8.7 (Grupo A) y 8.8 (Grupo B), muestran los datos obtenidos.

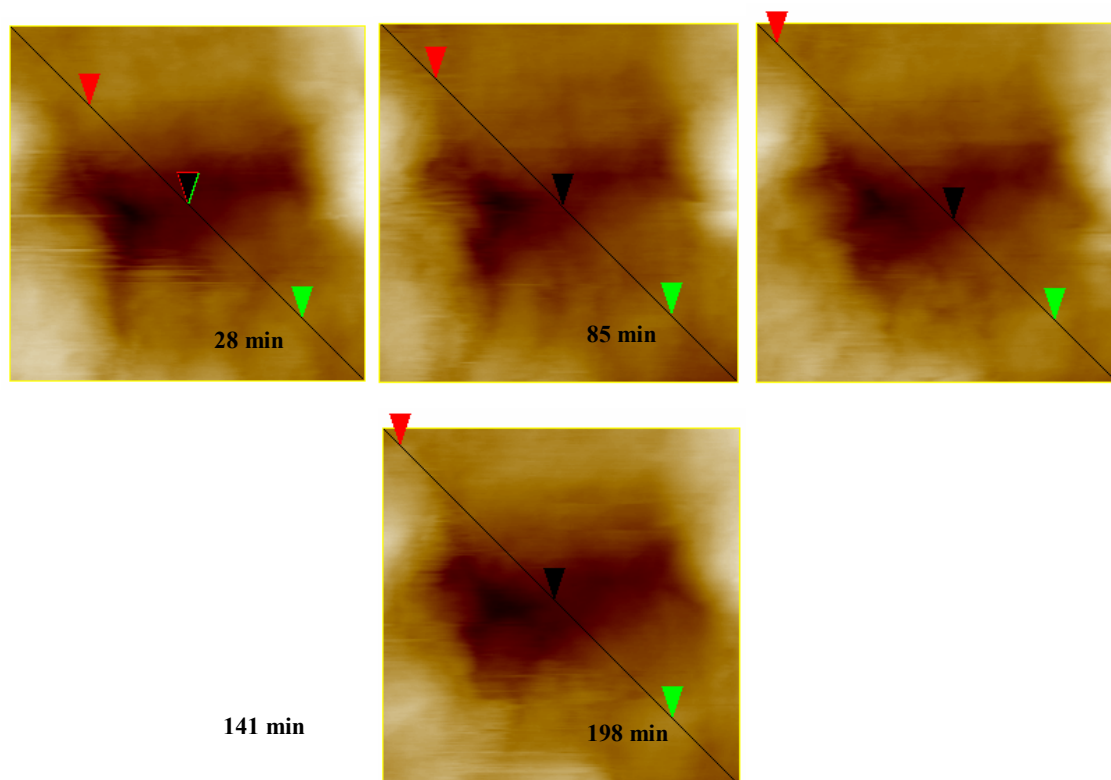


Figura 8.24 Sección 1 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm.

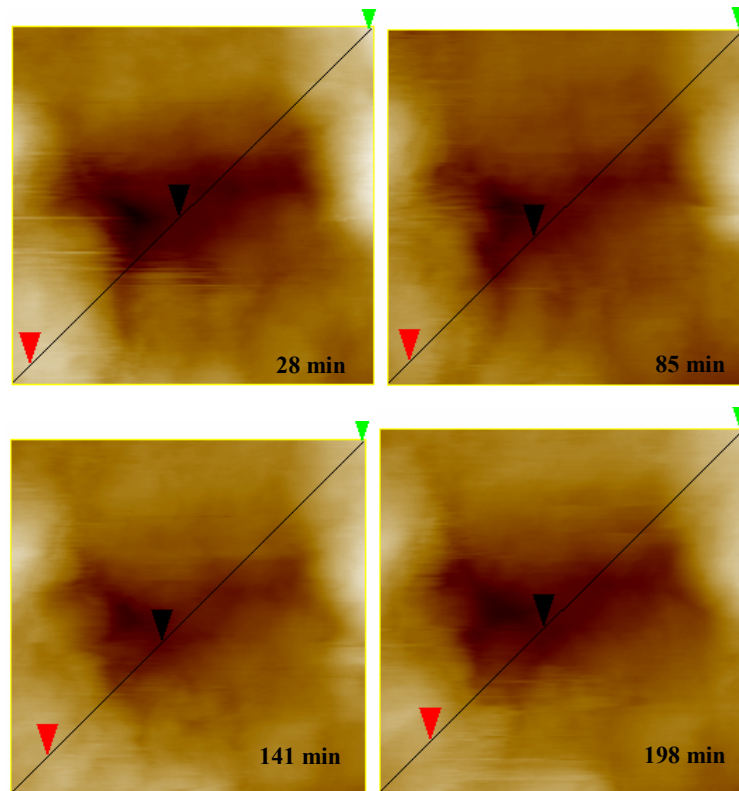


Figura 8.25 Sección 2 de las imágenes del Grupo A. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm.

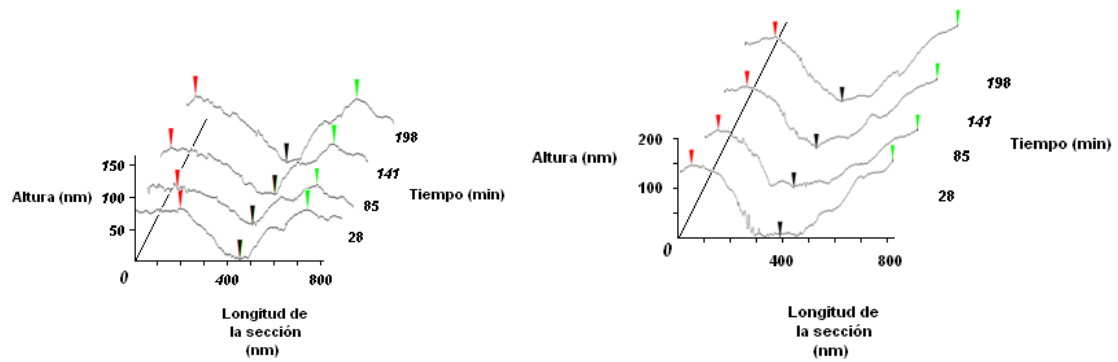


Figura 8.26 Perfiles de las imágenes del Grupo A. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

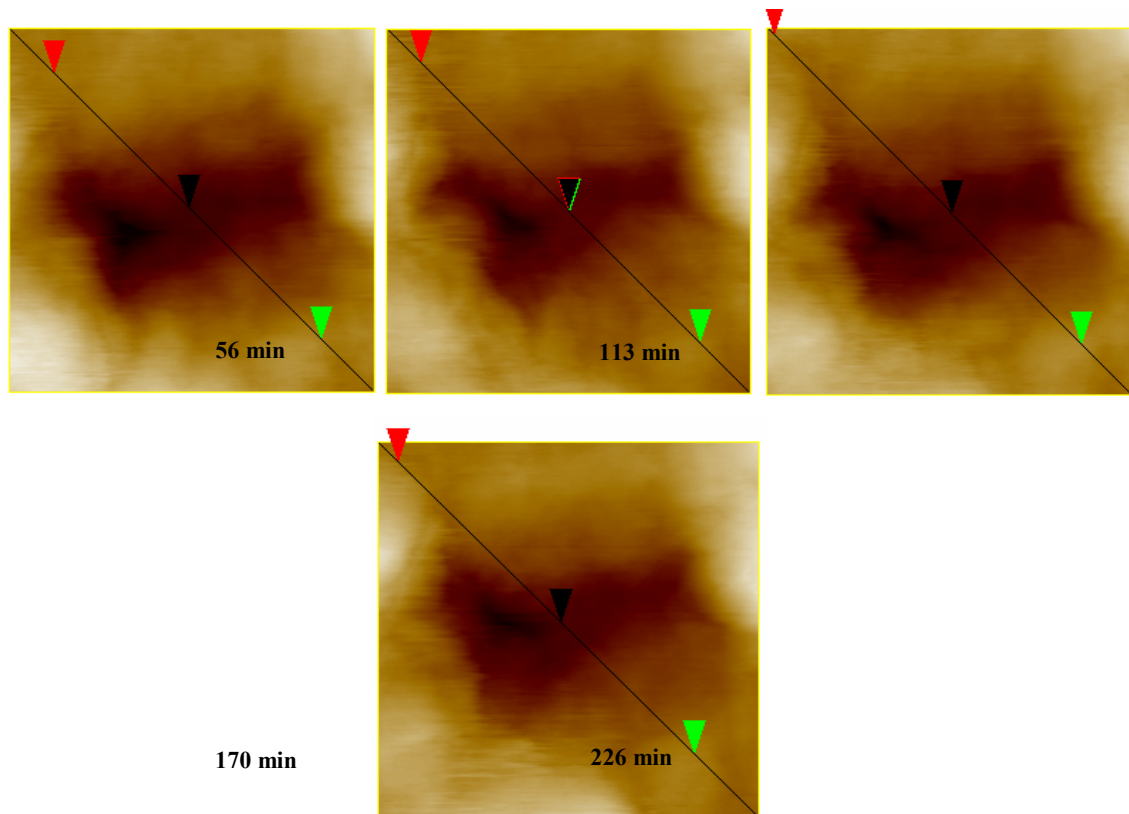


Figura 8.27 Sección 1 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm.

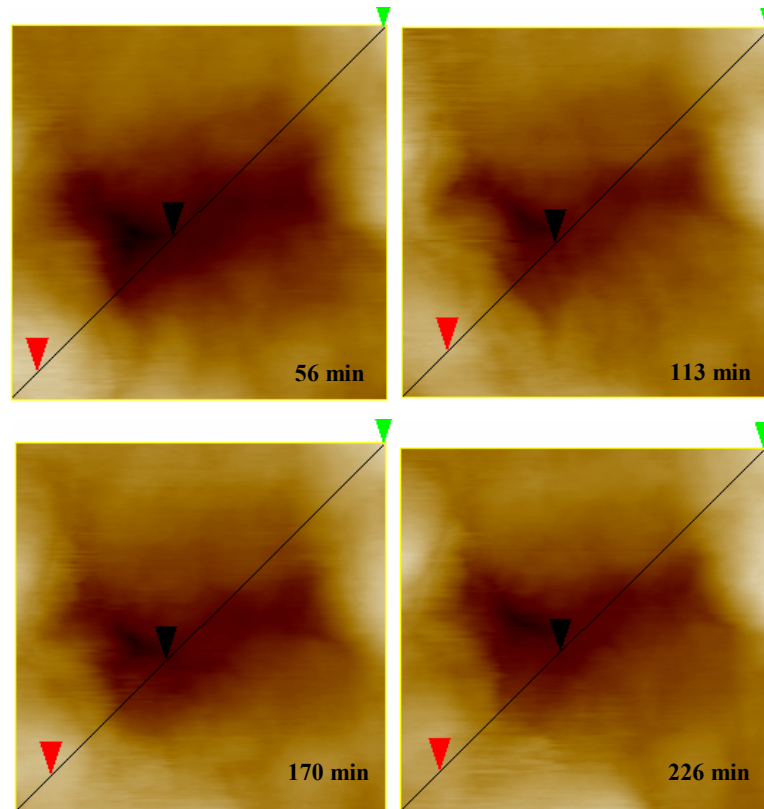


Figura 8.28 Sección 2 de las imágenes del Grupo B. Se muestran 3 marcadores: el rojo (izquierdo) y el verde (derecho) están sobre los puntos más altos del perfil; el negro (centro) indica el lugar de menor altura dentro de la sección. Dimensiones 583.5 x 583.5 nm.

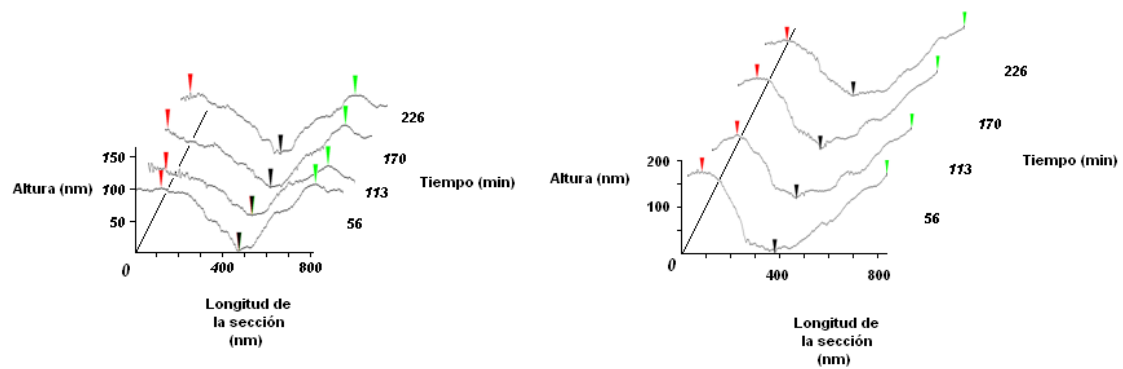


Figura 8.29 Perfiles de las imágenes del Grupo B. En la izquierda se presentan los correspondientes a la sección 1 y a la derecha la sección 2.

Tabla 8.7 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo A.

Tiempo de exposición al Ácido Cítrico (min)	28	85	141	198
SECCIÓN 1				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	83.927	58.568	78.17	110.44
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	231.34	291.74	404.56	355.56
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	81.33	66.20	84.45	105.87
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	263.25	250.72	230.20	274.65
SECCIÓN 2				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	152.75	122.82	132.29	139.13
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	339.61	289.46	265.53	256.41
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	162.10	123.59	148.60	163.64
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	433.06	476.36	467.24	445.59
Rugosidad RMS (R_q) (nm)	38.06	31.89	33.56	38.50

Tabla 8.8 Datos extraídos a partir de las imágenes del Grupo B.

Tiempo de exposición al Ácido Cítrico (min)	56	113	170	226
SECCIÓN 1				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	105.68	72.00	97.68	101.32
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	304.28	335.05	402.29	353.28
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	112.64	82.43	104.07	97.93
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	298.58	296.30	292.88	291.74
SECCIÓN 2				
Marcador rojo				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	185.28	144.25	163.50	125.38
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	296.30	242.74	258.69	271.23
Marcador Verde				
Altura entre el punto máximo y el mínimo (nm)	179.10	161.50	181.75	159.41
Distancia entre el punto máximo y el mínimo (nm)	461.55	474.08	482.06	456.99
Rugosidad RMS (R_q) (nm)	42.62	34.48	38.68	38.03

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1 EXPERIMENTO 1. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Té de Cola de Caballo (*Equisetum Arvense*)

Con base en las imágenes de altura y su rugosidad superficial, se hizo un análisis cuantitativo de los cambios en la rugosidad R_q (RMS) de la superficie (tabla 9.1), con la finalidad de estudiar el efecto de disolución que se haya presentado. Se puede observar que la rugosidad de la superficie primero aumenta (figura 9.1a); esto indica que la superficie del cálculo es más irregular después de 4 horas de tratamiento que al inicio del experimento, lo que podría indicar la fractura de grandes partículas de la superficie ocasionando la generación de hoyos profundos a una velocidad promedio de disolución de aproximadamente de 15 nm / hr. La rugosidad decrece después de 8 horas de tratamiento a una velocidad promedio de disolución de 19 nm / hr, indicando un aplanamiento de la superficie que se puede deber al desprendimiento de partículas que sobresalían en la topografía de la superficie. Después se repite este fenómeno de disolución al ir aumentando nuevamente la rugosidad después de 27 horas de tratamiento con el té de cola de caballo a una velocidad promedio de 3.5 nm / hr.

De acuerdo a la sección 6.1.3, se calcularon los cambios ocasionados a la rugosidad superficial del cálculo debido a su exposición al té de cola de caballo y se obtuvo el valor de la rugosidad acumulada en el tiempo (tabla 9.1, figura 9.1b)

Tabla 9.1 Cálculo de los cambios de la rugosidad de la superficie del cálculo renal en el tiempo de exposición al té de cola de caballo.

Exposición del cálculo renal al té	R_q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R_q (RMS) (nm)	R_q Acumulada (nm)
Sin tratamiento	42.188	0	42.188
4 hr	102.13	59.942	102.13
8 hr	25.809	76.321	178.451
11.5 hr	36.652	10.843	189.294
27 hr	92.635	55.983	245.277

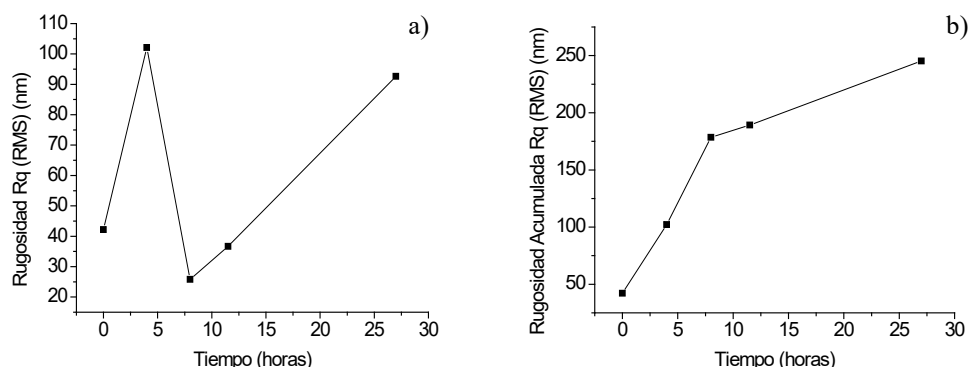


Figura 9.1 Gráficas de la rugosidad R_q (a) y de la tendencia de la rugosidad acumulada en el tiempo de R_q (b), para la superficie del cálculo renal tratado con té de cola de caballo.

9.2 EXPERIMENTO 2. Metodología empleada: AFM en aire. Sustancia de prueba: Alopurinol

En las imágenes de la figura 8.2 se puede observar de manera cualitativa que después de un tiempo prolongado de exposición al alopurinol, las partículas superficiales del cálculo se fracturan. Al principio del experimento y después de 1 hr y 20 min, la superficie está formada por partículas de mayor tamaño que después de 64 horas de exposición de la piedra al alopurinol; mostrando efectos disolutivos de la sustancia de prueba en este cálculo renal en particular.

Para describir mejor el fenómeno de disolución observado, se hizo un análisis cuantitativo (de acuerdo a la sección 6.1.3) de los cambios presentes en la topografía y rugosidad superficial del cálculo renal con forme pasó el tiempo de exposición a la solución de alopurinol y se obtuvo el valor de la rugosidad acumulada en el tiempo (tabla 9.2).

Tabla 9.2 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol	R_q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R_q (RMS) (nm)	R_q Acumulada (nm)
Sin tratamiento	62.291	0	62.291
1 hr 20 min	97.743	35.452	97.743
64 hr	56.364	41.379	139.122

Se puede ver que la rugosidad primero aumenta, indicando que la superficie es más irregular después de 1 hora y 20 minutos de exposición al alopurinol (figura 9.2);

esto puede deberse, a la formación de hoyos profundos en la superficie ocasionados por el desprendimiento de partículas a una velocidad aproximada de 26.6 nm / hr. Después de un tiempo de 64 horas de exposición a la sustancia, se observó un aplanamiento en la topografía del cálculo al haber una disminución de la rugosidad superficial a una velocidad promedio de 0.65 nm / hr (figura 9.2); posiblemente debido a la continua fractura de las partículas de la superficie y el desprendimiento de aquellas que sobresalen por encima de las demás.

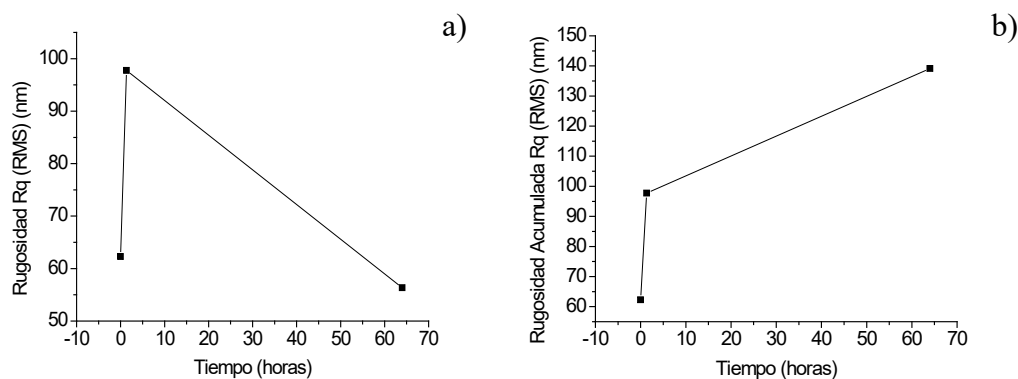


Figura 9.2 Gráficas de la rugosidad R_q (a) y de la rugosidad acumulada en el tiempo de R_q (b), para la superficie del cálculo renal tratado con Alopurinol.

