



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ingeniería Biomédica

**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO
TISULAR POR ESTIMULACIÓN
ELÉCTRICA DE UN SISTEMA DE
ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA**

Comunicación de Resultados para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS (Ingeniería Biomédica) de

JAVIER PINZÓN TODD

Diciembre 2007

ASESOR Dr. EMILIO SACRISTÁN ROCK

JURADO

Dr. Emilio Sacristán Rock
Profesor Titular – Posgrado en Ingeniería Biomédica
Departamento de Ingeniería Eléctrica

Dr. Mario García Lorenzana
Profesor Titular – Posgrado en Ciencias Biológicas
Departamento de Biología de la Reproducción

Dr. César A. González Díaz
Universidad del Ejército y Fuerza Aérea
Escuela Militar de Graduados de Sanidad

UAM – Iztapalapa, MÉXICO

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y mentor, el Dr. Emilio Sacristán Rock por su asesoría en la realización de este trabajo y por su apoyo y guía en el desarrollo de mi carrera profesional.

Agradezco al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, por su colaboración en el proceso experimental de este trabajo. En particular, al departamento de patología, al Dr. Alberto Aranda por su dedicación en la revisión histopatológica de las muestras e interpretación de los resultados y al técnico Benito Chávez por su ayuda en el procesamiento histológico de las muestras biológicas, así como al Bioterio por la donación de animales a la UAM Iztapalapa.

Al CONACyT y a la empresa Innovamédica en el financiamiento de mis estudios. En particular a mis compañeros de Innovamédica el Ing. Carlos Galván-Duque por su apoyo en el acondicionamiento del espectrómetro de impedancia y su apoyo en la realización de los experimentos y a los Ingenieros Vanessa Galván y Carlos Rodríguez por su apoyo en la realización del estudio experimental animal.

A los profesores de la UAMI, el M.C. Miguel Cadena por su apoyo moral y asesoría durante toda mi estancia en la UAMI y al Dr. Mario García Lorenzana, por sus consejos y enseñanzas en el estudio de la histología.

Agradezco infinitamente a mis padres, por su apoyo incondicional, por el gran amor que siempre me han dado y por su ejemplo de vida que me ha impulsado a cumplir mis metas y objetivos.

INDICE

INDICE	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	III
INDICE DE GRÁFICAS	IV
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPÓTESIS	3
1.2. OBJETIVO GENERAL	3
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. ANATOMÍA DEL TRACTO DIGESTIVO	4
2.2. MONITOREO DE LA MUCOSA GASTROINTESTINAL	8
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA IMPEDANCIA DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS	12
2.3.1. <i>Propiedades Eléctricas de los Materiales Dieléctricos</i>	12
2.3.2. <i>Conceptos Básicos de las Bioimpedancias</i>	13
2.3.3. <i>Las Dispersiones en los Tejidos Biológicos</i>	14
2.4. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA	16
2.5. EL SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA DESARROLLADO	18
2.6. DAÑO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA	22
2.7. MECANISMOS DE DAÑO BIOFÍSICO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA (CHOQUE ELÉCTRICO)	27
2.8. PATRONES MORFOLÓGICOS DE LA INFLAMACIÓN AGUDA	31
2.9. TÉCNICAS DE MEDICIÓN HISTOPATOLÓGICA	32
3. METODOLOGÍA	35
3.1. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETIVO	35
3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	35
3.2.1. <i>Criterios de inclusión</i>	35
3.2.2. <i>Criterios de exclusión</i>	36
3.2.3. <i>Ubicación espacio temporal</i>	36
3.2.4. <i>Diseño Experimental</i>	36
3.2.5. <i>Especificación de variables</i>	36
3.2.6. <i>Procedimiento</i>	36
3.2.7. <i>Procesamiento de las muestras biológicas</i>	40
3.2.8. <i>Caracterización del daño por quemadura</i>	40
3.2.9. <i>Clasificación del daño por quemadura</i>	42
3.2.10. <i>Análisis Estadísticos</i>	42
4. RESULTADOS	44
4.1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	44
4.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	52
4.3. EFECTOS DE LOS FACTORES DE ESTIMULACIÓN EN LA MUCOSA GÁSTRICA, MEDIANTE EL NIVEL DE DAÑO. 56	
4.3.1. <i>Factor de Frecuencia (F), interacción entre el tiempo y la corriente</i>	57
4.3.2. <i>Factor de Corriente (I), interacción entre el tiempo y la Frecuencia</i>	61
4.4. AMPLITUD DE ESPECTROS DE IMPEDANCIA DE LA MUCOSA GÁSTRICA.	63
5. DISCUSIÓN	65
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL NIVEL DE DAÑO	65
5.2. DATOS EXPERIMENTALES	65