9.3 EXPERIMENTO 3. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

9.3.1 Análisis de Rugosidad

Este análisis se basa en los cambios presentes en la topografía y rugosidad superficial del cálculo renal conforme pasó el tiempo de exposición a la solución de Alopurinol. Para cada grupo de estudio, se obtuvo el valor de la rugosidad acumulada en el tiempo, que es la suma acumulativa de dichos cambios (Grupo A tabla 9.3, Grupo B tabla 9.4).

Se graficaron las mediciones de la rugosidad R_q para cada grupo de estudio (figura 9.3). En las gráficas se observa que el comportamiento de disolución con base en la rugosidad varía de un grupo a otro.

Cuando la rugosidad disminuye, indica un aplanamiento en la topografía del cálculo posiblemente debida a la continua fractura de las partículas de la superficie y el desprendimiento de aquellas que sobresalen por encima de las demás. Cuando la

rugosidad aumenta, indica que la topografía del cálculo renal se vuelve más irregular debido a la formación de hoyos en su superficie.

Tabla 9.3 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
28	26.023	0	26.023
85	31.670	5.647	31.670
141	37.189	5.519	37.189
198	24.529	12.66	49.849

Tabla 9.4 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
56	29.279	0	29.279
113	32.640	3.361	32.640
170	24.987	7.653	40.293
226	27.336	2.349	42.642

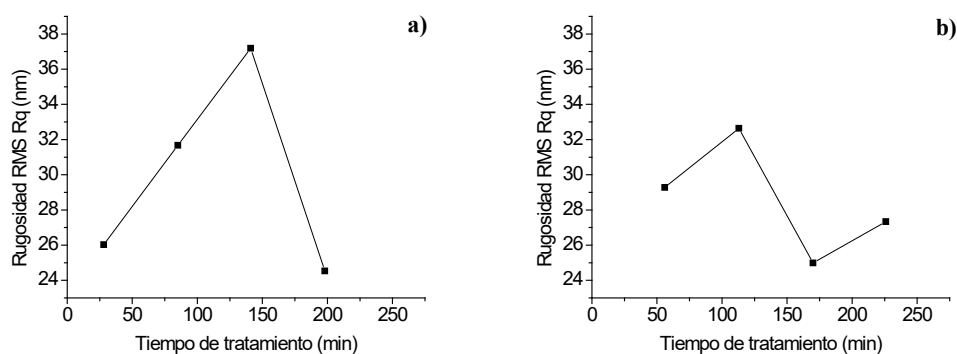


Figura 9.3 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.

También se graficó la rugosidad R_q acumulada que se calculó para cada grupo de estudio. En la figura 9.4 se muestran estas gráficas donde se observa una tendencia lineal para el fenómeno de disolución en ambos grupos de estudio mostrando que la rugosidad superficial varía constantemente, pudiendo significar que este fenómeno se efectúa de manera continua.

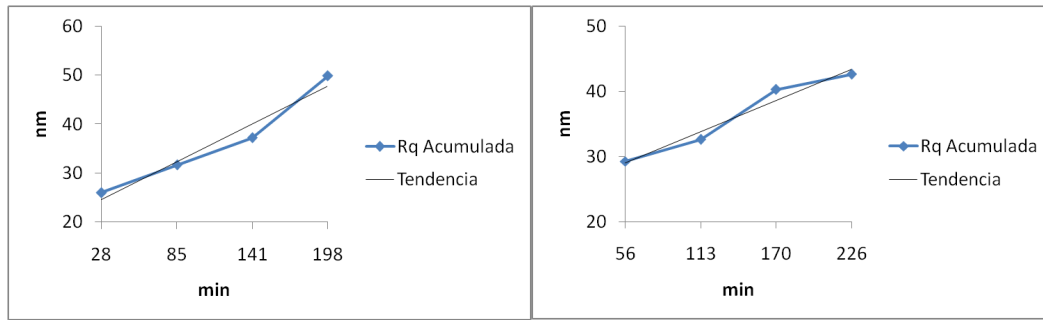


Figura 9.4 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).

Las funciones lineales (tendencias) que describen estos comportamientos son:

$$\text{Grupo A} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.1358 t + R_{qi} - 5.1982$$

$$\text{Grupo B} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.0842 t + R_{qi} - 4.9529$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

Estos comportamientos de disolución se interpolaron para encontrar una función que pudiera describir de manera general el fenómeno de disolución de acuerdo a los cambios en la rugosidad superficial medidos en todas las imágenes (figura 9.5); y se comparó con las rugosidades R_q acumuladas para ilustrar como esa función describe un comportamiento lineal de la disolución de la superficie de este cálculo renal en particular ocasionada por las sustancias de prueba (figura 9.6).

Este fenómeno de disolución en base a la rugosidad R_q se describe con la función lineal (línea verde figuras 9.5 y 9.6):

$$R_q \text{ acumulada} = 0.11t + R_{qi} - 5.0755$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

De este análisis también se puede determinar que la rugosidad superficial RMS varía a una velocidad aproximada de 0.11 nm/min; la cual, sería la velocidad que presenta el fenómeno de disolución debida a la solución de Alopurinol para esta región estudiada en particular del cálculo renal.

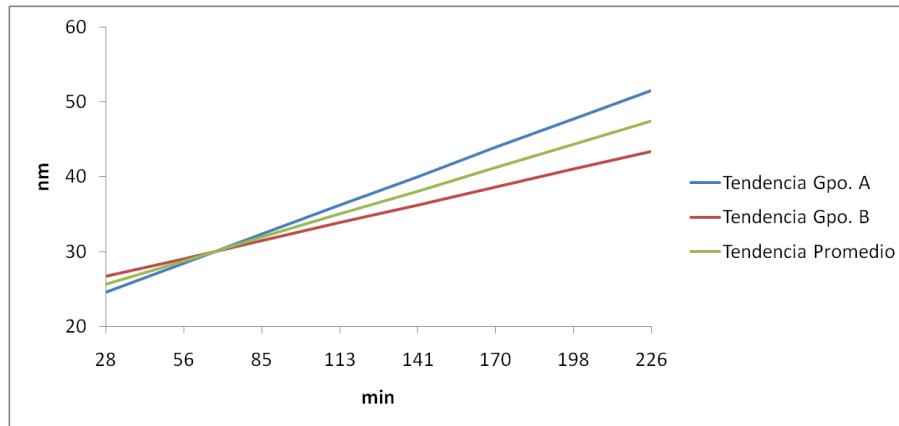


Figura 9.5 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.

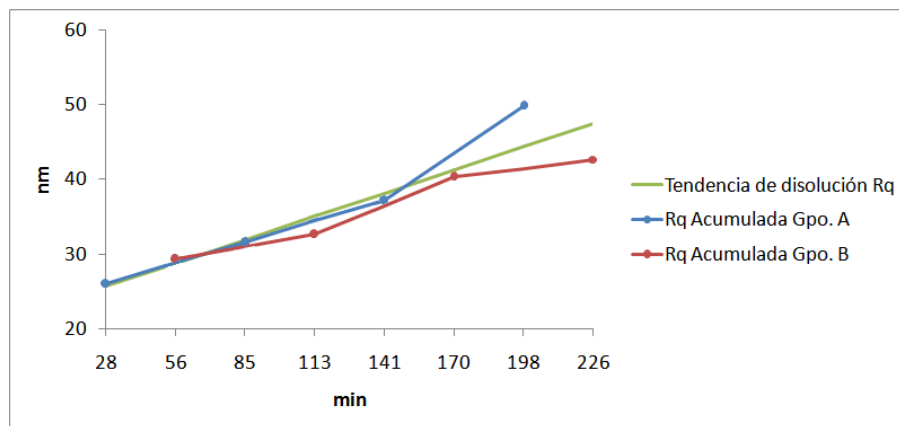


Figura 9.6 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.

9.3.2 Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección

Se acomodaron los perfiles de cada sección de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.6. En la figura 9.7 están los perfiles obtenidos para la Sección 1 de las imágenes del Grupo A y se estimó la altura que hay para cada marcador entre el inicio y el final del experimento. La figura 9.8 muestra los perfiles y las mediciones para la Sección 2 del Grupo A. Las figuras 9.9 y 9.10 muestran el arreglo para los perfiles de la Sección 1 y la Sección 2 del Grupo B, respectivamente.

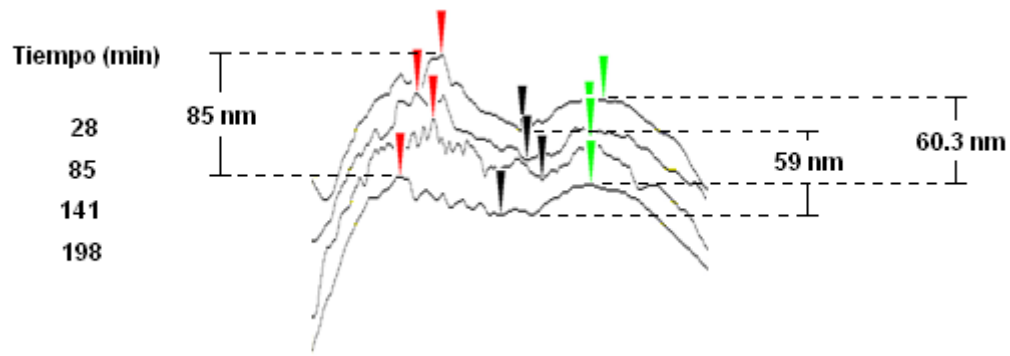


Figura 9.7 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.

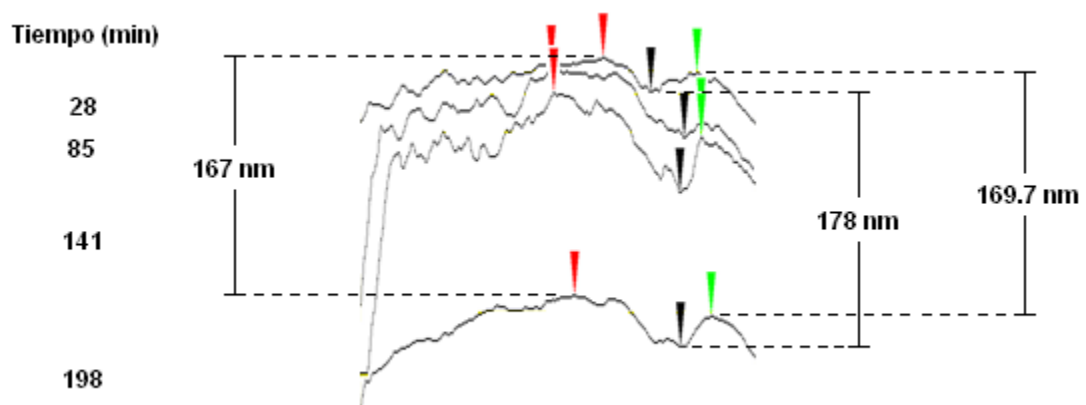


Figura 9.8 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.

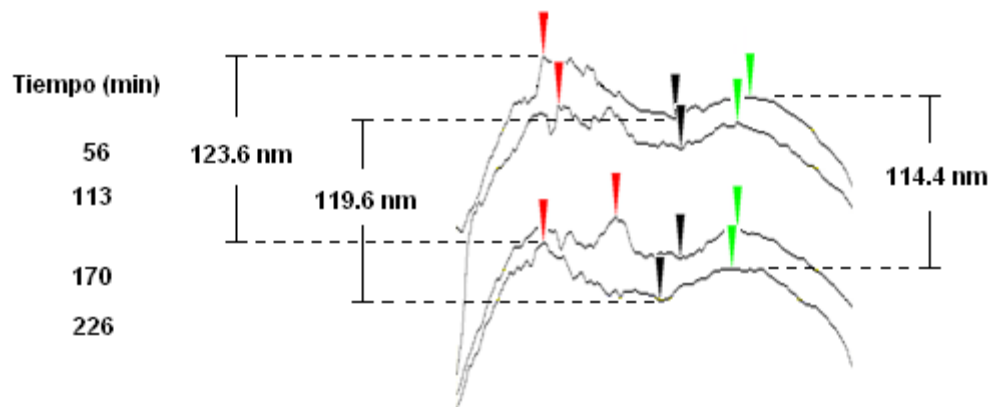


Figura 9.9 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.

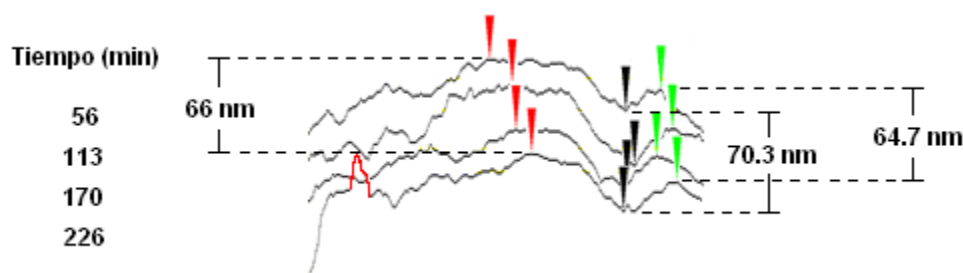


Figura 9.10 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.

Con el tiempo de duración de cada experimento (Grupos A y B con duración de 170 min. cada uno) y las alturas medidas para cada arreglo de los perfiles, se calcularon las velocidades promedio de disolución para cada marcador (ver tabla 9.5).

En conjunto el proceso se lleva a cabo a velocidades similares en los 3 marcadores de cada perfil, aunque no es una disolución que se presente de manera homogénea en toda la superficie, ya que hay variaciones significativas entre los 2 conjuntos de perfiles pertenecientes a cada grupo de estudio. También se obtuvieron las velocidades promedio de disolución para cada grupo de estudio que posteriormente serán comparadas con las resultantes de los demás experimentos.

Tabla 9.5 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con alopurinol.

Perfiles estudiados	Velocidad Promedio de Disolución por Marcador (nm/min)			Promedio de cada sección
	Rojo (izquierdo)	Negro (central)	Verde (derecho)	
Grupo A. Duración del experimento: 170 min				
Sección 1	0.50	0.35	0.36	0.40
Sección 2	0.98	1.05	0.99	1.01
Promedio del Grupo A				0.71
Grupo B. Duración del experimento: 170 min				
Sección 1	0.73	0.70	0.67	0.70
Sección 2	0.39	0.41	0.38	0.39
Promedio del Grupo B				0.55

9.3.3 Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura

Se graficaron las mediciones de altura entre los puntos máximos y mínimos para cada sección de ambos grupos de acuerdo a la sección 6.2.6 (figuras 9.11-9.14). Cada gráfica representa la disolución vertical de la superficie del cálculo renal que se haya observado en los perfiles. Cada segmento ascendente representa un aumento en la altura indicando una mayor disolución en el punto más bajo de la superficie del perfil (marcador central); cuando la pendiente es descendente, indica una mayor disolución de los puntos más bajos dentro del perfil (marcador derecho e izquierdo).

En el caso de la Sección 1 del Grupo A (figura 9.11), se ve que ambas zonas siguen diferentes tendencias de disolución. Para el caso donde las alturas fueron medidas entre el marcador central y el rojo (izquierdo) (figura 9.11a), se observa durante todo el experimento que la mayor disolución se presentó en el punto de máxima altura. En la figura 9.11b, se ve que primero se tiende a disolver el fondo de la superficie y después la disolución se presenta en el punto alto. En la sección 2 del grupo A (figura 9.12), también se ve un comportamiento que presenta variaciones.

Para explicar de manera global el fenómeno de disolución vertical observado en las imágenes del Grupo A, se describe en la tabla 9.6 en qué lugar del perfil de la superficie se presentó una mayor disolución para cada intervalo de tiempo. Cada zona está delimitada entre el marcador central (partícula más baja) y alguno de los otros marcadores que indican las partículas más sobresaliente de cada perfil; con respecto al marcador izquierdo de la Sección 1 se le llamará Z1; con el marcador derecho de la sección 1 está la zona Z2; Z3 es la zona hacia el marcador izquierdo de la Sección 2 y Z4 es con respecto al marcador derecho de la Sección 2. Tomando como referencia el comportamiento en Z1, se puede ver que no sigue una misma secuencia la disolución en los diferentes puntos medidos en la superficie y se resaltan en la tabla aquellos que presentaron diferencias.

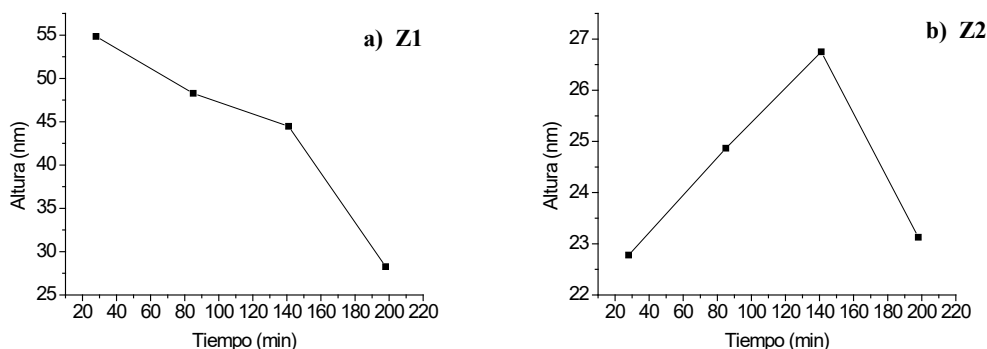


Figura 9.11 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A.

a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

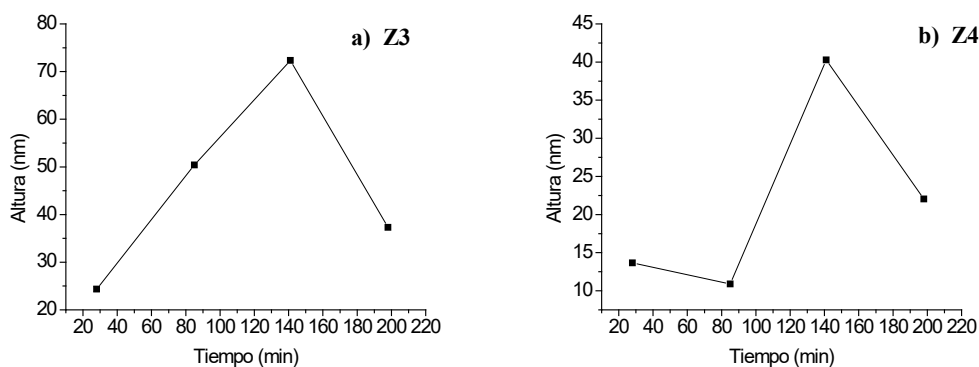


Figura 9.12 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A.

a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

Tabla 9.6 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
28-85	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior
85-141	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
141-198	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior

De la misma manera se analizó las gráficas producidas a partir de los datos del Grupo B (figuras 9.13 y 9.14). En la tabla 9.7 se describe el proceso de disolución observado en las 4 zonas de estudio. Se puede ver que igual que para el grupo A, cada zona tiene un comportamiento de disolución diferente.

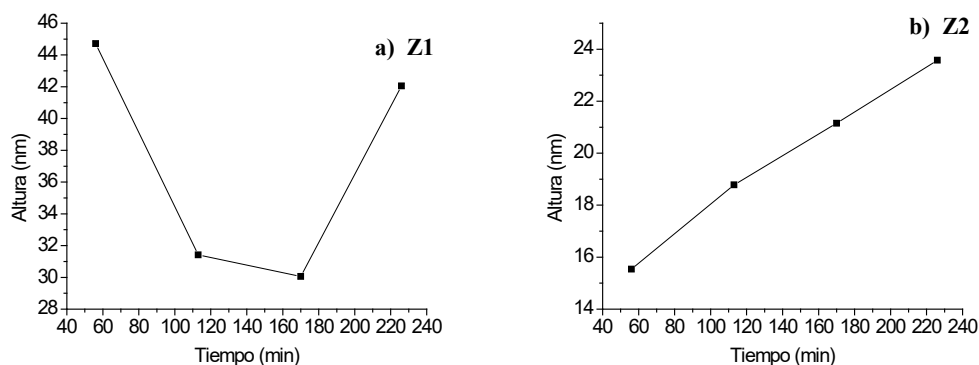


Figura 9.13 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B.

a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

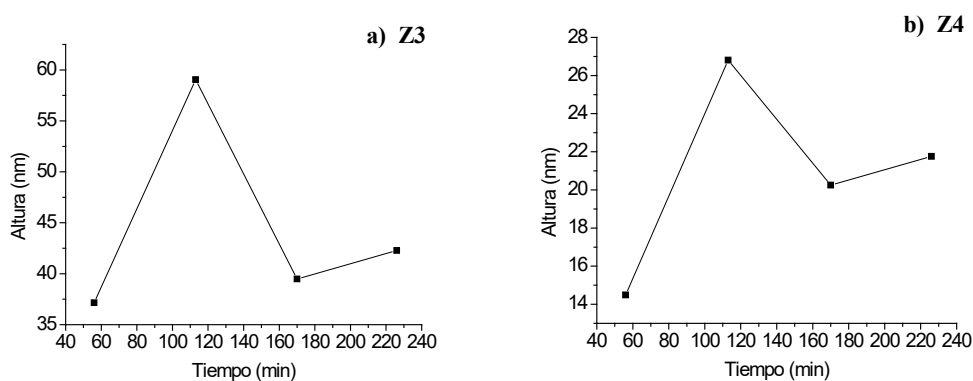


Figura 9.14 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B.

a) Altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

Tabla 9.7 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
56-113	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
113-170	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
170-226	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo

El fenómeno de disolución en cada zona de estudio de ambos grupos, se presenta a diferentes velocidades y con diferentes secuencias; por lo que se puede decir que se presenta una disolución selectiva probablemente ocasionada por la composición del cálculo renal que no es homogénea y a que las sustancias probadas no afectan de la misma manera a los materiales que componen la superficie del cálculo renal.

9.3.4 Estudio de Disolución a Partir de Vectores de Disolución

En este análisis se obtuvo para cada grupo de manera independiente, los vectores de disolución superficial para cada imagen obtenida en secuencia durante el experimento tal como se describe en la sección 6.2.6.

En la figura 9.15 se muestran las imágenes de AFM correspondientes al Grupo A. Los vectores azules (horizontales) 1 y 2, y los vectores rojos (verticales) 5 y 6, corresponden al corte de sección 1. Al corte de sección 2 corresponden los vectores azules (horizontales) 3 y 4, y los vectores rojos (verticales) 7 y 8.

Primero se muestra la superficie del cálculo renal después de 28 minutos de tratamiento con Alopurinol (punto de partida para este análisis); después se muestra la cinética de disolución calculada para después de 85, 141 y 198 de tratamiento con Alopurinol.

Se analizará la imagen después de 85 minutos de experimento para ejemplificar la manera de hacerlo. Los vectores del 1 al 4 muestran magnitudes grandes de velocidad de disolución, esto implica una disolución muy irregular en las 4 zonas estudiadas (que la disolución no fue la misma para todos los puntos de la superficie), al presentar

velocidades de disolución entre 0.85 y 3.91 nm/min; indicando grandes desplazamientos longitudinales de los puntos estudiados.

En cuestión de disolución vertical, los vectores indican que la mayor discrepancia en la uniformidad de disolución se presentó en la zona baja de la superficie estudiada por el marcador izquierdo de la Sección 2 (vector 7), al tener una velocidad promedio de disolución de 0.46 nm/min; y que de ese mismo perfil, la zona baja (marcador central) y la zona alta estudiada por el marcador derecho (verde) (vector 8), se disolvieron de manera muy semejante al presentar una diferencia de sus velocidades promedio de disolución de 0.05 nm/min, siendo ligeramente mayor la disolución en la zona alta de esa parte de la superficie del cálculo renal. En el caso del perfil de la Sección 1, la mayor disolución se presentó en la zona alta del perfil marcada con el vector 5 con una diferencia de velocidad promedio de disolución de 0.12 y en la zona baja marcada con el vector 6 con una velocidad promedio de disolución de 0.04 nm/min.

Esta misma metodología se sigue para analizar las imágenes del Grupo B, donde en la figura 9.16 se ve que la imagen obtenida después de 56 minutos es la que se toma de punto de partida para tener los vectores y también muestra la cinética de disolución obtenida para después de 113, 170 y 226 minutos de tratamiento.

Las tablas 9.8 y 9.9 simplifican los resultados obtenidos para este análisis para los grupos de imágenes A y B respectivamente. En ellas se encuentran las magnitudes y direcciones de cada vector para cada intervalo de tiempo del tratamiento aplicado.

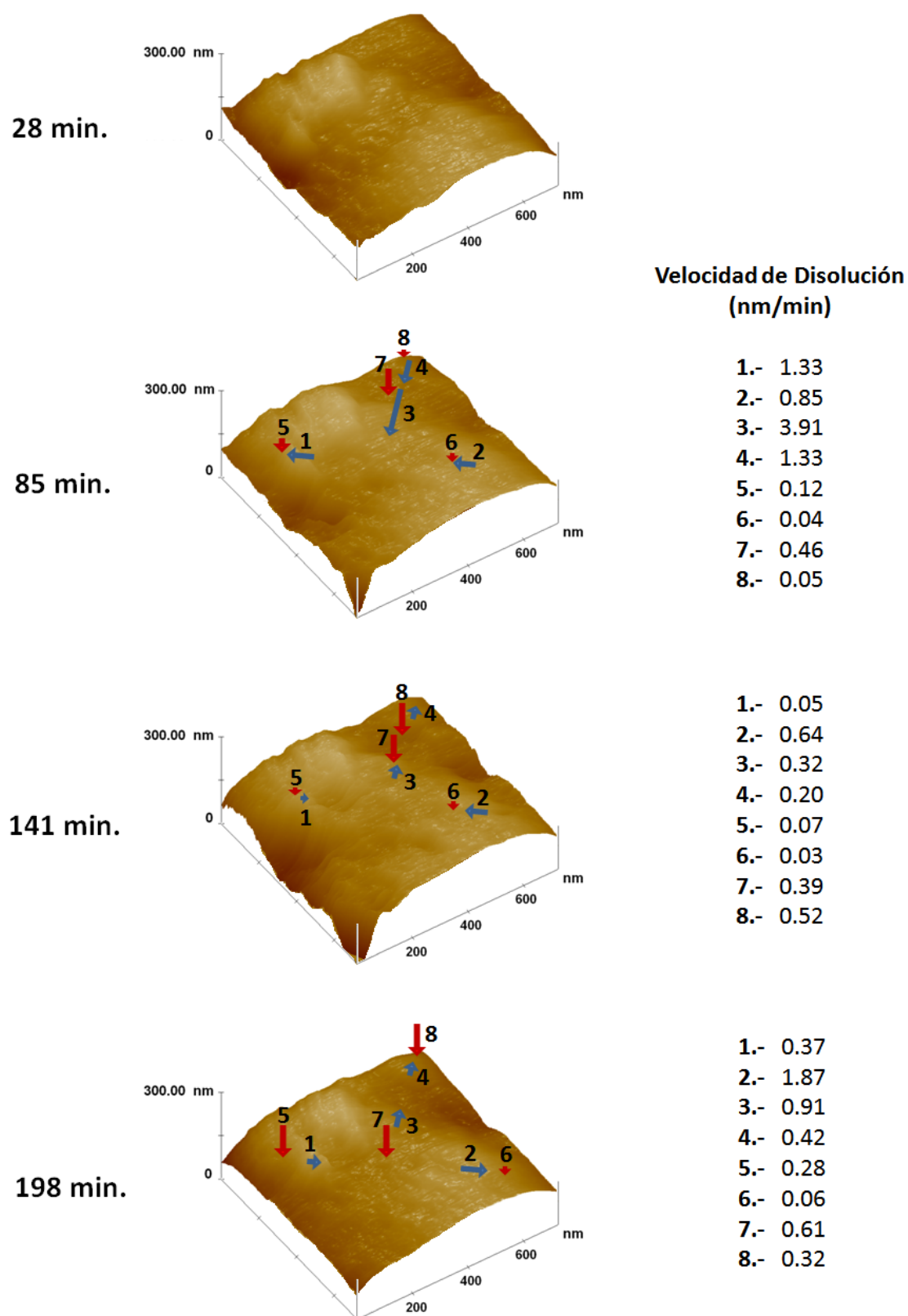


Figura 9.15 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.

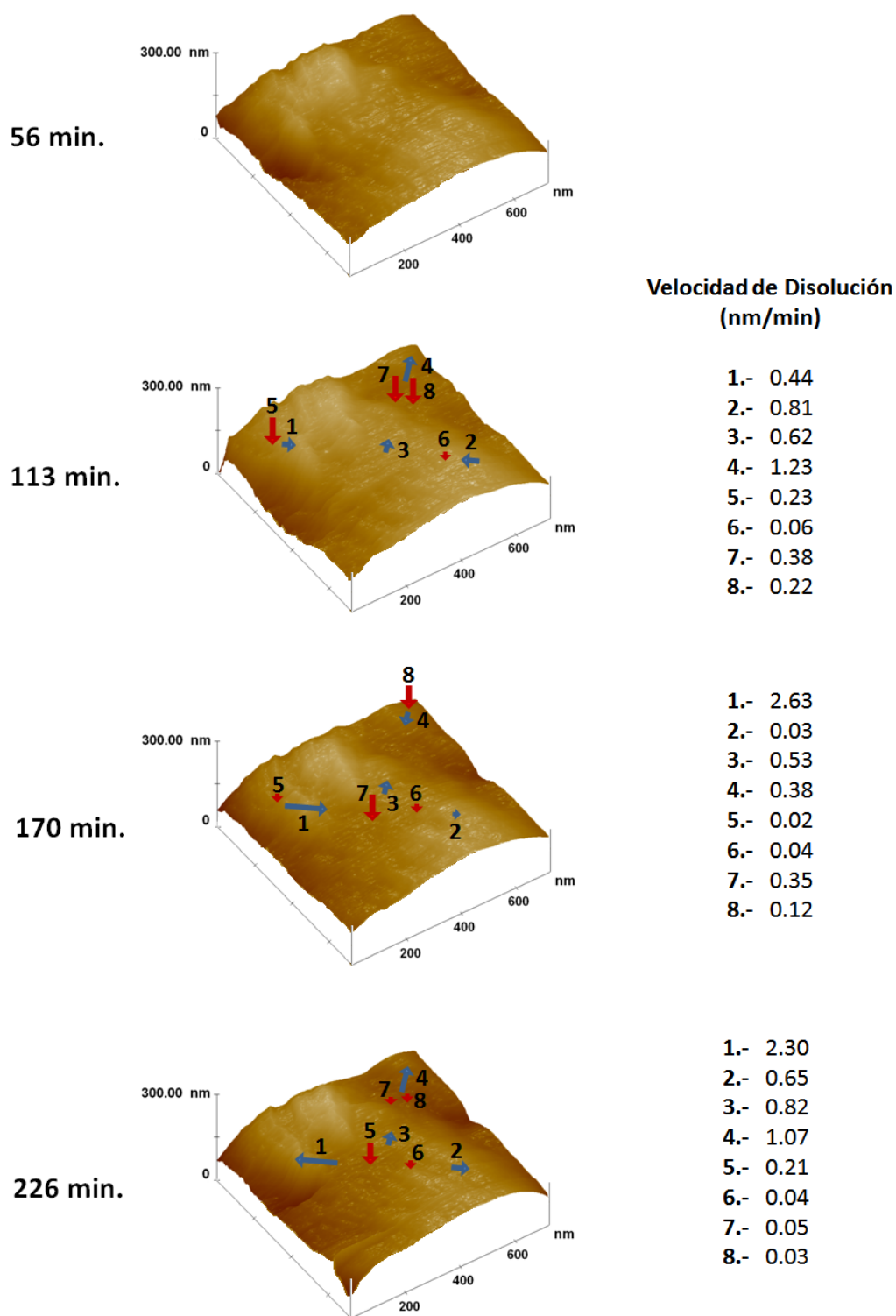


Figura 9.16 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.

Tabla 9.8 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo A.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)			
	28-85 min	85-141 min	141-198 min
Vectores Horizontales			
Vector 1			
Dirección hacia:			
Dentro		0.05	0.37
Fuera	1.33		
Vector 2			
Dirección hacia:			
Dentro	0.85	0.64	
Fuera			1.87
Vector 3			
Dirección hacia:			
Dentro		0.32	0.91
Fuera	3.91		
Vector 4			
Dirección hacia:			
Dentro	1.33		
Fuera		0.20	0.42
Vectores Verticales			
Vector 5			
Zona de disolución:			
Alta	0.12	0.07	0.28
Baja			
Vector 6			
Zona de disolución:			
Alta			0.06
Baja	0.04	0.03	
Vector 7			
Zona de disolución:			
Alta			0.61
Baja	0.46	0.39	
Vector 8			
Zona de disolución:			
Alta	0.05		0.32
Baja		0.52	

Tabla 9.9 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo B.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)			
	56-113 min	113-170 min	170-226 min
Vectores Horizontales			
Vector 1			
Dirección hacia:			
Dentro	0.44	2.63	
Fuera			2.30
Vector 2			
Dirección hacia:			
Dentro	0.81		
Fuera		0.03	0.65
Vector 3			
Dirección hacia:			
Dentro	0.62	0.53	0.82
Fuera			
Vector 4			
Dirección hacia:			
Dentro		0.38	
Fuera	1.23		1.07
Vectores Verticales			
Vector 5			
Zona de disolución:			
Alta	0.23	0.02	
Baja			0.21
Vector 6			
Zona de disolución:			
Alta			
Baja	0.06	0.04	0.04
Vector 7			
Zona de disolución:			
Alta		0.35	
Baja	0.38		0.05
Vector 8			
Zona de disolución:			
Alta		0.12	
Baja	0.22		0.03

Las variaciones en las magnitudes de los vectores de disolución horizontal, indican que en ambos grupos de estudio la disolución no se lleva a cabo de manera homogénea; es decir, se realiza un proceso de disolución selectiva.

En el grupo A en el intervalo de los 28 a 85 minutos de tratamiento los vectores de velocidad promedio de disolución vertical indican una mayor disolución en las zonas bajas de la superficie, lo que implica la generación de hoyos más profundos ocasionando una mayor irregularidad de la topografía y por lo tanto la rugosidad superficial RMS

aumenta. Después entre los 85 y 141 minutos de tratamiento nuevamente la mayor disolución se encuentra en los valles de la superficie pero en este intervalo de tiempo, se observa que el efecto disolutivo del Alopurinol es más grande al encontrar un mayor número de vectores en las partes bajas y de mayor magnitud que los encontrados para el lapso de tiempo anterior; por lo tanto, la rugosidad aumenta nuevamente. Estos cambios producen una superficie más irregular del cálculo que al principio del experimento, y en el intervalo de tiempo entre 141 y 198 minutos de tratamiento, se puede observar que la mayor disolución se ocasiona precisamente en todos los puntos altos de la superficie del cálculo renal ocasionando un aplanamiento de la topografía y disminuyendo la rugosidad superficial RMS del cálculo renal.

En el Grupo B se observa que en el intervalo de tiempo entre 56 y 113 minutos los vectores de disolución indican que aunque hay una disolución en toda la superficie, esta es mayor en los valles, ocasionando que la rugosidad aumente. Entre 113 y 170 minutos de tratamiento con el Alopurinol, se observa que los vectores indican una mayor disolución en los picos de la superficie, ocasionando un ligero aplanamiento y disminuyendo la rugosidad superficial RMS. En el último intervalo de tiempo del experimento, la rugosidad superficial aumenta nuevamente debido a una mayor disolución de los valles presentes en la topografía del cálculo renal, tal y como indican los vectores de disolución.

9.4 EXPERIMENTO 4. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Alopurinol

9.4.1 Análisis de Rugosidad

Este análisis se basa en los cambios presentes en la topografía y rugosidad superficial del cálculo renal con forme pasó el tiempo de exposición a la solución de Alopurinol. Para cada grupo de estudio, se obtuvo el valor de la rugosidad acumulada en el tiempo (Grupo A tabla 9.10, Grupo B tabla 9.11).

Se graficaron las mediciones de la rugosidad R_q para cada grupo de estudio (figura 9.17). El comportamiento de disolución es el mismo en los primeros 4 intervalos de las gráficas para ambos grupos. Se puede ver que la rugosidad primero disminuye, indicando un aplanamiento en la topografía del cálculo posiblemente debida a la continua fractura de las partículas de la superficie y el desprendimiento de aquellas que sobresalen por encima de las demás. Después la rugosidad R_q aumenta, indicando que la topografía del

cálculo renal es más irregular posiblemente debido a la formación de hoyos en su superficie ocasionados por el desprendimiento de partículas. Este proceso se repite, indicando que existe una disolución continua a velocidad variable.

Tabla 9.10 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
28	15.015	0	15.015
85	14.213	0.802	15.817
141	15.988	1.775	17.592
198	15.132	0.856	18.448
255	14.547	0.585	19.033
313	15.8	1.253	20.286

Tabla 9.11 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.

Exposición del cálculo renal al Alopurinol (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
56	16.19	0	16.19
113	15.45	0.74	16.93
170	15.697	0.247	17.177
226	15.482	0.215	17.392
284	15.054	0.428	17.82

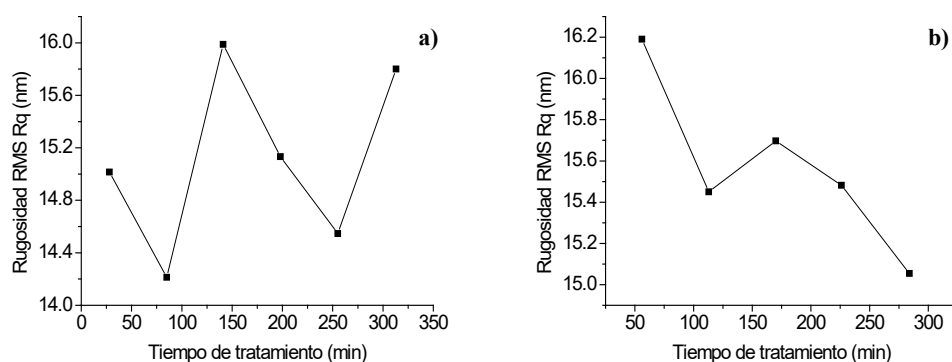


Figura 9.17 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.

También se graficó la rugosidad R_q acumulada que se calculó para cada grupo de estudio. En la figura 9.18 se muestran estas gráficas donde se observa una tendencia lineal para el fenómeno de disolución en ambos grupos de estudio mostrando que la

rugosidad superficial varía constantemente, pudiendo significar que este fenómeno se efectúa de manera continua.

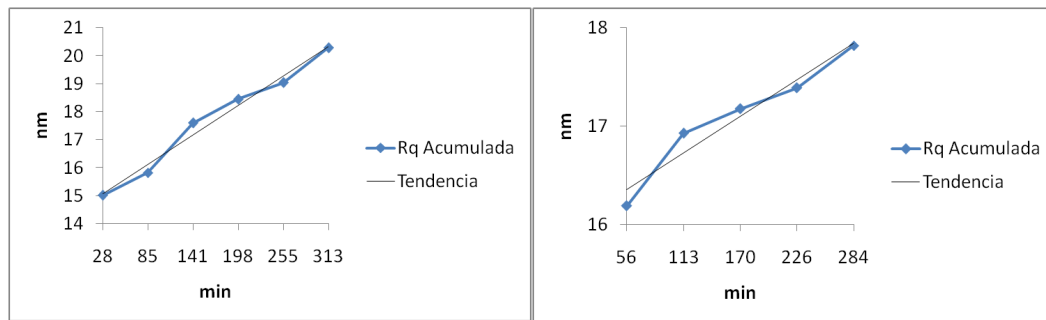


Figura 9.18 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).

Las funciones lineales que describen estos comportamientos son:

$$\text{Grupo A} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.01847 t + R_{qi} + 0.469$$

$$\text{Grupo B} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.0065 t + R_{qi} + 0.2035$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

Estos comportamientos de disolución se interpolaron para encontrar una función que pudiera describir de manera general el fenómeno de disolución de acuerdo a los cambios en la rugosidad superficial medidos en todas las imágenes (figura 9.19); y se comparó con las rugosidades R_q acumuladas para ilustrar como esa función describe un comportamiento lineal de la disolución ocasionada por la solución de 10^{-3}M de Alopurinol sobre la superficie de este cálculo renal en particular (figura 9.20).

El fenómeno de disolución con base en la rugosidad R_q ocasionado por una solución de 10^{-3}M de alopurinol sobre esta superficie del cálculo renal en particular se describe con la función lineal (línea verde figuras 9.19 y 9.20):

$$R_q \text{ acumulada} = 0.0125 t + R_{qi} + 0.3365$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

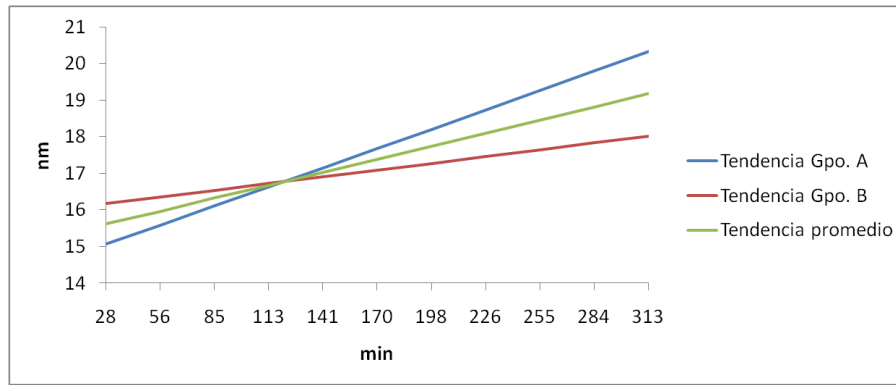


Figura 9.19 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.