5.3.	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA).....	66
5.4.	ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ESTIMULACIÓN EN LA MUCOSA GÁSTRICA, MEDIANTE EL NIVEL DE DAÑO. 67	
5.5.	DETECCIÓN DE UMBRAL DE DAÑO.....	69
6.	CONCLUSIONES.....	70
6.1.	TRABAJOS FUTUROS.....	71
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8.	ANEXO 1.....	76

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CAPAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL [10]. REPRODUCIDA DE GARTNER SIN AUTORIZACIÓN	5
FIGURA 2.2 (A): IMAGEN DE ESÓFAGO. OBSÉRVESE QUE LA LUZ ESTÁ RECUBIERTA POR EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO (X17). TOMADO DE W.B. SAUNDERS.....	6
FIGURA 2.3. A, FOTOMICROGRAFÍA DE LA MUCOSA DEL FONDO DEL ESTÓMAGO (X 132). B, FOTOMICROGRAFÍA DE LAS GLÁNDULAS FÚNDICAS (X270), C CÉLULA PRINCIPAL; M, CÉLULA MUCOSA DEL CUELLO; P, CÉLULA PARIETAL	7
FIGURA 2.4 FOTOMICROGRAFÍA DE LA MUCOSA DUODENAL (X132)). Y FOTOMICROGRAFÍA DE COLON DE MONO (X132).....	7
FIGURA 2.5 PATOGÉNESIS DE FALLA MÚLTIPLE DE ÓRGANOS Y PAPEL FUNDAMENTAL.....	10
FIGURA 2.6 COMPORTAMIENTO DE LA PERMITIVIDAD DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS (SCHWAN,, 1957). 15	15
FIGURA 2.7. SONDA DE MEDICIÓN CON SISTEMA DE CUATRO ELECTRODOS PARA LA MEDICIÓN DE LA IMPEDANCIA COMPLEJA DEL TEJIDO. LA FUENTE DE CORRIENTE PRODUCE UNA EXCITACIÓN SENOIDAL CONSTANTE EN EL TEJIDO A TRAVÉS DE LOS DOS ELECTRODOS EXTERIORES. LAS MEDICIONES COMPLEJAS DE VOLTAJE SE REALIZAN MEDIANTE LOS DOS ELECTRODOS INTERIORES.	19
FIGURA 2.8. IMAGEN REAL FINAL DEL INSTRUMENTO DE MEDICIÓN Y LA SONDA DESECHABLE PARA EVALUACIÓN CLÍNICA DESARROLLADA POR INNOVAMÉDICA Y FABRICADA POR TYCO.	20
FIGURA 2.9. IMAGEN REAL FINAL DE LA SONDA DESECHABLE DESARROLLADA POR INNOVAMÉDICA Y FABRICADA POR TYCO (DIÁMETRO 16 FR).	20
FIGURA 2.10. UMBRAL DE PERCEPCIÓN [1].....	25
FIGURA 2.11. RELACIÓN ENTRE EL ÁREA DEL ELECTRODO Y EL UMBRAL DE PERCEPCIÓN [1].	26
FIGURA 2.12. IEEE ESTÁNDARES DE NIVELES DE SEGURIDAD CON RESPECTO A EXPOSICIONES A CAMPOS MAGNÉTICOS DE RADIO FRECUENCIA, 3 KHZ TO 300 GHZ [8].	27
FIGURA 2.13. PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR [43].	28
FIGURA 2.14 MAGNITUD DE IMPEDANCIA DE TEJIDO MUSCULAR EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE PULSOS ELÉCTRICOS INYECTADOS. IZQUIERDO: CADA CURVA REPRESENTA UN VOLTAJE DISTINTO, CON PULSOS DE DURACIÓN CONSTANTE DE 10 MS. DERECHO: LA DURACIÓN DEL PULSO ES DIFERENTE EN CADA CURVA, MIENTRAS QUE EL VOLTAJE ES CONSTANTE A 120 V/CM. ORIGINAL DE BHATT Y COPIADA Y TRADUCIDA SIN AUTORIZACIÓN DE LEE, ZHANG Y HANNING [30].	30
FIGURA 2.15. PATRONES HISTOLÓGICOS DE LA INFLAMACIÓN AGUDA. A, INFLAMACIÓN SEROSA. B, INFLAMACIÓN FIBRINOSA. UNA TRAMA ROSADA DE EXUDADO DE FIBRINA (F) CUBRA LA SUPERFICIE PERICÁRDICA (P). C, INFLAMACIÓN SUPURATIVA. UN ABSCESO BACTERIANO EN EL MIOCARDIO. D, ÚLCERACIÓN. IMAGEN DE UNA ÚLCERA DUODENAL. COPIADO DE COTRAN Y COLLINS [38], SIN AUTORIZACIÓN.....	32
FIGURA 3.1. IDENTIFICACIÓN DEL ÍLEON DE RATA.	38
FIGURA 3.2. INTRODUCCIÓN DE LA SONDA POR VÍA QUIRÚRGICA EN EL INTESTINO DELGADO.	38
FIGURA 3.3. SONDA DE MEDICIÓN COLOCADA Y EN CONTACTO COMPLETO CON LA PARED DEL ÍLEON. 39	39