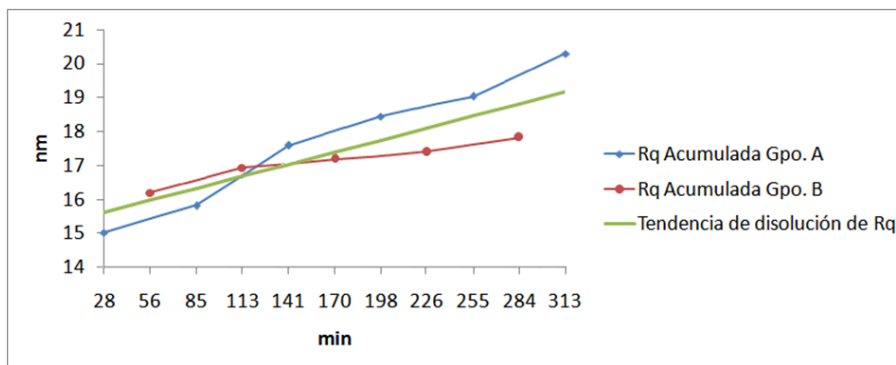


Figura 9.20 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.

9.4.2 Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección

Se acomodaron los perfiles de cada sección de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.6. En la figura 9.21 están los perfiles obtenidos para la Sección 1 de las imágenes del Grupo A y se estimó la altura que hay entre cada marcador al principio y al final del experimento. La figura 9.22 muestra los perfiles y las mediciones para la Sección 2 del Grupo A. En este caso hay que notar que no se consideró para el análisis, el extremo derecho del perfil obtenido después de 313 minutos de tratamiento (línea roja punteada), debido a un artefacto que se observa en la parte superior de la imagen de AFM obtenida para después de 313 minutos de tratamiento mostrada en las figuras 8.13 y 8.16. Las figuras 9.23 y 9.24 muestran el arreglo para los perfiles de la Sección 1 y la Sección 2 del Grupo B, respectivamente.

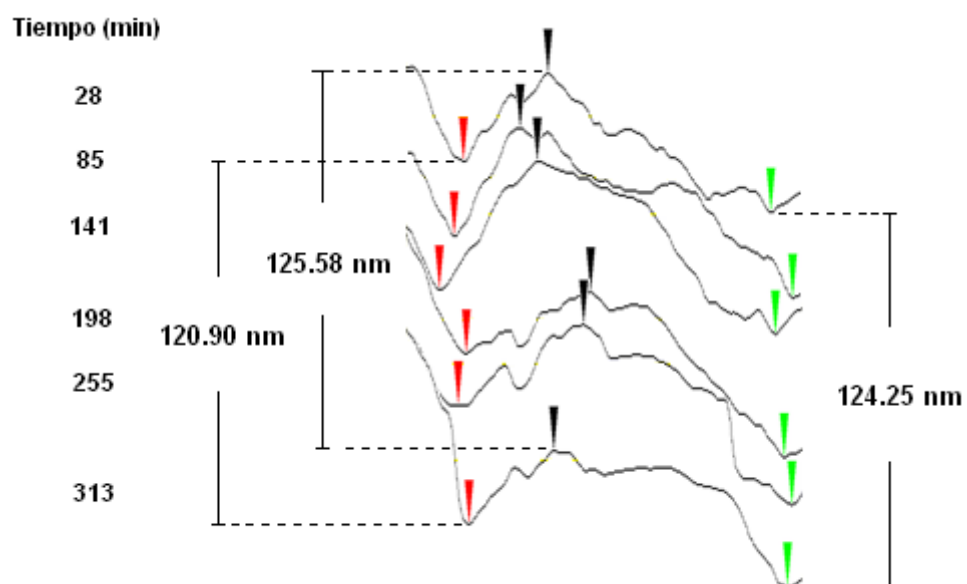


Figura 9.21 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.

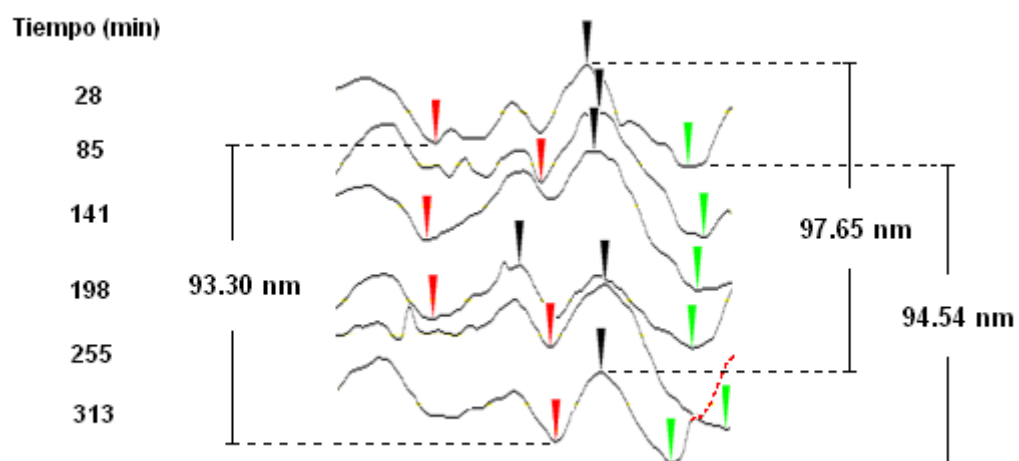


Figura 9.22 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.

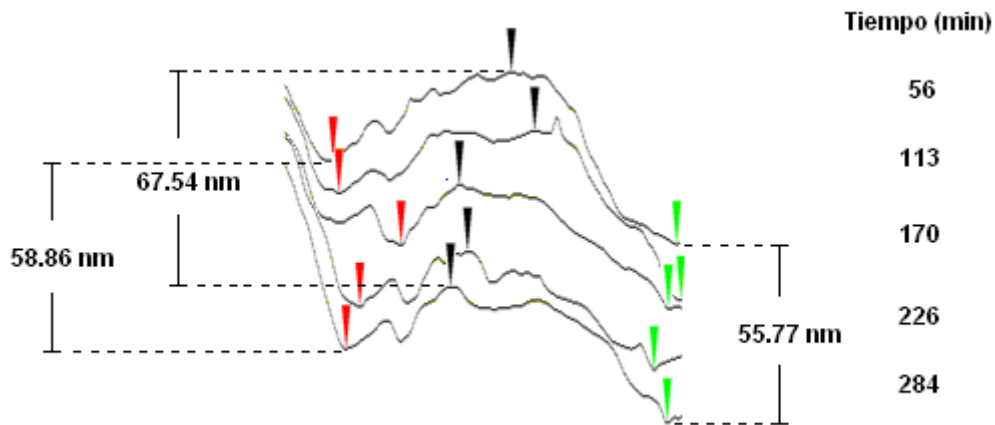


Figura 9.23 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.

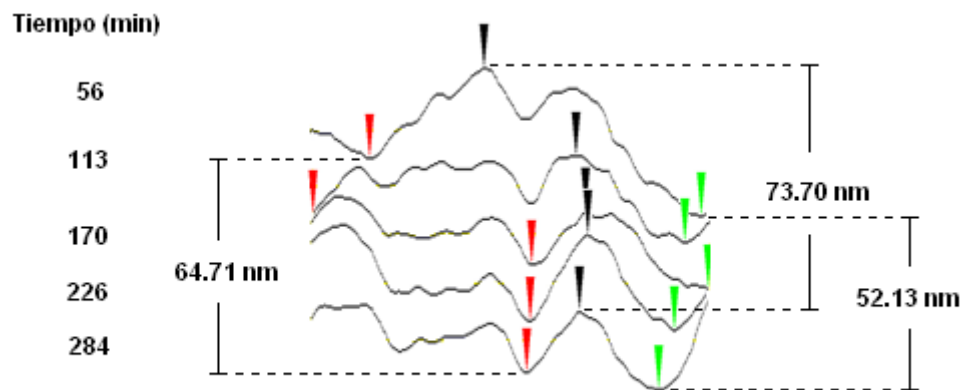


Figura 9.24 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.

Con el tiempo de duración de cada experimento (Grupos A y B) y las alturas medidas para cada arreglo de los perfiles, se calcularon las velocidades promedio de disolución para cada marcador (ver tabla 9.12). Con estas velocidades se calculó que en el Grupo A hubo una velocidad promedio de disolución de 0.38 nm/min, mientras que en el grupo B la velocidad promedio fue de 0.28 nm/min. Estos resultados se compararan posteriormente con los obtenidos de los demás experimentos.

Tabla 9.12 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con alopurinol.

Perfiles estudiados	Velocidad Promedio de Disolución por Marcador (nm/min)			Promedio de cada sección
	Rojo (izquierdo)	Negro (central)	Verde (derecho)	
Grupo A. Duración del experimento: 285 min				
Sección 1	0.42	0.44	0.43	0.43
Sección 2	0.33	0.34	0.33	0.33
Promedio del Grupo A				0.38
Grupo B. Duración del experimento: 228 min				
Sección 1	0.26	0.30	0.25	0.27
Sección 2	0.28	0.32	0.23	0.28
Promedio del Grupo B				0.28

9.4.3 Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura

Se graficaron las mediciones de altura entre los puntos máximos y mínimos para cada sección de ambos grupos (figuras 9.25-9.28). Cada gráfica representa la disolución vertical de la superficie del cálculo renal que se haya observado en los perfiles. Cada segmento ascendente representa un aumento en la altura indicando una mayor disolución en las partes bajas de la superficie del perfil; cuando la pendiente es descendente, indica una mayor disolución del punto más alto dentro del perfil (marcador central).

En el caso de la Sección 1 del Grupo A (figura 9.25), se ve que ambos marcadores siguen una misma tendencia aunque a diferentes velocidades de disolución. En los primeros 141 minutos, hay una mayor disolución del fondo de la superficie; en el lapso entre 141 y 198 minutos, la disolución fue mayor en la parte más alta del perfil. Esta cinética de disolución se repite, al haber un incremento en la medición de altura a los 255 minutos y después un decremento hasta los 313 minutos de tratamiento.

En la sección 2 del grupo A (figura 9.26), la altura entre el marcador central y el marcador a la derecha del perfil sigue el mismo comportamiento que las dos gráficas anteriores; sin embargo, la cinética de disolución del marcador izquierdo respecto al marcador central es diferente. Durante los primeros 85 minutos de tratamiento, la mayor disolución se presenta en la parte más alta de la sección, después hay un proceso en el

que primero la disolución es mayor en el fondo de esa región y después es mayor en la partícula más alta medida con ese perfil.

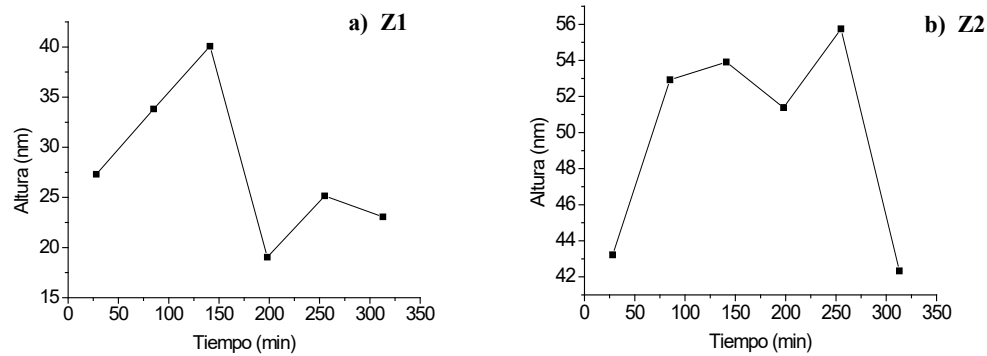


Figura 9.25 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A.

a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

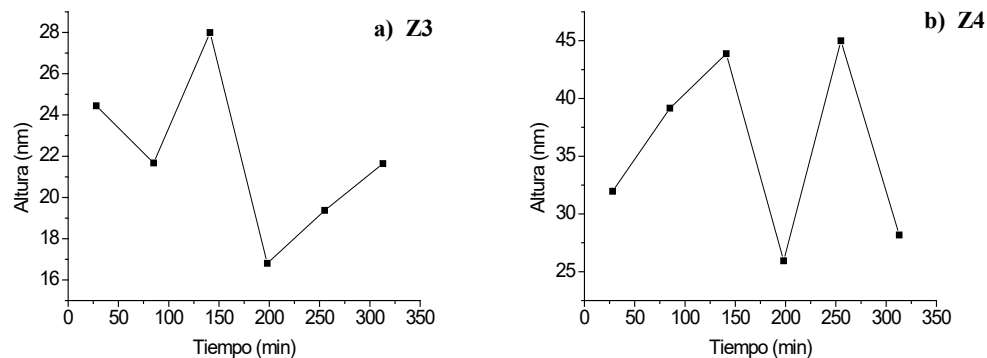


Figura 9.26 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A.

a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde)

Para explicar de manera global el fenómeno de disolución vertical observado en las imágenes del Grupo A, se describe en la tabla 9.13 en qué lugar del perfil de la superficie se presentó una mayor disolución para cada intervalo de tiempo. Cada zona está delimitada entre el marcador central (partícula más alta) y alguno de los otros marcadores que indican la partícula que se encuentra en el fondo de la superficie; con respecto al marcador izquierdo de la Sección 1 se le llamará Z1; con el marcador derecho de la sección 1 está la zona Z2; Z3 es la zona hacia el marcador izquierdo de la Sección 2 y Z4 es con respecto al marcador derecho de la Sección 2.

Tabla 9.13 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
28-85	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo
85-141	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
141-198	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
198-255	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
255-313	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior

Se puede ver que la cinética de disolución es casi la misma para las 4 zonas, excepto en la zona 4 al inicio y al final del experimento. Esto puede deberse a que en esa región el material que compone la superficie del cálculo no es el mismo que en los otros puntos; o también a que en esa región las partículas estaban adheridas a la superficie con fuerzas diferentes al resto de las partículas observadas.

De la misma manera se analizó las gráficas producidas a partir de los datos del Grupo B (figuras 9.27 y 9.28). En la tabla 9.14 se describe el proceso de disolución observado en las 4 zonas de estudio. Se puede ver que en los primeros 170 minutos de tratamiento con alopurinol, este grupo de imágenes presentan la misma tendencia de disolución teniendo un mayor desprendimiento de las partículas que sobresalen de la superficie del cálculo renal. En el intervalo de los 170 a los 284 minutos los marcadores de una misma sección siguen una misma tendencia, pero es una disolución inversa entre la Sección 1 y la Sección 2.

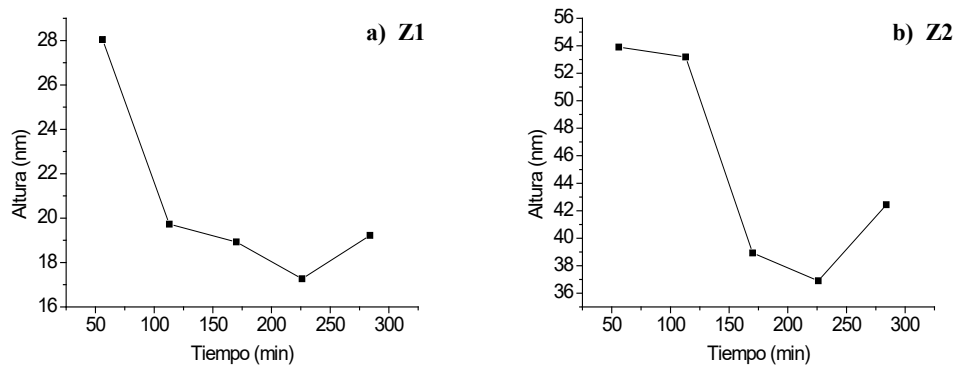


Figura 9.27 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

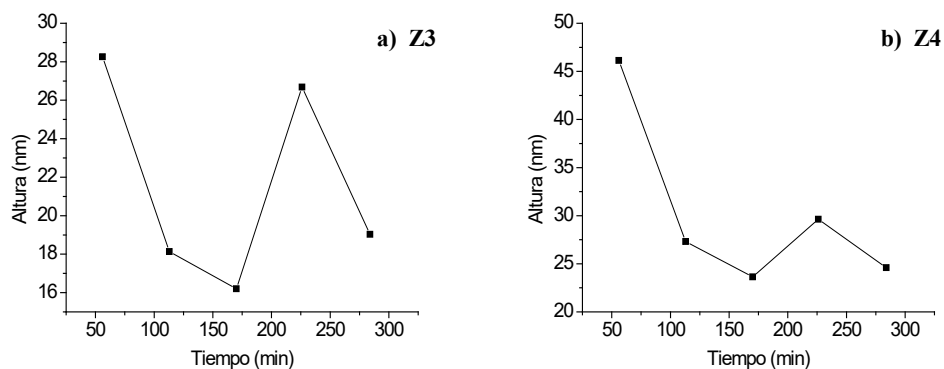


Figura 9.28 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

Tabla 9.14 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
56-113	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
113-170	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
170-226	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
226-284	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior

El fenómeno de disolución observado en cada zona de estudio de ambos grupos, se presenta a diferentes velocidades y en ocasiones con diferentes tendencias, por lo que se puede decir que se presenta una disolución selectiva probablemente ocasionada por la composición del cálculo renal que no es homogénea y la acción del Alopurinol sobre solo algún tipo del material que compone la superficie del cálculo.

9.4.4 Análisis de Disolución a Partir de Vectores de Disolución

En este análisis se obtuvo para cada grupo de manera independiente, los vectores de disolución superficial para cada imagen obtenida en secuencia durante el experimento tal como se describe en la sección 6.2.6.

En la figura 9.29 se muestran las imágenes de AFM correspondientes al Grupo A. Los vectores azules (horizontales) 1 y 2, y los vectores rojos (verticales) 5 y 6, corresponden al corte de sección 1. Al corte de sección 2 corresponden los vectores azules (horizontales) 3 y 4, y los vectores rojos (verticales) 7 y 8.

Primero se muestra la superficie del cálculo renal después de 28 minutos de tratamiento con Alopurinol (punto de partida para este análisis); después se muestra la cinética de disolución calculada para después de 85, 141, 198, 255 y 313 minutos de tratamiento con Alopurinol.

Esta misma metodología se sigue para analizar las imágenes del Grupo B, donde en la figura 9.30 se ve que la imagen obtenida después de 56 minutos es la que se toma de punto de partida para tener los vectores y también muestra la cinética de disolución obtenida para después de 113, 170, 226 y 284 minutos de tratamiento.

Las tablas 9.15 y 9.16 simplifican los resultados obtenidos para este análisis para los grupos de imágenes A y B respectivamente. En ellas se encuentran las magnitudes y direcciones de cada vector para cada intervalo de tiempo del tratamiento aplicado.

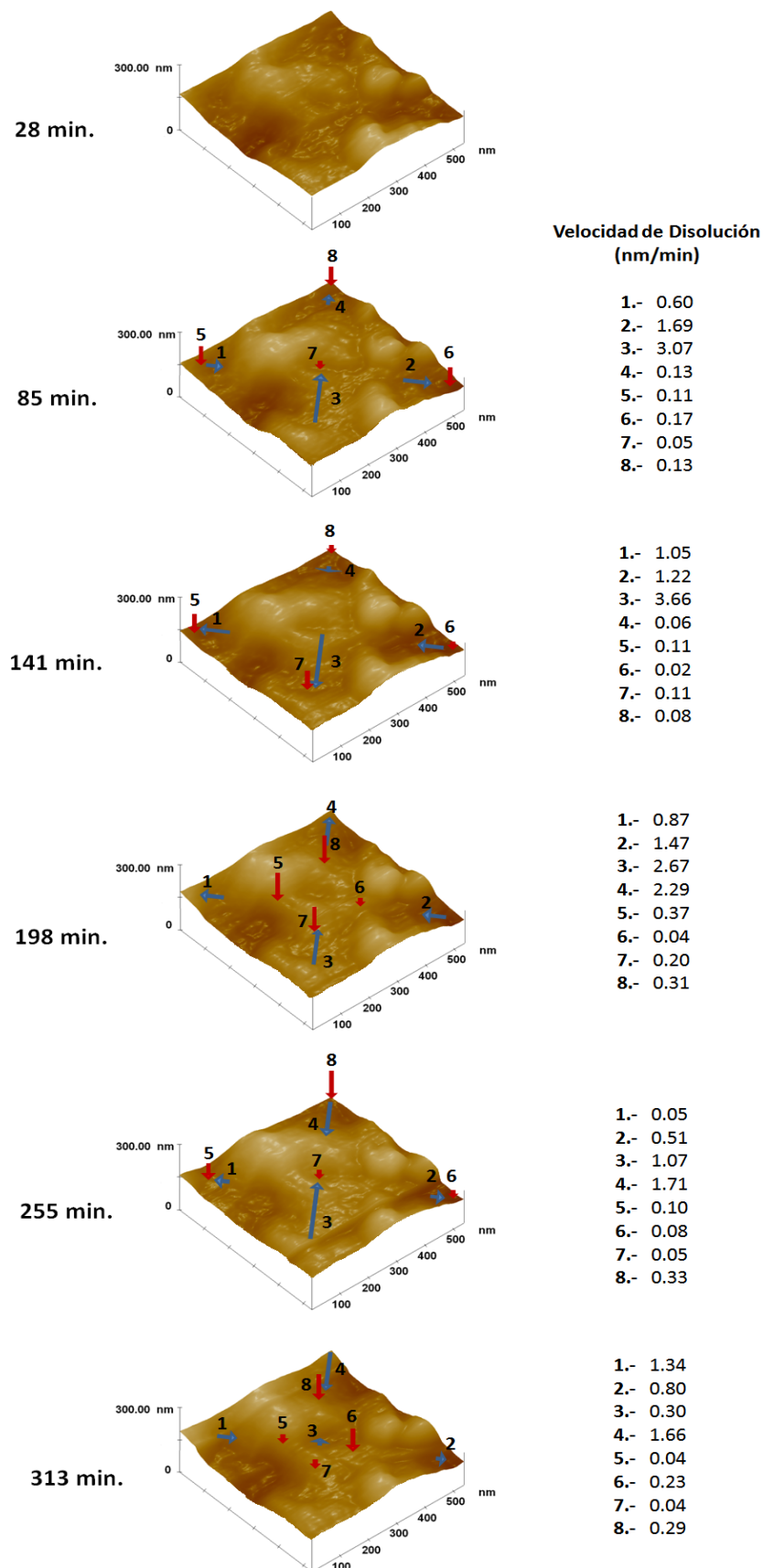


Figura 9.29 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.

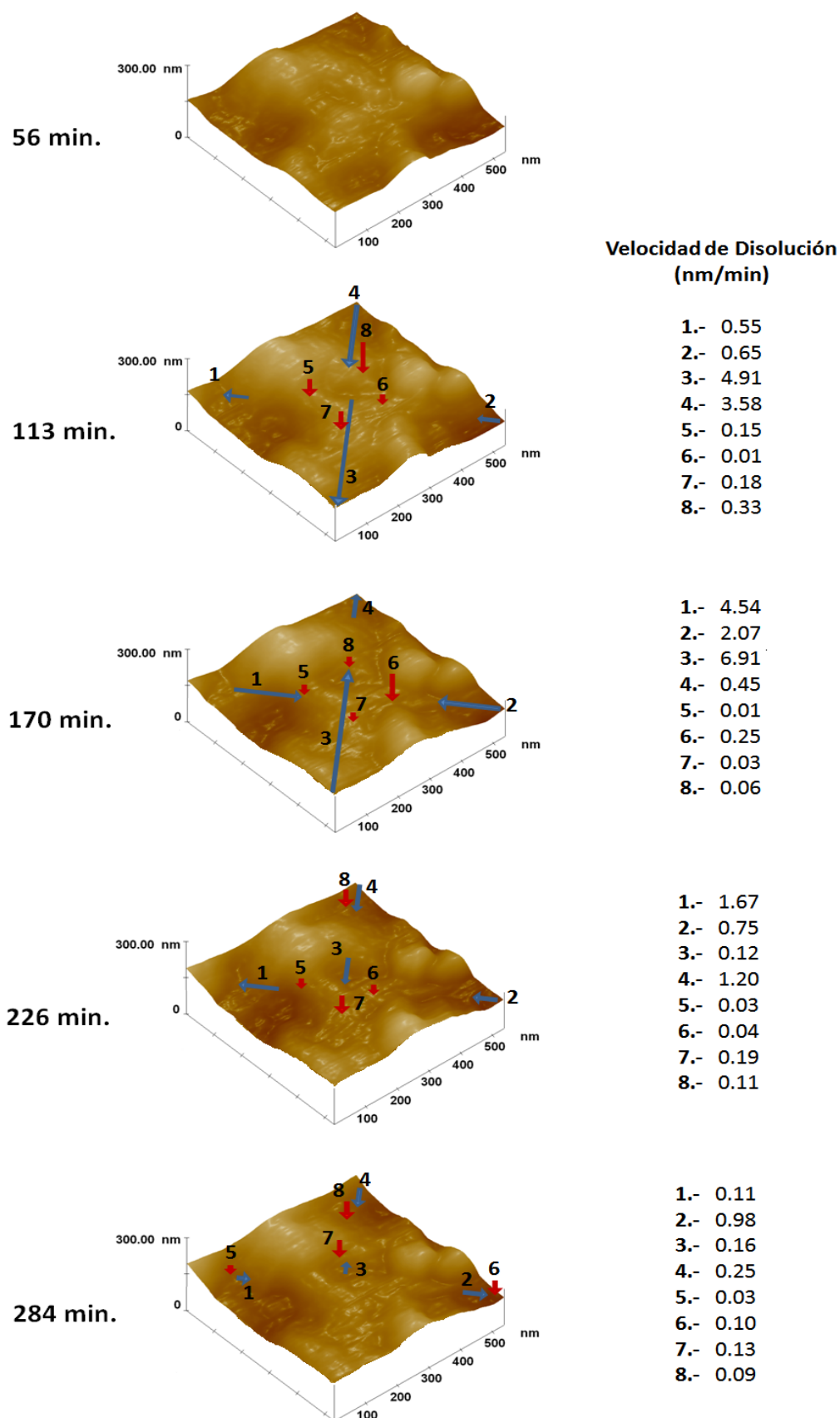


Figura 9.30 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Alopurinol.

Tabla 9.15 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo al tiempo de exposición al Alopurinol para las imágenes del Grupo A.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)					
	28-85 min	85-141 min	141-198 min	198-255 min	255-313 min
Vectores Horizontales					
Vector 1					
Dirección hacia:					
Dentro	0.60				1.34
Fuera		1.05	0.87	0.05	
Vector 2					
Dirección hacia:					
Dentro		1.22	1.47		
Fuera	1.69			0.51	0.80
Vector 3					
Dirección hacia:					
Dentro	3.07		2.67	1.07	0.30
Fuera		3.66			
Vector 4					
Dirección hacia:					
Dentro		0.06		1.71	1.66
Fuera	0.13		2.29		
Vectores Verticales					
Vector 5					
Zona de disolución:					
Alta			0.37		0.04
Baja	0.11	0.11		0.10	
Vector 6					
Zona de disolución:					
Alta			0.04		0.23
Baja	0.17	0.02		0.08	
Vector 7					
Zona de disolución:					
Alta	0.05		0.20		
Baja		0.11		0.05	0.04
Vector 8					
Zona de disolución:					
Alta			0.31		0.29
Baja	0.13	0.08		0.33	

Tabla 9.16 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo al tiempo de exposición al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)				
	56-113 min	113-170 min	170-226 min	226-284 min
Vectores Horizontales				
Vector 1				
Dirección hacia:				
Dentro		4.54		0.11
Fuera	0.55		1.67	
Vector 2				
Dirección hacia:				
Dentro	0.65		0.75	
Fuera		2.07		0.98
Vector 3				
Dirección hacia:				
Dentro		6.91		0.16
Fuera	4.91		0.12	
Vector 4				
Dirección hacia:				
Dentro	3.58		1.20	0.25
Fuera		0.45		
Vectores Verticales				
Vector 5				
Zona de disolución:				
Alta	0.15	0.01	0.03	
Baja				0.03
Vector 6				
Zona de disolución:				
Alta	0.01	0.25	0.04	
Baja				0.10
Vector 7				
Zona de disolución:				
Alta	0.18	0.03		0.13
Baja			0.19	
Vector 8				
Zona de disolución:				
Alta	0.33	0.06		0.09
Baja			0.11	

Las variaciones en las magnitudes de los vectores de disolución horizontal, indican que en ambos grupos de estudio la disolución no se lleva a cabo de manera homogénea; es decir, se realiza un proceso de disolución selectiva.

En el grupo A en el intervalo de 28 a 141 minutos se observa que los vectores de velocidad promedio de disolución vertical indican que la mayor actividad se realizó en las zonas bajas de la superficie, aunque las pequeñas magnitudes de los vectores indican que la disolución se llevó de manera relativamente pareja en los puntos de la superficie estudiados. Después de 141 minutos, se observó un proceso repetitivo en el que primero

la mayor disolución se realizó en las zonas altas de la superficie, después se disolvió en mayor medida las zonas bajas, y nuevamente las zonas altas son las que sufrieron una mayor disolución.

En el grupo B se ve un comportamiento un tanto diferente ya que para el intervalo de tiempo entre 56 y 170 minutos la mayor disolución se observa en las zonas altas de la topografía. Pasado ese tiempo, 2 vectores indican que en sus zonas de estudio la disolución se llevó a cabo de manera muy similar entre los puntos altos y bajos ya que sus magnitudes son de 0.03 y 0.04 nm/min, siendo mayor la observada en las partes altas; y los otros 2 vectores restantes indican que la mayor disolución se realizó en las partes bajas de la superficie. Después el siguiente comportamiento observado, es que en las zonas donde hubo una mayor disolución en los picos de la superficie en el intervalo de tiempo anterior, ahora la disolución se llevó a cabo en los valles de la topografía, y viceversa.

9.5 EXPERIMENTO 5. Metodología empleada: AFM en líquido. Sustancia de prueba: Ácido Cítrico.

9.5.1 Análisis de Rugosidad

Este análisis se basa en los cambios presentes en la topografía y rugosidad superficial del cálculo renal conforme pasó el tiempo de exposición a la solución de ácido cítrico. Para cada grupo de estudio, se obtuvo el valor de la rugosidad acumulada en el tiempo, que es la suma acumulativa de dichos cambios (Grupo A tabla 9.17, Grupo B tabla 9.18).

Se graficaron las mediciones de la rugosidad R_q para cada grupo de estudio (figura 9.31). En las gráficas se observa que el comportamiento de disolución con base en la rugosidad varía de un grupo a otro solo en el último intervalo de tiempo.

Cuando la rugosidad disminuye, indica un aplanamiento en la topografía del cálculo posiblemente debida a la continua fractura de las partículas de la superficie y el desprendimiento de aquellas que sobresalen por encima de las demás. Cuando la rugosidad aumenta, indica que la topografía del cálculo renal se vuelve más irregular debido a la formación de hoyos en su superficie.

Tabla 9.17 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al ácido cítrico para las imágenes del Grupo A.

Exposición del cálculo renal al Ácido Cítrico (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
28	38.06	0	38.06
85	31.89	6.17	44.22
141	33.56	1.67	45.89
198	38.50	4.94	50.83

Tabla 9.18 Medición de la rugosidad de la superficie del cálculo de acuerdo al tiempo de exposición de la piedra al Alopurinol para las imágenes del Grupo B.

Exposición del cálculo renal al Ácido Cítrico (min)	R _q (RMS) (nm)	Cambio en el tiempo de R _q (RMS) (nm)	R _q Acumulada (nm)
56	42.62	0	42.62
113	34.48	8.14	50.76
170	38.68	4.20	54.96
226	38.03	0.65	55.61

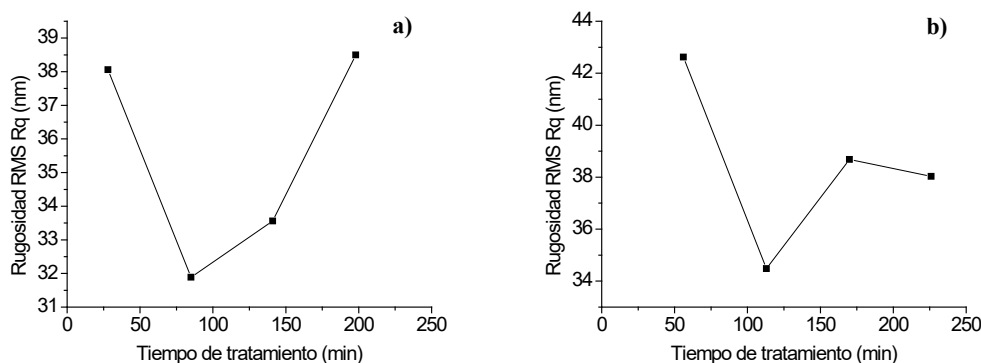


Figura 9.31 Gráficas de los valores de la rugosidad R_q medida para: a) Grupo A. b) Grupo B.

También se graficó la rugosidad R_q acumulada que se calculó para cada grupo de estudio. En la figura 9.32 se muestran estas gráficas donde se observa una tendencia lineal para el fenómeno de disolución en ambos grupos de estudio mostrando que la rugosidad superficial varía constantemente, pudiendo significar que este fenómeno se efectúa de manera continua.

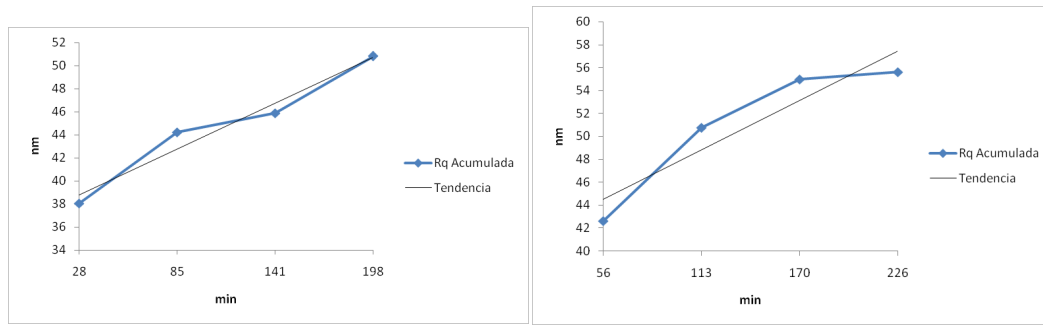


Figura 9.32 Gráficas de la rugosidad R_q acumulada. Muestran la línea de tendencia para cada grupo de datos. Grupo A (izquierda) Grupo B (derecha).

Las funciones lineales (tendencias) que describen estos comportamientos son:

$$\text{Grupo A} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.0705 t + R_{qi} - 1.29$$

$$\text{Grupo B} \quad R_q \text{ acumulada} = 0.0762 t + R_{qi} - 2.38$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

Estos comportamientos de disolución se interpolaron para encontrar una función que pudiera describir de manera general el fenómeno de disolución de acuerdo a los cambios en la rugosidad superficial medidos en todas las imágenes (figura 9.33); y se comparó con las rugosidades R_q acumuladas para ilustrar como esa función describe un comportamiento lineal de la disolución de la superficie de este cálculo renal en particular ocasionada por las sustancias de prueba (figura 9.34).

Este fenómeno de disolución en base a la rugosidad R_q se describe con la función lineal (línea verde figuras 9.33 y 9.34):

$$R_q \text{ acumulada} = 0.0734t + R_{qi} - 1.835$$

donde t es el tiempo en minutos de exposición a la solución de Alopurinol y R_{qi} es la rugosidad superficial RMS al inicio de cada experimento.

De este análisis también se puede determinar que la rugosidad superficial RMS varía a una velocidad aproximada de 0.07 nm/min; la cual, sería la velocidad que presenta el fenómeno de disolución debida a la solución de ácido cítrico para esta región estudiada en particular del cálculo renal.

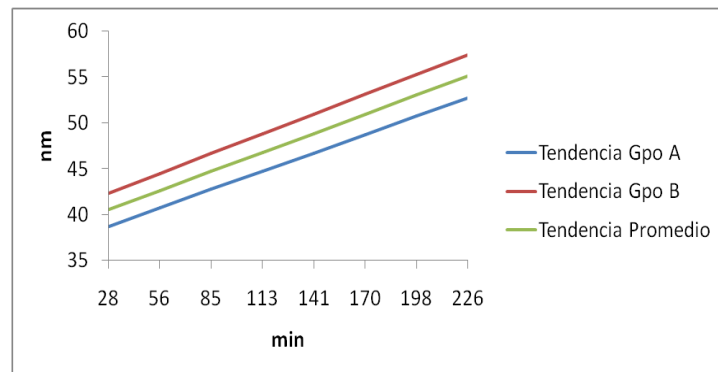


Figura 9.33 Obtención de una tendencia general de la rugosidad R_q acumulada para todo el experimento.

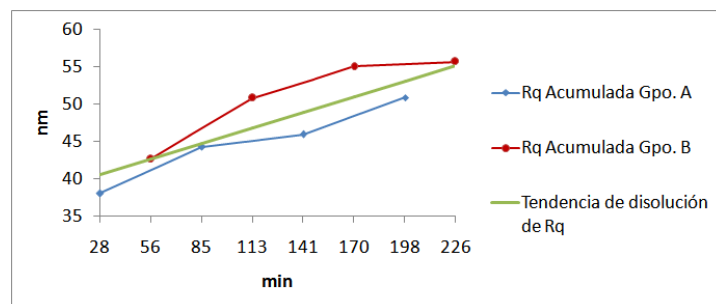


Figura 9.34 Tendencia general de la rugosidad R_q acumulada comparada con los resultados de ambos grupos de estudio.

9.5.2 Análisis de Disolución a Partir de los Perfiles de los Cortes de Sección

Se acomodaron los perfiles de cada sección de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.6. En la figura 9.35 están los perfiles obtenidos para la Sección 1 de las imágenes del Grupo A y se estimó la altura que hay para cada marcador entre el inicio y el final del experimento. La figura 9.36 muestra los perfiles y las mediciones para la Sección 2 del Grupo A. Las figuras 9.37 y 9.38 muestran el arreglo para los perfiles de la Sección 1 y la Sección 2 del Grupo B, respectivamente.

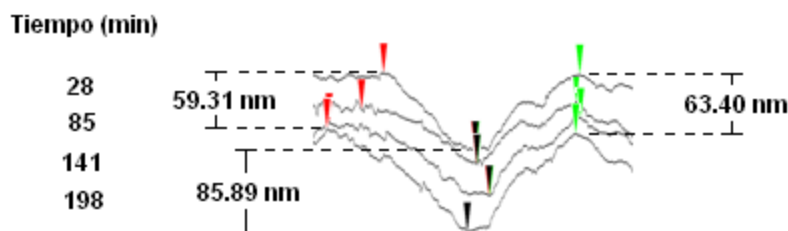


Figura 9.35 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo A.

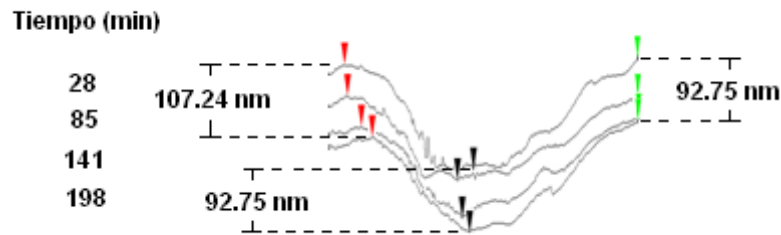


Figura 9.36 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo A.

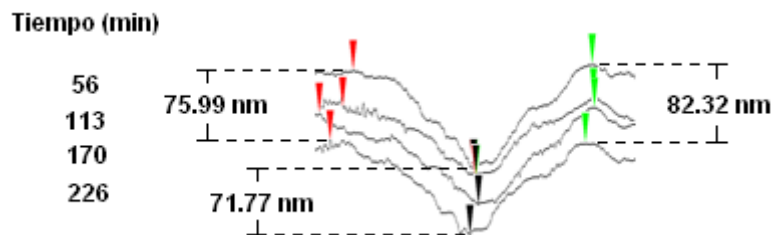


Figura 9.37 Comparación de los perfiles de la Sección 1 para las imágenes del Grupo B.

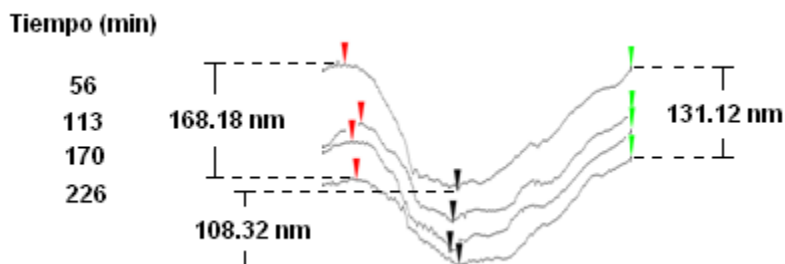


Figura 9.38 Comparación de los perfiles de la Sección 2 para las imágenes del Grupo B.

Con el tiempo de duración de cada experimento (Grupos A y B con duración de 170 min. cada uno) y las alturas medidas para cada arreglo de los perfiles, se calcularon las velocidades promedio de disolución para cada marcador (ver tabla 9.19).

En conjunto el proceso se lleva a cabo a velocidades similares en los 3 marcadores de cada perfil, aunque no es una disolución que se presente de manera homogénea en toda la superficie, ya que hay variaciones significativas entre los 2 conjuntos de perfiles pertenecientes a cada grupo de estudio. También se obtuvieron las velocidades promedio de disolución para cada grupo de estudio que posteriormente serán comparadas con las resultantes de los demás experimentos.

Tabla 9.19 Velocidades promedio de disolución calculadas a partir de los perfiles de los cortes de sección hechos en las imágenes del experimento con ácido cítrico.