FIGURA 3.4. TOMA DE MUESTRA BIOLÓGICA ESTIMULADA.	39
FIG. 3.5. IMAGEN DE ÍLEON DE RATA CON QUEMADURA NIVEL 2. SE IDENTIFICA CLARAMENTE UNA ZONA LOCALIZADA DE CÉLULAS QUERATINIZADAS (SIN NÚCLEOS), IDÉNTICO A UN EXUDADO FIBROSO JUSTO DONDE SE REALIZÓ LA ESTIMULACIÓN . (H-E, X40)	41
FIGURA 3.6. SE SEÑALA LA PARTE DISTAL DE LAS VELLOSIDADES QUE FUERON EXPUESTAS AL ESTÍMULO ELÉCTRICO, LAS CÉLULAS SE OBSERVAN QUERATINIZADAS, Y SE ALCANZA A VER UN BARRIMIENTO DE CROMATINAS. (H-E, X100)	41
FIGURA 4.1 FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 0. SE OBSERVA TODAS LAS VELLOSIDADES INTACTAS, SE OBSERVAN CLARAMENTE CÉLULAS EPITELIALES CILÍNDRICAS, ALGUNAS CÉLULAS CALCIFORMES, EL TEJIDO CONECTIVO DE LA LÁMINA PROPIA Y GLÁNDULAS EN LA ZONA DE LAS CRIPTAS. NO SE REGISTRA NINGÚN TIPO DE LESIÓN O DAÑO. (H-E. X100)	45
FIGURA 4.2. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 1, DAÑO SUPERFICIAL. SE OBSERVAN CLARAMENTE DOS ZONAS AFECTADAS QUE ABARCAN ENTRE 4 Y 6 VELLOSIDADES, TANTO ARRIBA COMO ABAJO. SE ENCUENTRAN CÉLULAS QUERATINIZADAS SIN NÚCLEO Y UN DESPRENDIMIENTO DEL TEJIDO EPITELIAL EL CUAL DEJA TRAS DE SÍ EL MOLDE CELULAR DE LA LÁMINA PROPIA. TÉCNICA H-E. AMPLIACIÓN X10	46
FIGURA 4.3. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 1, DAÑO SUPERFICIAL. ESTA ES LA MISMA FOTOGRAFÍA QUE LA ANTERIOR PERO CON ESTA AMPLIACIÓN SE MUESTRA CON MAYOR CLARIDAD EL TEJIDO EPITELIAL QUERATINIZADO Y DESPRENDIDO DE LA LÁMINA PROPIA. (H-E, X100)	47
FIGURA 4.4. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 2, DAÑO DEL TERCIO DISTAL DE LA VELLOSIDAD. EN ESTE CORTE SE OBSERVA QUE SE ALCANZA A DAÑAR TEJIDO EPITELIAL Y LÁMINA PROPIA, AFECTANDO AL TERCIO DISTAL DE LA VELLOSIDAD. SE MUESTRAN CÉLULAS QUERATINIZADAS, Y UN APELMAZAMIENTO O COÁGULO AMORFO CONFORMADO POR FIBRINA (EXUDADO FIBRINOSO) RESULTADO DE LA INFLAMACIÓN AGUDA. (H-E, X100)	48
FIGURA 4.5. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 3, DAÑO DEL TERCIO INTERMEDIO DE LA VELLOSIDAD. EN ESTE CORTE SE OBSERVA CLARAMENTE LA TRANSICIÓN BRUSCA ENTRE LA MUCOSA NORMAL Y LA MUCOSA LESIONADA. SE OBSERVAN LESIONES EN TEJIDO EPITELIAL Y EN LA LÁMINA PROPIA, AFECTANDO HASTA AL TERCIO INTERMEDIO DE LA VELLOSIDAD. SE OBSERVA UN GRAN COÁGULO AMORFO QUE ES LA GRAN TRAMA ROSADA DE EXUDADO DE FIBRINA. (H-E, X10)	49
FIGURA 4.6. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON NIVEL 4, DAÑO DEL TERCIO BASAL DE LA VELLOSIDAD. EN ESTE CORTE SE OBSERVAN VELLOSIDADES DAÑADAS HASTA LA ZONA DE LAS GLÁNDULAS, AFECTANDO TEJIDO EPITELIAL Y LÁMINA PROPIA. COMO EN LOS OTROS NIVELES DONDE SE ENCUENTRA DAÑO, HAY APELMAZAMIENTO DE CÉLULAS QUERATINIZADAS O EXUDADO DE FIBRINA. TAMBIÉN SE OBSERVAN ARTEFACTOS CORRESPONDIENTES A LA TÉCNICA HISTOLÓGICA. (H-E, X100)	50
FIGURA 4.7. FOTOGRAFÍA DEL ÍLEON DE RATA CON DAÑO ISQUÉMICO. A DIFERENCIA DEL DAÑO CARACTERIZADO POR COAGULACIÓN, EL DAÑO ISQUÉMICO NO ES LOCALIZADO EN UNA ZONA CLARAMENTE DELIMITADA, SINO SE EXTIENDE POR TODA LA MUCOSA GASTROINTESTINAL. SE OBSERVA MUERTE CELULAR POR FALTA DE NÚCLEO, MÁS NO SE MUESTRAN COÁGULOS AMORFOS DE FIBRINA RESULTADO DE UNA INFLAMACIÓN AGUDA, SINO UNA DESINTEGRACIÓN PAULATINA DE LAS VELLOSIDADES, COMENZANDO POR LAS PUNTAS. (H-E, X10)	51