Perfiles estudiados	Velocidad Promedio de Disolución por Marcador (nm/min)			Promedio de cada sección
	Rojo (izquierdo)	Negro (central)	Verde (derecho)	
Grupo A. Duración del experimento: 170 min				
Sección 1	0.35	0.50	0.37	0.41
Sección 2	0.63	0.55	0.55	0.58
Promedio del Grupo A				0.50
Grupo B. Duración del experimento: 170 min				
Sección 1	0.45	0.42	0.48	0.45
Sección 2	0.99	0.64	0.77	0.80
Promedio del Grupo B				0.63

9.5.3 Análisis del Comportamiento del Proceso de Disolución en Base a las Mediciones de Altura

Se graficaron las mediciones de altura entre los puntos máximos y mínimos para cada corte de sección del Grupo A (figuras 9.39 y 9.40) y el Grupo B (figuras 9.41 y 9.42) de acuerdo a la sección 6.2.6. Cada gráfica representa la disolución vertical de la superficie del cálculo renal que se haya observado en los perfiles. Cada segmento ascendente representa un aumento en la altura indicando una mayor disolución en el punto más bajo de la superficie del perfil (marcador central); cuando la pendiente es descendente, indica una mayor disolución de los puntos más bajos dentro del perfil (marcador derecho e izquierdo).

Se puede ver que para las imágenes del Grupo A la tendencia de la disolución es la misma para las 4 zonas de la superficie estudiada (tabla 9.20). En la tabla 9.21 se describe el proceso de disolución que hubo en cada una de las 4 zonas del Grupo B y puede observarse que prácticamente siguió una misma tendencia a excepción de la zona 1 en el intervalo de tiempo entre 170 y 226 minutos de tratamiento.

Esta uniformidad en las disoluciones indica que se siguió un mismo comportamiento de disolución en cada intervalo de tiempo para toda la superficie del cálculo renal.

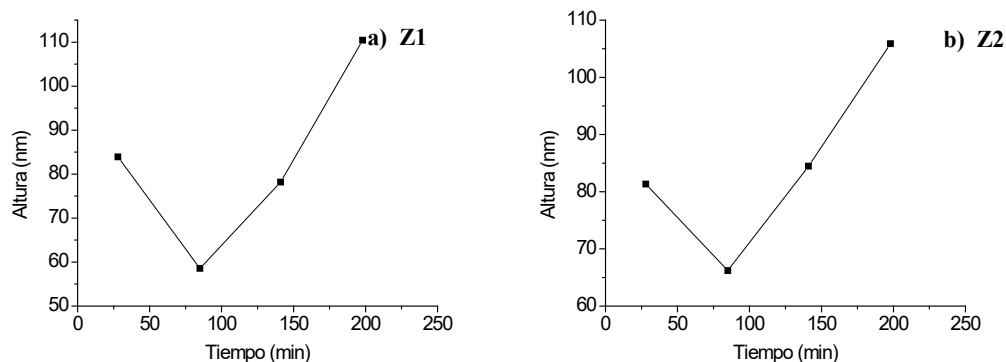


Figura 9.39 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

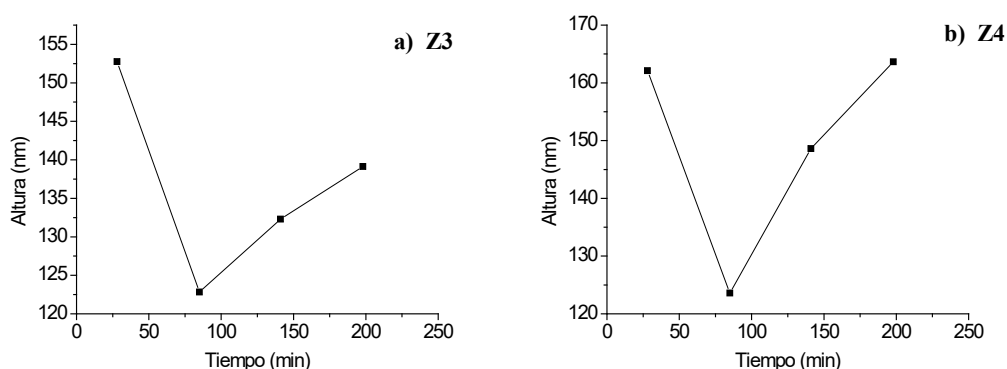


Figura 9.40 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo A. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

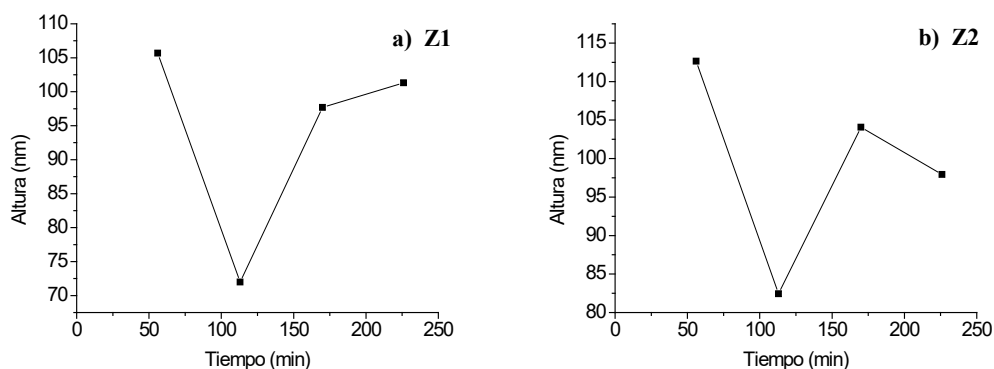


Figura 9.41 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 1 del Grupo B. a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

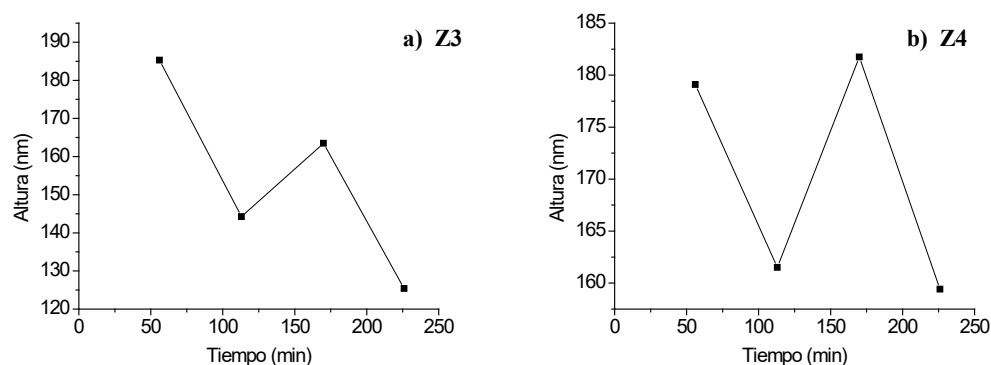


Figura 9.42 Disolución vertical de la superficie del cálculo renal de acuerdo a la Sección 2 del Grupo B.

a) altura entre el marcador central (negro) y el marcador izquierdo (rojo). b) Alturas entre el marcador central (negro) y el marcador derecho (verde).

Tabla 9.20 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo A.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
28-85	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
85-141	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
141-198	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo

Tabla 9.21 Disolución de la superficie de los perfiles para el Grupo B.

Intervalo de tiempo del tratamiento (min)	Z1	Z2	Z3	Z4
56-113	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior
113-170	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en el fondo
170-226	Mayor disolución en el fondo	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior	Mayor disolución en la parte superior

9.5.4 Estudio de Disolución a Partir de Vectores de Disolución

En este análisis se obtuvo para cada grupo de manera independiente, los vectores de disolución superficial para cada imagen obtenida en secuencia durante el experimento tal como se describe en la sección 6.2.6.

En la figura 9.43 se muestran las imágenes de AFM correspondientes al Grupo A. Los vectores azules (horizontales) 1 y 2, y los vectores rojos (verticales) 5 y 6, corresponden al corte de sección 1. Al corte de sección 2 corresponden los vectores azules (horizontales) 3 y 4, y los vectores rojos (verticales) 7 y 8.

Primero se muestra la superficie del cálculo renal después de 28 minutos de tratamiento con ácido cítrico (punto de partida para este análisis); después se muestra la cinética de disolución calculada para después de 85, 141 y 198 de tratamiento con las sustancia de prueba.

Esta misma metodología se sigue para analizar las imágenes del Grupo B, donde en la figura 9.44 se ve que la imagen obtenida después de 56 minutos es la que se toma de punto de partida para tener los vectores y también muestra la cinética de disolución obtenida para después de 113, 170, 226 y 284 minutos de tratamiento.

Las tablas 9.22 y 9.23 simplifican los resultados obtenidos para este análisis para los grupos de imágenes A y B respectivamente. En ellas se encuentran las magnitudes y direcciones de cada vector para cada intervalo de tiempo del tratamiento aplicado.

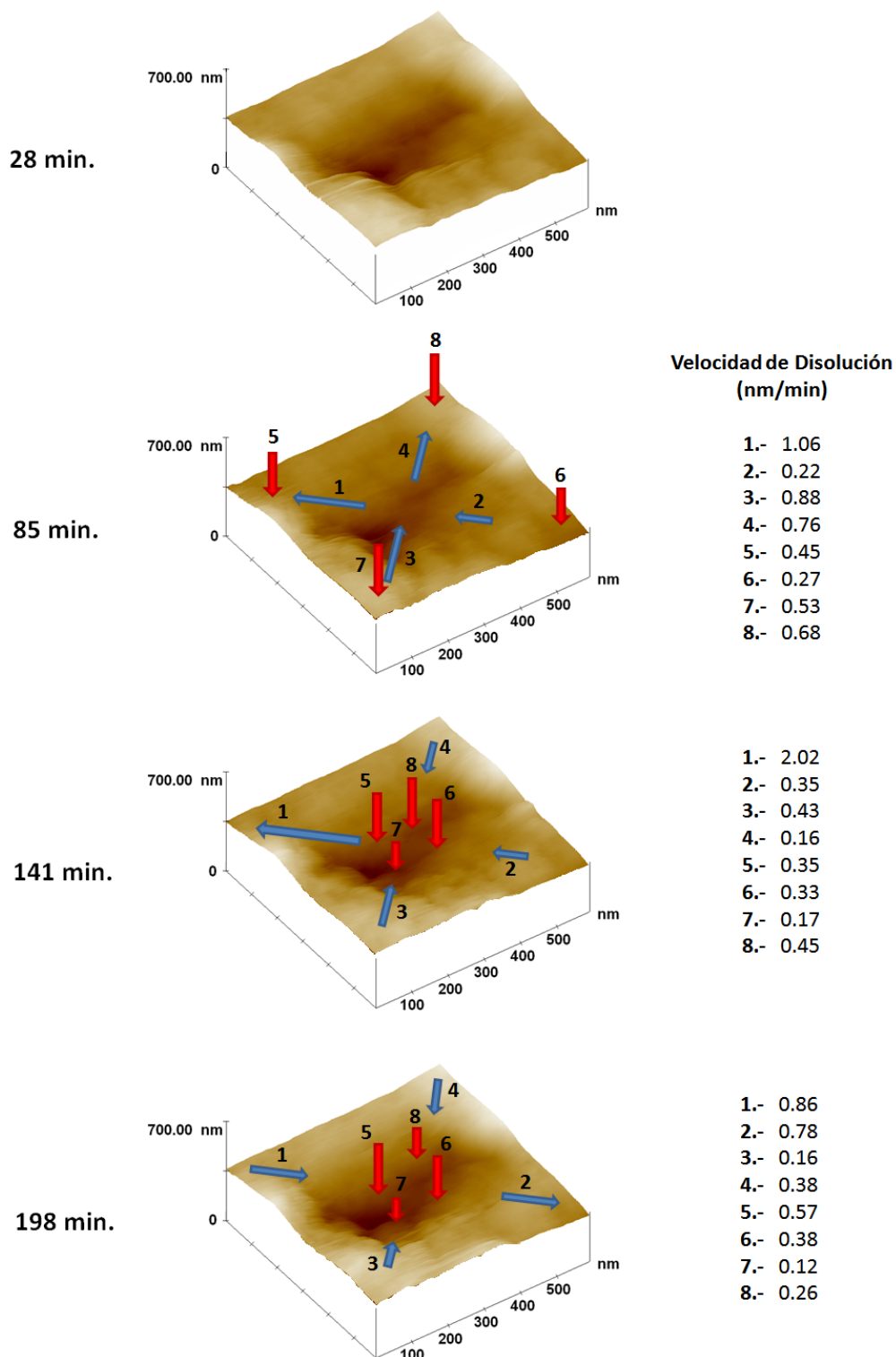


Figura 9.43 Imágenes 3D de AFM del Grupo A, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Ácido Cítrico.

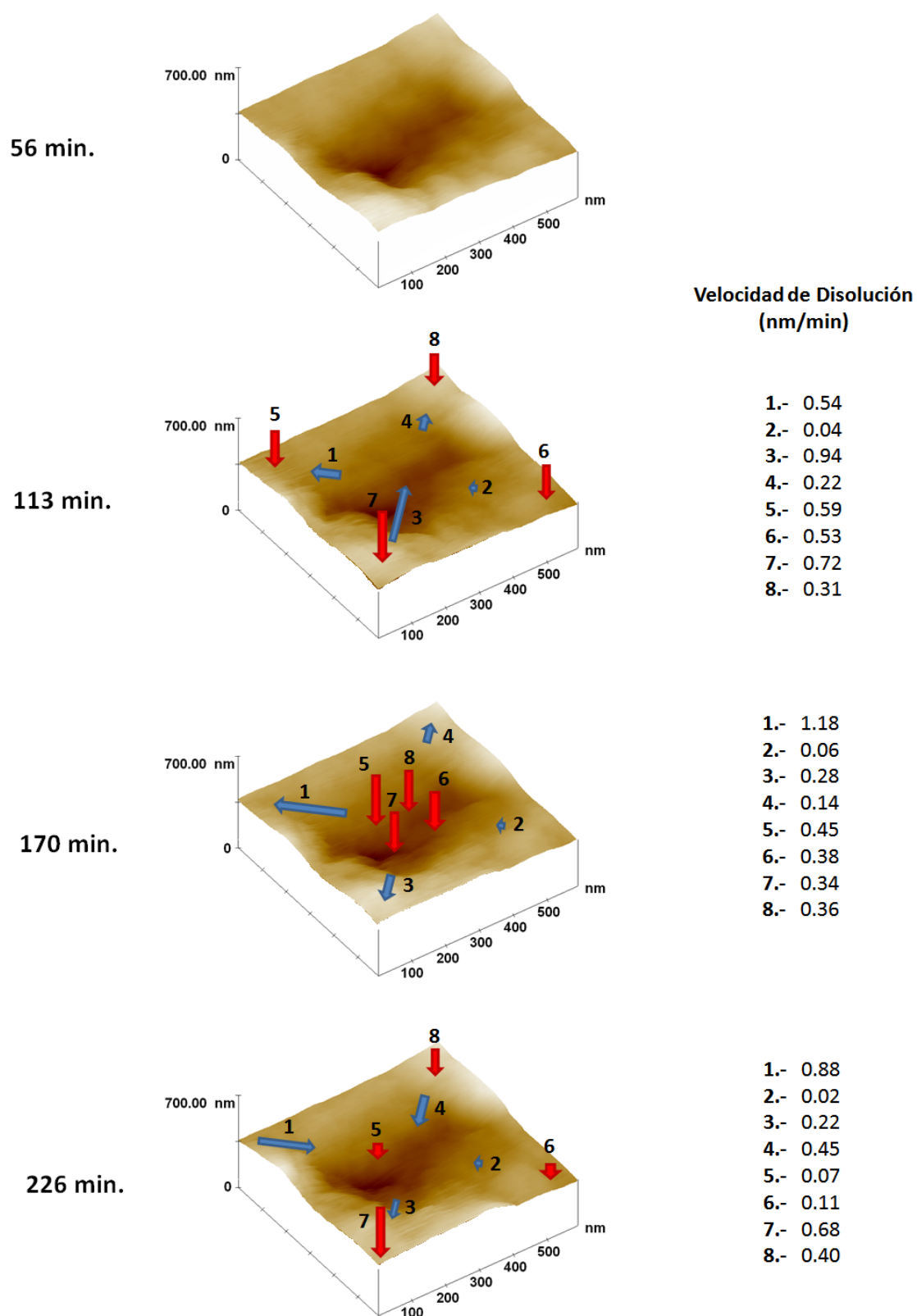


Figura 9.44 Imágenes 3D de AFM del Grupo B, que muestran los vectores de disolución superficial ocasionados por el tratamiento con la solución de Ácido Cítrico.

Tabla 9.22 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo A.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)			
	28-85 min	85-141 min	141-198 min
Vectores Horizontales			
Vector 1			
Dirección hacia:			
Dentro			0.86
Fuera	1.06	2.02	
Vector 2			
Dirección hacia:			
Dentro	0.22	0.35	
Fuera			0.78
Vector 3			
Dirección hacia:			
Dentro	0.88	0.43	0.16
Fuera			
Vector 4			
Dirección hacia:			
Dentro		0.16	0.38
Fuera	0.76		
Vectores Verticales			
Vector 5			
Zona de disolución:			
Alta	0.45		
Baja		0.35	0.57
Vector 6			
Zona de disolución:			
Alta	0.27		
Baja		0.33	0.38
Vector 7			
Zona de disolución:			
Alta	0.53		
Baja		0.17	0.12
Vector 8			
Zona de disolución:			
Alta	0.68		
Baja		0.45	0.26

Tabla 9.23 Recopilación de los vectores de velocidad de disolución superficial del cálculo renal de acuerdo a la duración del experimento para las imágenes del Grupo B.

Velocidades de disolución correspondientes a cada intervalo estudiado (nm/min)			
	56-113 min	113-170 min	170-226 min
Vectores Horizontales			
Vector 1			
Dirección hacia:			
Dentro			0.88
Fuera	0.54	1.18	
Vector 2			
Dirección hacia:			
Dentro	0.04	0.06	0.02
Fuera			
Vector 3			
Dirección hacia:			
Dentro	0.94		
Fuera		0.28	0.22
Vector 4			
Dirección hacia:			
Dentro			0.45
Fuera	0.22	0.14	
Vectores Verticales			
Vector 5			
Zona de disolución:			
Alta	0.59		
Baja		0.45	0.07
Vector 6			
Zona de disolución:			
Alta	0.53		0.11
Baja		0.38	
Vector 7			
Zona de disolución:			
Alta	0.72		0.68
Baja		0.34	
Vector 8			
Zona de disolución:			
Alta	0.31		0.40
Baja		0.36	

Las variaciones en las magnitudes de los vectores de disolución horizontal, indican que en ambos grupos de estudio la disolución no se lleva a cabo de manera homogénea; es decir, se realiza un proceso de disolución selectiva.

Los vectores de disolución vertical indican, para ambos grupos, un fenómeno de disolución muy marcado (debido a las grandes magnitudes) y ordenado (de acuerdo a que todos siguen un mismo comportamiento), en donde en ocasiones se disuelven las

partículas que forman los picos de la superficie y después, la disolución se concentra en los valles, siendo un proceso repetitivo en todos los puntos medidos.

9.6 COMPARACIÓN DE LOS FENÓMENOS DISOLUTIVOS OBSERVADOS EN LOS EXPERIMENTOS CON BASE EN ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA APLICADA A LOS VECTORES DE VELOCIDAD PROMEDIO DE DISOLUCIÓN.

Se obtuvieron las medidas estadísticas media y desviación estándar para las magnitudes de los vectores de velocidad promedio de disolución obtenidos para cada intervalo de tiempo de los experimentos (tablas 9.24 a 9.29). En este caso, la media sirve para describir de manera general el fenómeno de disolución ocasionado por la sustancia de prueba en la superficie del cálculo renal durante cada experimento; mientras que la desviación estándar describe la homogeneidad de la disolución observada entre los 4 vectores obtenidos para cada intervalo de tiempo.

Tabla 9.24 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 1 con alopurinol.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
28-85	1.855	1.38856	0.1675	0.1982213
85-141	0.3025	0.2506492	0.2525	0.2403296
141-198	0.8925	0.6957191	0.3175	0.2260347

Tabla 9.25 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 1 con alopurinol.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
56-113	0.775	0.3388707	0.2225	0.1307351
113-170	0.8925	1.177126	0.1325	0.1512999
170-226	1.21	0.7468601	0.0825	8.539125E-02

Tabla 9.26 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 2 con alopurinol.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
28-85	1.3075	1.496204	0.115	0.05
85-141	1.2925	1.717622	0.08	4.242641E-02
141-198	0.38	0.3289377	0.23	0.1449138
198-255	0.835	0.7171006	0.14	0.1283225
255-313	1.025	0.5996388	0.15	0.1293574

Tabla 9.27 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 2 con alopurinol.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
56-113	0.72	0.8950605	0.1675	0.131244
113-170	2.65	3.169574	0.0875	0.1102648
170-226	0.735	0.6099454	0.0925	7.410578E-02
226-284	0.375	0.4074719	0.0875	4.193249E-02

Tabla 9.28 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo A del Experimento 3 con ácido cítrico.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
28-85	0.73	0.3616628	0.4825	0.1707581
85-141	0.74	0.8608136	0.325	0.1159023
141-198	0.545	0.3316122	0.3325	0.1906786

Tabla 9.29 Recopilación de la estadística descriptiva obtenida para los vectores de velocidad promedio de disolución del Grupo B del Experimento 3 con ácido cítrico.

Intervalo de tiempo del experimento (min)	Magnitud de los vectores horizontales		Magnitud de los vectores verticales	
	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)	Media (nm/min)	Desviación estándar (nm/min)
56-113	0.435	0.3950949	0.5375	0.1711481
113-170	0.415	0.5180412	0.3825	4.787135E-02
170-226	0.3925	0.3694478	0.315	0.284312

Recordando que de manera indirecta, mientras mayor sea la magnitud de un vector horizontal de velocidad promedio de disolución indica una menor uniformidad en la disolución superficial de las partículas; al comparar los valores máximos de las medias obtenidas para los vectores correspondientes a cada experimento, se puede observar que el efecto disolutivo ocasionado por el alopurinol es menos uniforme que el ocasionado por el ácido cítrico; ya que en ambos casos donde se empleó alopurinol, la media máxima obtenida sobrepasa de 1 nm/min, mientras que con ácido cítrico el valor máximo se conserva por debajo de 0.75 nm/min.

Siguiendo el mismo análisis, se observa que cuando la superficie del cálculo renal tratado es menos rugosa, su disolución se lleva a cabo de manera más selectiva; ya que al comparar las medias obtenidas para los vectores horizontales de los 2 casos donde se uso alopurinol, hay valores mayores en los resultados obtenidos para el Experimento 2 donde la rugosidad fue menor que la estudiada en el Experimento 1.

La desviación estándar de las magnitudes de los vectores horizontales de velocidad promedio de disolución nos muestra que entre los puntos de altura máxima y mínima estudiados para cada intervalo de tiempo, hay una mayor uniformidad en la disolución de las partículas que forman la superficie del cálculo renal al usar ácido cítrico para disolverlas, que cuando se usa alopurinol.

Para el caso de los vectores verticales de velocidad promedio de disolución, hay que recordar que magnitudes pequeñas indican de manera indirecta que los puntos de altura máxima y mínima se disolvieron a velocidades similares; por lo tanto se observa al comparar las medias resultantes, que en el caso donde se utilizó ácido cítrico el proceso del fenómeno de disolución se lleva a cabo de manera más discriminatoria entre los puntos de altura máxima y mínima (la media varía entre 0.315 y 0.53 nm/min), que en los casos donde se utilizó alopurinol como sustancia de prueba (la media varía entre 0.08 y 0.317 nm/min). Escrito en otras palabras, cuando se utilizó alopurinol se observa un fenómeno de disolución en el que para cada intervalo de tiempo los puntos máximos y mínimos se disuelven a velocidades relativamente similares, pudiendo observar que dentro de la superficie del cálculo renal no se presenta una disolución tan marcada de todos los puntos de altura máxima o de todos los puntos de altura mínima, a diferencia del ácido cítrico que en cada intervalo de tiempo del experimento disuelve en mayor medida o todos los puntos de altura máxima, o todos los puntos de altura mínima de la superficie.

Al comparar las desviaciones estándar de las magnitudes de los vectores verticales de velocidad promedio de disolución obtenidos para cada experimento, se observa que en cada caso existen diferencias en la disolución de los puntos estudiados, pero no indican procesos de disolución distintos al compararlos entre experimentos; por lo tanto, aunque los fenómenos de disolución ocasionados por ambas sustancias se llevan a cabo de maneras diferentes, ninguno de los 2 se realiza con la misma intensidad en toda la superficie.

10. DISCUSIÓN

En los trabajos donde se ha estudiado la disolución de cristales de oxalato de calcio crecidos *in vitro*, solo se han enfocado en los efectos inhibitorios de algunas sustancias y la manera en que detienen o afectan el crecimiento de los mismos, pero en esos trabajos no se ha tomado en cuenta el efecto que podría tener en la disolución de un cálculo renal real la presencia de la matriz de materiales orgánicos que forma el cálculo la cual puede afectar de manera importante el efecto disolutivo de las sustancias que han probado.

La metodología planteada en el presente trabajo para el estudio de la disolución de los cálculos renales permite conocer de manera general el efecto de disolución de la superficie de un cálculo renal real por medio de la medición de la rugosidad RMS y observar los cambios que sufre en el tiempo; además permite conocer la cinética de dichos cambios, ya que se permite estudiar de que manera afecta la sustancia de prueba algunos puntos específicos de la superficie.

Aunque la topografía superficial del cálculo renal es muy rugosa y el microscopio de fuerza atómica está diseñado para el estudio de superficies que sean a simple vista casi planas; de los experimentos realizados en aire (experimento 1 y 2), se determinó que es posible obtener imágenes tridimensionales con AFM de la superficie sin pulir de un cálculo renal, localizando una zona de estudio con la superficie lo más regular posible, y cuantificar algunos parámetros de su topografía como la rugosidad. La rugosidad del cálculo renal varía de una región a otra, ya que se pudo ver que antes de empezar los experimentos con Té de Cola de Caballo y con Alopurinol la rugosidad RMS medida en la superficie fue de 42.188 nm y 62.291 nm respectivamente.

En las imágenes obtenidas en el experimento 1, tratando el cálculo con Té de Cola de Caballo, se ven cambios en la morfología de la superficie del cálculo renal para los diferentes tiempos de tratamiento. Como las imágenes no se obtuvieron exactamente del mismo sitio, estos cambios se pueden deber a que la topografía del cálculo varía mucho entre regiones cercanas; o posiblemente lo que se observa son los cambios ocasionados por un efecto disolutivo del Té.

Suponiendo que la topografía superficial del cálculo no varía mucho entre regiones contiguas; se puede medir la rugosidad de la superficie como parámetro descriptivo de su morfología y cuantificar el efecto disolutivo que tuvo el Té de Cola de Caballo en la zona de estudio. De esta manera se muestra que la rugosidad no varía a una

velocidad constante; de tal forma que si existe un fenómeno disolutivo, no se lleva a cabo de una misma manera para todo el tiempo de exposición al Té.

Parece que el Té, primero fractura la superficie del cálculo formando hoyos debido al desprendimiento de algunas partículas; y luego vuelve a aplanar la superficie al desprender las partículas que se encontraban adheridas, tal vez con una fuerza mayor que las primeras, pero que quedaron al descubierto al volverse las partes sobresalientes de la superficie. Es posible que este proceso de disolución se repita después de tiempos prolongados de exposición del cálculo renal al agente disolutivo.

Al igual que con el experimento con el Té de Cola de Caballo, es posible que la solución de Alopurinol utilizada haya tenido un efecto disolutivo en el cálculo renal que se puede cuantificar midiendo la rugosidad de la superficie y calculando sus cambios en el tiempo. Se pudo observar que es posible que la velocidad del fenómeno de disolución no sea constante en el tiempo.

Del experimento realizado en aire con Alopurinol (experimento 2), se determinó que el primer efecto ocasionado en este cálculo en particular, es la generación de hoyos en la topografía superficial debido al desprendimiento de algunas partículas. Después de un tiempo prolongado, el Alopurinol fractura la superficie en partículas más pequeñas y la aplanar al desprender aquellas que sobresalen por encima de las demás.

Usando de manera directa la metodología desarrollada para el uso de AFM en aire; se puede concluir de manera preliminar, que el Té de Cola de Caballo y el Alopurinol ocasionan un efecto disolutivo en la superficie de este cálculo renal en particular. Sin embargo, aunque en ambos experimentos se eligió una zona de estudio de la superficie del cálculo, esto no garantiza que las imágenes hayan sido obtenidas del mismo punto entre un tiempo de exposición al tratamiento y otro; por lo tanto, se necesitó plantear una metodología para realizar los experimentos *in vitro* y poder observar, de manera continua, el fenómeno de disolución que provoque cualquier sustancia de prueba en la superficie del cálculo renal y entender su mecanismo de acción. La metodología desarrollada para estudiar la disolución de la superficie de un cálculo renal con AFM en líquido, permite observar y cuantificar en el tiempo los cambios ocasionados por una sustancia en la superficie de un cálculo renal sin pulir.

Se observó en los experimentos realizados con AFM en líquido (experimentos 3, 4 y 5), que el fenómeno de disolución presente en la superficie del cálculo renal, consiste en un proceso continuo de disolución selectiva que consiste en el desprendimiento de las partículas pertenecientes a los picos y valles de la topografía; ocasionando cambios en la

rugosidad del cálculo en todas las superficies estudiadas. No es un fenómeno que se lleve a cabo de manera homogénea en toda la superficie del cálculo renal, y se pudieron observar diferencias de un experimento a otro.

El Alopurinol se probó en 2 superficies del cálculo que presentaron diferente rugosidad al inicio de los experimentos. En el primer caso, la rugosidad RMS fue de 26.023 nm, mientras que para el otro fue de 15.015 nm. Pareciera que esta diferencia afectó de manera significativa el desempeño del alopurinol; ya que en la superficie más plana los cambios se ocasionaron a una velocidad menor. En otras palabras, sobre una superficie plana el efecto disolutivo del Alopurinol es menor que en una superficie un poco mas rugosa. Sin embargo, se observa un fenómeno de disolución similar en ambos experimentos y se puede decir, que es un fenómeno repetible en mayor o menor medida en cualquier zona de la superficie de este cálculo renal en particular.

Al comparar los resultados obtenidos con el Alopurinol y el Ácido Cítrico, se observan claras diferencias en la cinética del fenómeno de disolución superficial ocasionado por las diferentes sustancias. En la figura 10.1 se muestra como la disolución ocasionada por el Ácido Cítrico sigue una secuencia en la que el desprendimiento de partículas en determinado tiempo de tratamiento se localiza en las zonas altas de la superficie ó en las zonas de menor altura; mientras que el alopurinol puede disolver en un mismo intervalo de tiempo tanto picos como valles de la superficie del cálculo renal.

En los experimentos en líquido (*in vitro*) se ve claramente el efecto disolutivo que ocasionó en la superficie del cálculo renal la solución de Alopurinol, lo que indica que los cambios observados en la rugosidad RMS en el experimento en aire utilizando la misma sustancia no se debieron a que las imágenes no se obtuvieron exactamente del mismo punto, lo que era una posibilidad antes de realizar los experimentos en líquido. Por lo tanto se puede decir, que el Té de Cola de Caballo también produce un efecto disolutivo en la superficie del cálculo renal; aunque no se conoce aún exactamente la cinética del proceso disolutivo que ocasiona.

También se demostró que hay diferencias en la manera en que una sustancia disuelve la superficie del cálculo dependiendo de su rugosidad. En el trabajo realizado por H. H. Dorian *et al* [22], muestran por AFM, que la estructura de un cálculo renal está formada por anillos concéntricos que parecen formar regiones de diferente “porosidad”. Estas diferencias las correlacionan con diferencias en la densidad de empaquetamiento o por las direcciones en que se acomodan las estructuras al formar el cálculo renal. Por lo

tanto, una sustancia que sea utilizada para el tratamiento de la litiasis renal, no disolverá de la misma manera cualquier capa del cuerpo del cálculo.

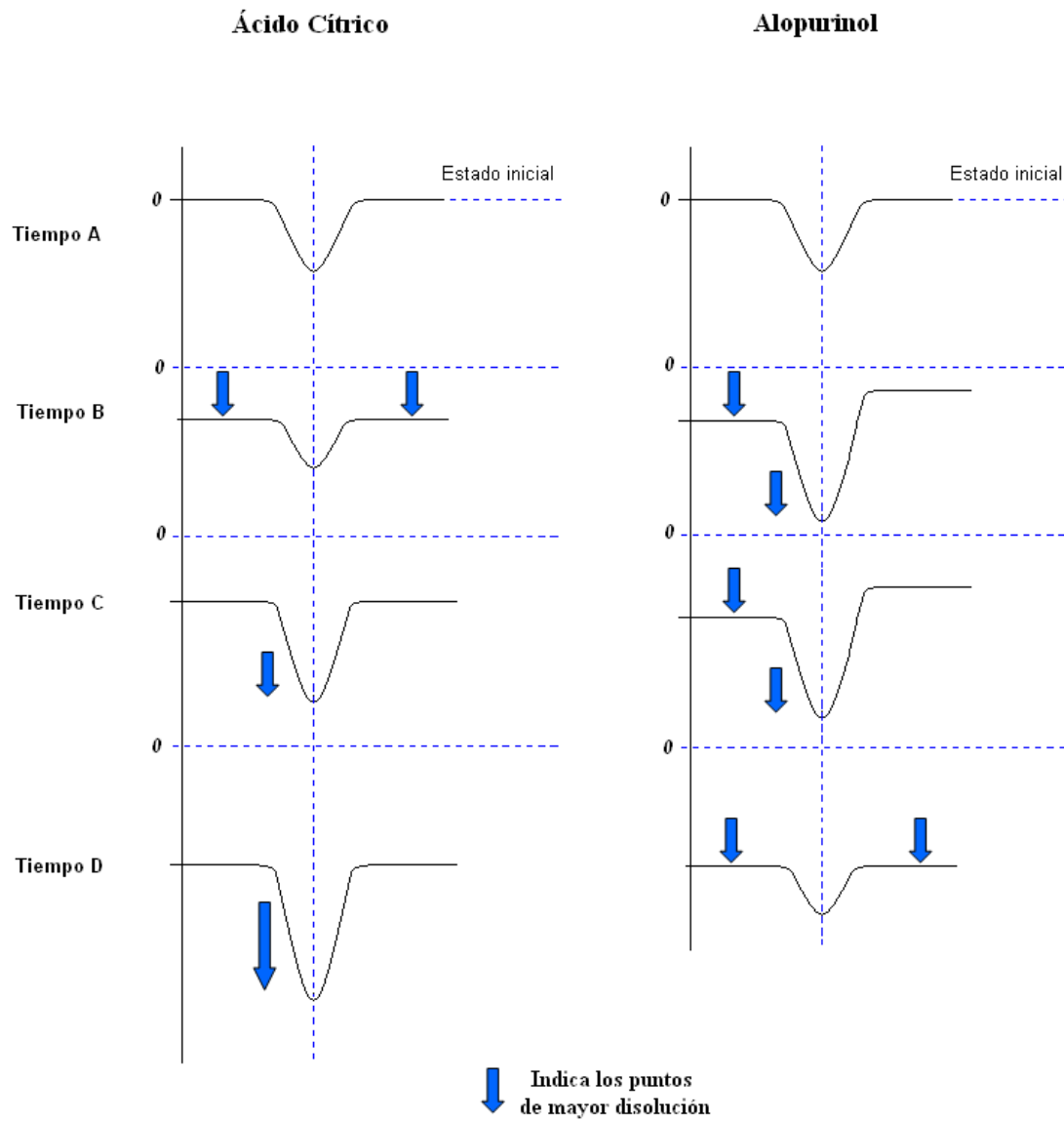


Figura 10.1 Diagramas que ejemplifican las diferencias entre el fenómeno de disolución superficial ocasionado por el Ácido Cítrico y por el Alopurinol.

11. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la cinética de la biomineralización de los cálculos renales y la manera en que ciertas sustancias inhibidoras detienen o afectan dicho crecimiento, en experimentos con cristales de oxalato de calcio crecidos *in vitro*. En este trabajo se comprobó que es posible estudiar la disolución de los cálculos renales por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM); viendo el problema de la biomineralización de los cálculos desde la perspectiva de como disolverlos ya que se han formado en un paciente que sufra de litiasis. Se desarrolló una metodología para estudiar la disolución de los cálculos renales utilizando AFM, así como una metodología para analizar las imágenes obtenidas con el microscopio y poder extraer valiosa información que empieza a revelar la cinética desconocida del fenómeno de disolución de los cálculos renales por el efecto de una sustancia; dando un paso hacia delante para el diseño de tratamientos efectivos y no invasivos basado en el suministro de diferentes sustancias y medicamentos. Por lo tanto, se pudo comprobar la hipótesis planteada al iniciar la presente investigación, así como lograr todos los objetivos que cubren la extensión de la presente tesis.

12. PERSPECTIVAS

La metodología planteada en el presente trabajo se puede usar en estudios futuros para probar el efecto disolutivo que ocasione cualquier sustancia que se quiera probar, cuestionando si diferentes concentraciones ocasionan distintos efectos; ¿De qué manera afecta un cambio de pH en la orina la biomineralización de los cálculos renales?; ¿Qué sustancia disuelve un cálculo renal de manera más eficiente?; ¿El empleo de diferentes sustancias para el tratamiento de la litiasis renal podría disolver de manera eficiente un cálculo de tal manera que el paciente pudiera expulsarlo fácilmente en la orina?.

Para cualquier estudio futuro donde se emplee esta metodología, se recomienda utilizar un software para el procesamiento de imágenes que permita obtener de manera automática un mayor número de perfiles de las imágenes de la superficie del cálculo renal y poder analizar los resultados por medio de estadística inferencial, para de esta manera poder disminuir los efectos aleatorios del análisis y observar si existen tendencias estadísticas para el fenómeno disolutivo que ocasionen las diferentes sustancias probadas. De esta manera el análisis de los resultados se haría aún más robusto. También se puede complementar los resultados que se obtengan con AFM, al utilizar otras herramientas para realizar un análisis de la disolución de los cálculos renales. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia de rayos X, que permite obtener simultáneamente imágenes ópticas de una superficie, con un análisis elemental de un solo punto y un mapeo completo de los elementos que componen una muestra.

ANEXO 1. Datos de la extracción del cálculo renal utilizado en los experimentos.

El cálculo renal fue extraído quirúrgicamente por el doctor Sergio Ureta Sánchez (cédula profesional: 187208) del Servicio de Urología del Hospital Español en la Ciudad de México D.F., al paciente con número de expediente 458884.

Dr. Sergio E. Ureta Sánchez

UROLOGIA - URODINAMIA

EJERCITO NACIONAL # 617 - DESP. 802
TORRE DE CONSULTORIOS
HOSPITAL ESPAÑOL
MEXICO, D.F. 11520

México, D. F: a 30 de Agosto del 2006.

A QUIEN CORRESPONDA:

El paciente [REDACTED] padece de enfermedad litiasica con múltiples cálculos en riñón derecho y uno de 1.5 x 1 cm de diámetro todos radiopacos de forma elíptica. El paciente fue sometido en una primera sesión a Leoch (Litotripsia Extracorpóreal de Onda de Choque) el día 21 de abril del 2006 con aplicación previa de catéter doble "J". la técnica fue emplear 2500 golpes de 18 kwatts al cálculo mayor y 1500 golpes al resto, sin embargo sólo se fragmentaron los cálculos de menor dimensión y cálculo mayor radiopaco ovoideo no recibió ninguna fragmentación. Ante la advertencia de que pudiera ocurrir esta condición desde el día que se practicó la cirugía de Leoch, ahora vemos en la placa simple la presencia del cálculo mayor prácticamente sin ninguna modificación y existen múltiples fragmentos residuales que pueden ser expulsados de manera espontánea al retirar el catéter doble "J", sin embargo existe la necesidad de extraer el cálculo mayor por otro procedimiento quirúrgico ya sea laparoscopico o con una mini lumbotomía y después de la cicatrización extraer el catéter doble "J".

Se extiende la presente para los fines que mi paciente considere, pertinentes.

Atentamente

Dr. Sergio E. Ureta Sánchez

Dr. Sergio E. Ureta Sánchez

UROLOGIA - URODINAMIA

EJERCITO NACIONAL # 617 - DESP. 802
TORRE DE CONSULTORIOS
HOSPITAL ESPAÑOL
MEXICO, D.F. 11520

México, D. F. a 18 de septiembre del 2006.

A quien corresponda:

El señor [REDACTED] quien fue sometido a ***Ureteropielolitotomía derecha*** el día martes 5 de septiembre de 2006. Se le intentó extraer el catéter doble "J" en el consultorio el día 15 de septiembre de 2006 y no fue posible por haberse roto el hilo distal. Ante esta situación se decidió extraer el catéter doble "J" el día lunes 18 de septiembre a las 10:00 hrs. en cirugía ambulatoria con anestesia general. El catéter presentó algunas calcificaciones que dificultaron su extracción, sin embargo se extrajo de manera total.

El señor [REDACTED] debe permanecer con incapacidad al menos por esta semana del 18 al 24 de septiembre del 2006.

Sin más por el momento, me pongo a sus ordenes.

Atentamente

Dr. Sergio E. Ureta Sánchez

ANEXO 2. Datos de la punta para AFM *tapping mode* utilizada en los experimento en aire

Veeco Probes

Your Source for SPM Probes and Accessories

RTESP - Tap300 Metrology Probes

Tip Specification

Geometry: Anisotropic

Tip Height: 15 μ m - 20 μ m

Front Angle: 15°

Back Angle:

Side Angle: 17.5°

Tip Radius (Nom.): <10nm

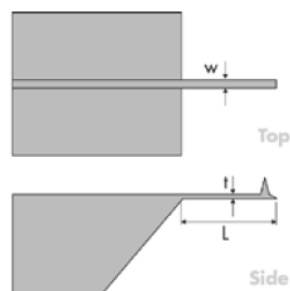
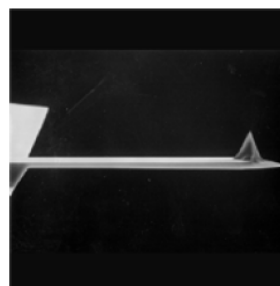
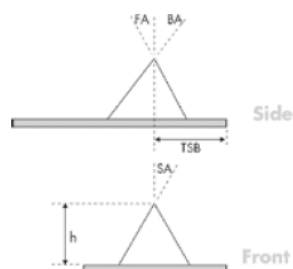
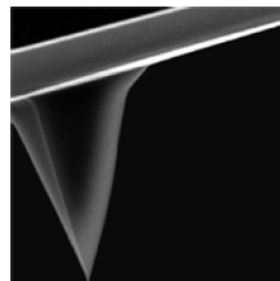
Tip Radius (max.): 12.5nm

Tip Set Back (Nom.): 15 μ m

Tip Set Back (Rng.): 5 μ m - 25 μ m

Notes:

This probe uses an "on scan angle" symmetric tip to provide a more symmetric representation of features over 200nm.



Cantilever Specifications

Material: Phosphorus (n) doped Si

Thickness, Nominal: 4 μ m

Thickness, Range: 3.5 μ m - 4.5 μ m

Notes:

Shape	Length (μ m)			Width (μ m)			Freq. (kHz.)			k (N/m)		
	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.
A Rectangular	125	115	125	35	30	40	300	200	400	40	20	80

Model No.	Aurora / Lumina	Automated	BioScope	Caliber / Explorer	CP	CP-II	Dimension	Dimension XYZ	EnviroScope	Multimode	Qty.	Price
RTESP			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	10	
RTESPW			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	375	

ANEXO 3. Datos de la punta para AFM *contact mode*, utilizada en los experimentos en líquido.

Veeco Probes

Your Source for SPM Probes and Accessories

NP - NP Series Probes

Tip Specification

Geometry: Cast

Tip Height: $2.5\mu\text{m}$ - $3.5\mu\text{m}$

Front Angle: 35°

Back Angle:

Side Angle: 35°

Tip Radius (Nom.): 20nm

Tip Radius (max.): 60nm

Tip Set Back (Nom.): $4\mu\text{m}$

Tip Set Back (Rng.): $3\mu\text{m}$ - $5.5\mu\text{m}$

Tip Tilt Compensation:

Spike Height (Nom.):

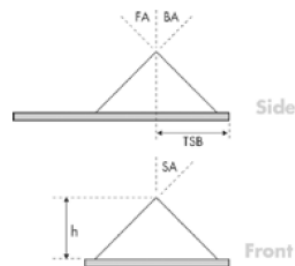
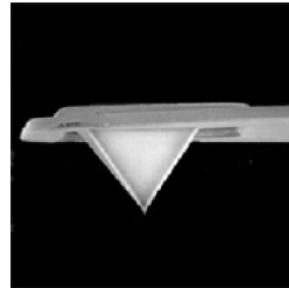
Spike Height (Rng.):

SpikeW:

SpikeW (Rng.):

Overhang:

Effective Neck:



Notes:

The DNP and the NP are general purpose Silicon Nitride cantilevers. Part Number Key: [D]NP[G]-[S,0,TT,UC] [D] - Optional: the D designator indicates less than 2 deg. of cantilever bend. "D" products should be used for the Dimension product line. The nominal NP stress specification is less than 4 deg. of cantilever bend. [G] - Optional: FRONTSIDE gold coating. [S] - Optional: indicates the tip has been oxidation sharpened, [0] - Optional: indicates the device is "tipless", [TT] - Optional: indicates a sharpened twin tip, [UC] - Optional: no metal coating on either side of the device. The angle between the lever leg and the cantilever edge is 62 degrees $\pm$ 1.

Cantilever Specifications

Material: Silicon Nitride

Thickness, Nominal: $0.6\mu\text{m}$

Thickness, Range: $0.4\mu\text{m}$ - $0.7\mu\text{m}$

Front Side Coating

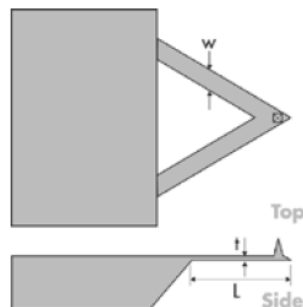
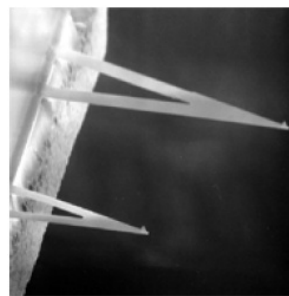
Bottom Layer:

Top Layer:

Back Side Coating:

Bottom Layer: 15nm of Cr

Top Layer: 60nm of Au



Notes:

Shape	Length (µm)			Width (µm)			Freq. (kHz.)			k (N/m)		
	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.
A Triangular	115	100	115	25	20	30	57	40	75	0.58		
B Triangular	196	180	196	41	33	49	20	14	26	0.12		
C Triangular	115	100	115	17	13	21	56	40	75	0.32		
D Triangular	196	180	196	23	18	28	18	12	24	0.06		

Model No.											Qty.	Price
	Aurora / Lumina	Automated	Bio Scope	Caliber / Explorer	CP	CP-II	Dimension	Dimension XYZ	Enviro scope	Multimode		
NP			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	500	
NP-20			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	20	
NP-1			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	100	
NP-10			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	10	

ANEXO 4. Rugosidad

La rugosidad es un concepto que se usa en topografía para describir la irregularidad de las superficies. El análisis de la rugosidad permite encontrar parámetros de desigualdad (rugosidad) en toda la imagen (superficie) y evalúa variaciones en la altura “Z” (ver figura A4.1). El método para la estimación de la rugosidad se basa en el siguiente planteamiento: en un terreno uniforme (poco rugoso), los vectores perpendiculares a la superficie del mismo serán aproximadamente paralelos y, en consecuencia, presentarán una dispersión baja (mide variaciones en la dimensión Z). Al contrario, en un terreno rugoso, los cambios de pendiente y orientación harán que dichos vectores presenten una dispersión mayor [39,40].

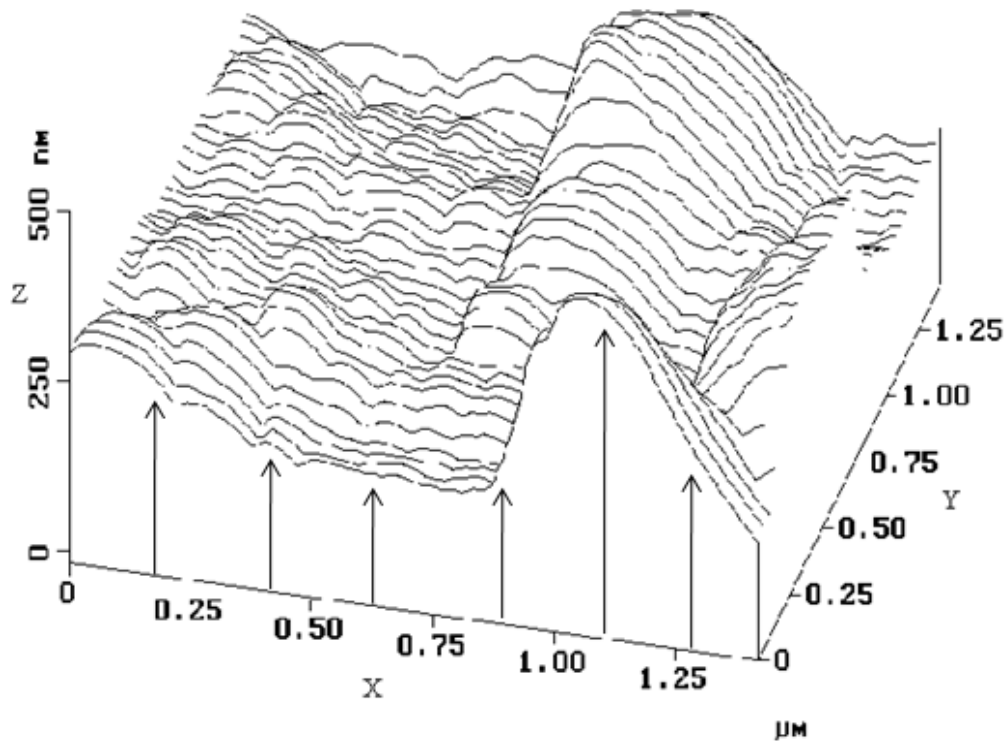


Figura A4.1 Análisis de rugosidad. Evaluación de las variaciones en la altura medida (vector Z)

La rugosidad esta representara por R_q (RMS) (root-mean-square), que es la desviación estándar del total de las alturas medidas, dada por la siguiente ecuación [41]:

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum (Z_i)^2}{n}}$$

Donde Z_i es el valor corriente de la Altura medida Z, y n es el número de puntos dentro de la imagen.

ANEXO 5. ANÁLISIS DE SECCIÓN

El software del nanoscope permite realizar análisis de sección en las imágenes de AFM que se obtienen en cualquier posición y dirección en la que se desee obtener un perfil de la superficie. En la figura A5.1 se ilustran los perfiles obtenidos a partir de diferentes cortes de sección hechos a una imagen [41].

En la figura A5.2, se observa el análisis de sección realizado a una imagen de AFM. Ahí se obtuvo un perfil del que se obtienen mediciones de altura y distancia (entre otras) entre los marcadores que pueden ser colocados en cualquier punto de interés.

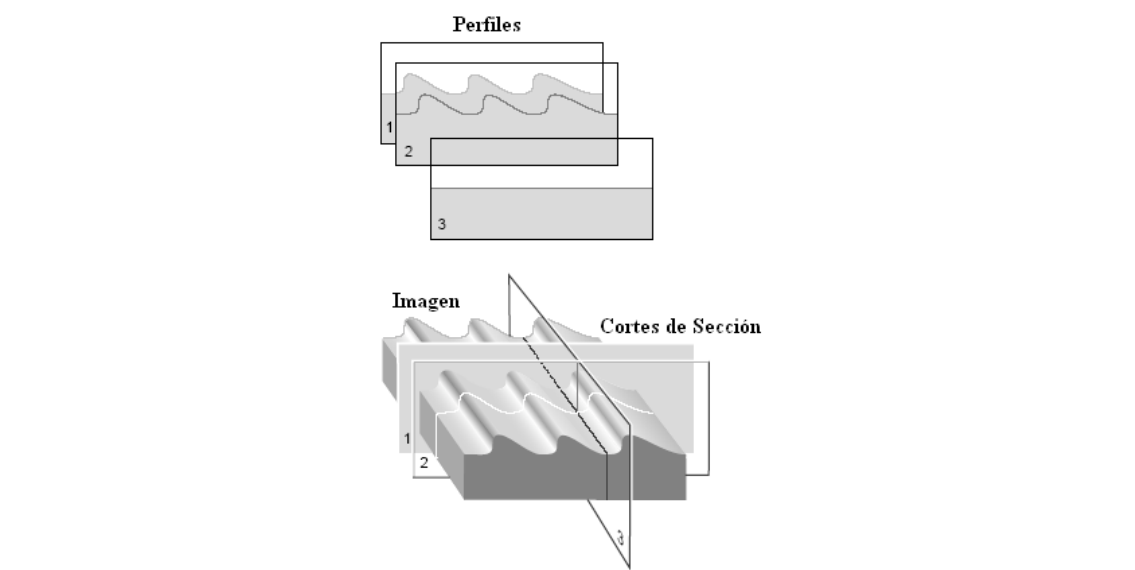


Figura A5.1 Imagen con 3 cortes de sección y sus perfiles resultantes.

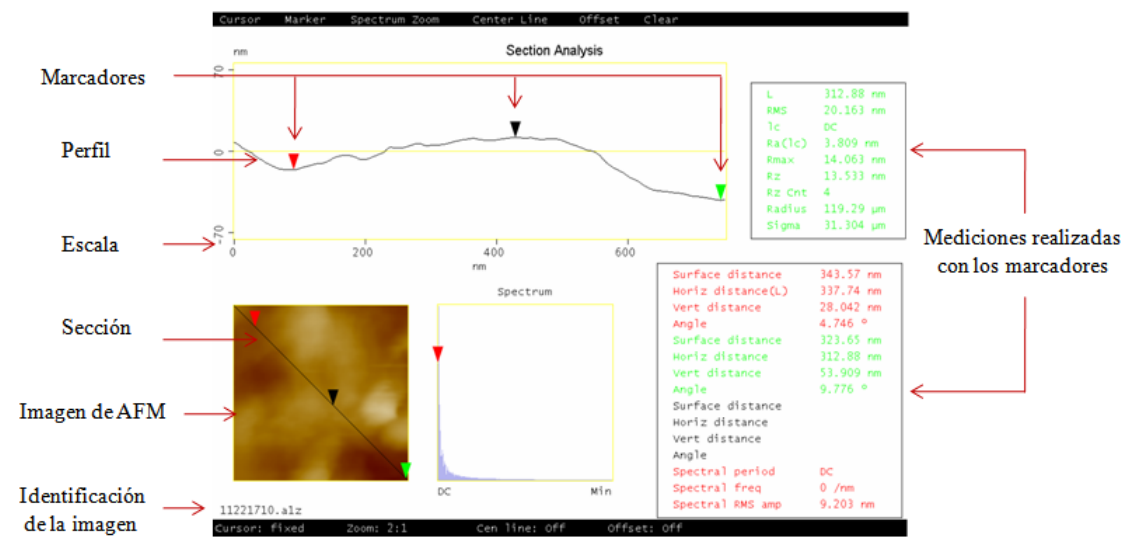


Figura A5.2 Análisis de Sección para una imagen de AFM. Tamaño de la imagen: 530 x 530 nm

REFERENCIAS

- [1] Estrada J., D.; Martínez T., J.; Cruz R., L; (2005) Litiasis urinaria en la atención primaria. Revista de la Facultad de Medicina. 48(5):187-190.
- [2] Medina E., M.; Real de León, E.; Orozco R., S. (2002) Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México para litiasis urinaria. Salud Pública de México. 44(6):541-545.
- [3] Estadística de egresos hospitalarios del sector público del Sistema Nacional de Salud, 2003. Salud pública Méx. (2004), 46(5):464-487.
- [4] Biomineralization, Medical aspects of solubility. (2006) Editado por Erich Königsberger and LanChi Königsberger. Editorial Wiley.
- [5] Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU., “Medline Plus”. Revisión en ingles realizada por Robert Mushnick, M.D., (2005). Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000458.htm>
- [6] Gaona, J. L.; Valero, F.; Gómez, P. (2002) Litiasis urinaria en la práctica clínica. Urología colombiana. 11(1):27-45
- [7] Pemberton J. (1987) Extra-corporeal shock wave lithotripsy. Postgraduate Medical Journal 63:1025-1031.
- [8] Nicole L. M., James E. L. (2007) Management of kidney stones. British Medical Journal 334(7591):468-472.
- [9] Laboratorios Veldecasas, S. A. Diccionario de especialidades farmacéuticas (2004) Disponible en: <http://www.libreriamedica8a.com/productos/1179.htm>
- [10] Glaxosmithkline México, S.A. de C.V. Ziloprim. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/36612.htm
- [11] Nefrología clínica 2da. Edición, J. M. Castrillo.
- [12] Ibarz S., L.; Conte V., A.; Arzoz F., M.; Ruíz M., F.J. (2006) Tratamiento Médico de la Litiasis Renal. Annals d’Urología. 6(4):1-16.
- [13] Harkins, K. J. (2000) What’s the use of cranberry juice?. Age Ageing. 29:9 - 12.

- [14] Qiu, S. R.; Wierzbicki, A.; Orme, C. A.; Cody, A. M.; Hoyer, J.R.; Nancollas, G. H.; Zepeda, S.; De Yoreo, J. J. (2004) Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate. PNAS. 101(7):1811-1815.
- [15] Rennie, G. (2006) Mimicking nature's crystalline structures. Science & Technology Review. 4-10.
- [16] Anónimo (2003) Antiguo recetario medicinal Azteca. Ed. Época, S.A. de C.V. pp 42.
- [17] Jung, T.; Sheng, X.; Choi, C. K.; Kim, W.; Wesson, J. A.; Ward, M. D. (2004) Probing crystallization of calcium oxalate monohydrate and the role of macromolecule additives with in situ atomic force microscopy. Langmuir. 20:8587 – 8596.
- [18] Bruce J. A., Sandersius S. (2005) Analysis of the cristal structure of oxalate kidney stones. Artículo original. Disponible en: http://www.spsnational.org/programs/awards/2005/ugr_asu.pdf
- [19] Petrova, E. V.; Gvozdev, N. V.; Rashkovich, L. N. (2004) Growth and dissolution of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials. 6(1):261-268
- [20] De Yoreo, J. J.; Qiu, S. R.; Hoyer, J. R. (2006) Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. Am J Physiol Renal Physiol. 291:F1123-F1132.
- [21] Sheng, X.; Ward, M. D.; Wesson, J. A.. (2005) Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. J Am Soc Nephrol. 16:1904-1908.
- [22] Dorian, H. H.; Rez, P.; Drach, G. W. (1996) Evidence for aggregation in oxalate stone formation: Atomic force and low voltage scanning electron microscopy. The Journal of Urology. 156:1833-1837.
- [23] Sandersius S., Rez P. (2007) Morphology of crystals in calcium oxalate monohydrate kidney stones. Urological Research. 35(6):287-293.
- [24] Principles of Human Physiology. William J. German, Cindy L. Stanfield. Editorial Benjamin Cummings.
- [25] Principios de anatomía y fisiología. Tortora, Grabowski. Editorial Oxford.
- [26] Gibson R. I. Mineralogy of kidney stones. Disponible en: <http://www.gravmag.com/kstones.html>
- [27] Grases, F.; Costa-Bauza, A.; Prieto, R. M. (2006) Renal litiasis and nutrition. Nutrition Journal 5:23. Disponible en: <http://www.nutritionj.com/content/5/1/23>

- [28] Rodríguez, A. O.; Cadena, M.; Azpiroz, J.; Gutiérrez, J.; Bustos, J.; Castaño, E.; Loske, A. M. (2005) Computed tomography of kidney stones for extracorporeal shock wave lithotripsy” Manuscrito. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. México, D.F.
- [29] Binning G., Quate C.F. y Gerber Ch. (1986) Atomic Force Microscopy, Physical Review Letters, 56(9):930-933.
- [30] Techical Publications of Digital Instruments (2001). Electrochemical SPM.
- [31] Tapia T., M. (2005) Análisis microtopográfico de la línea celular HeLa por microscopia de fuerza atómica. Tesis para aspirar al grado de Maestro en biomedicina y biotecnología molecular. Programa en Biomedicina y Biotecnología Molecular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- [32] Giessibl, F. J. (2005) AFM’s path to atomic resolution. Materials Today. 8(5):32-41.
- [33] Técnicas de microscopía de sonda de barrido para caracterización de superficies. Martha Gómez. Disponible en: <http://www.sincompromisos.com/Documentos/L-TX/Tipos-Lineas-Transmision.pdf>
- [34] Yip, C. M.; DeFelippis, M. R.; Frank, B. H.; Brader, M.L.; Ward, M. D. (1998) Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by atomic force microscopy: Evidence of hydrophobically driven assembly. Biophysical Journal. 75:1172–1179.
- [35] Mao, G.; Lobo, L.; Scaringe, R.; Ward, M. D. (1997) Nanoscale visualization of crystal habit modification by atomic force microscopy. Chem. Mater. 9:773–783.
- [36] Chistopher M.; Yip; Ward, M. D. (1996) Atomic force microscopy of insulin single crystals: Direct visualization of molecules and crystal growth. Biophysical Journal. 71:1071–1078.
- [37] Ramírez, M. A.; Cadena, M.; Ureta, S.; Batina, N. (2007) Metodología para el estudio de la disolución de cálculos renales usando microscopía de fuerza atómica (AFM). IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health. 18(5):623-626.
- [38] Rez, P.; Fong, H.; Sarikaya, M. (2002) Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy of the Ring Structures in Human Calcium Oxalate Urinary Stones. Microscopy and Microanalysis, Quebec City, Canada, 4-8.
- [39] Hinojosa R., M.; Reyes M., M. E. (2001) La rugosidad de las superficies: Topometría. Ingenierías 4(11):27-33

[40] Paramo G., U. (2001) Preparación y caracterización de películas de PPy en electrodos de carbón para la reducción de cromo hexavalente en medio acuoso: estudio electroquímico y por AFM. Tesis para aspirar al grado de Maestro en Química. Área de Electroquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

[41] Technical Publications of Digital Instruments (2001) Nanoscope Command Reference Manual.