INDICE DE TABLAS

TABLA 2.1. RANGOS DE FRECUENCIA, APLICACIONES MÁS COMUNES Y EL EFECTO DAÑINO ASOCIADO. REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DE LEE, ZHANG Y HANNING. BIOPHYSICAL INJURY MECHANISMS IN ELECTRICAL SOC TRAUMA [30].	23
TABLA 2.2. CORRIENTES DE RF INDUCIDAS POR CONTACTO [8].	26

TABLA 2.3. MODOS DE DAÑO TISULAR EN TRAUMA ELÉCTRICO. TRADUCIDA Y REPRODUCIDA SIN AUTORIZACIÓN DE LEE, ZHANG Y HANNING. BIOPHYSICAL INJURY MECHANISMS IN ELECTRICAL SHOCK TRAUMA [30].	29
TABLA 4.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA DEL NIVEL DE DAÑO A DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRIENTE, FRECUENCIA Y TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. OBSERVE QUE LA VARIACIÓN DEBIDA A LA CORRIENTE ES MUCHO MAYOR QUE LOS DEMÁS FACTORES (P<0.0001). SE UTILIZÓ EL SOFTWARE DE ESTADÍSTICA COMERCIAL NCSS.	53
TABLA 4.2. RELACIÓN DE LAS μ DE DAÑO REGISTRADAS CON F = 0.215 KHZ, EN CINCO NIVELES DE CORRIENTE Y EN 3 NIVELES DE TIEMPO. INDICANDO EL ERROR ESTÁNDAR DE CADA GRUPO. (N = 3)	57
TABLA 4.3. RELACIÓN DE LAS μ DE DAÑO REGISTRADAS CON F = 2.15 KHZ, EN CINCO NIVELES DE CORRIENTE Y EN 3 NIVELES DE TIEMPO. INDICANDO EL ERROR ESTÁNDAR DE CADA GRUPO. (N = 3)	58
TABLA 4.4. RELACIÓN DE LAS μ DE DAÑO REGISTRADAS CON F = 21.5 KHZ, EN CINCO NIVELES DE CORRIENTE Y EN 3 NIVELES DE TIEMPO. INDICANDO EL ERROR ESTÁNDAR DE CADA GRUPO. (N = 3)	59
TABLA 4.5 RELACIÓN DE LAS μ DE DAÑO REGISTRADAS CON F = 215 KHZ, EN CINCO NIVELES DE CORRIENTE Y EN 3 NIVELES DE TIEMPO. INDICANDO EL ERROR ESTÁNDAR DE CADA GRUPO. (N = 3)	60

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 4.1 MEDIAS DE LOS PROMEDIOS DEL NIVEL DE DAÑO AGRUPADOS POR NIVEL DE CORRIENTE. NO SE REGISTRA NINGÚN DAÑO A 1 Y 2.5 MÁ. CLARAMENTE SE OBSERVAN CAMBIOS INCREMENTALES EN EL DAÑO AL INCREMENTARSE LA CORRIENTE A PARTIR DE 10 MÁ. SE MUESTRAN LOS ERRORES ESTÁNDAR EN CADA UNO DE LOS GRUPOS DE CORRIENTES.	53
GRÁFICA 4.2 MEDIAS DE LOS PROMEDIOS DEL NIVEL DE DAÑO AGRUPADOS POR NIVEL DE FRECUENCIA. SE MUESTRAN LOS ERRORES ESTÁNDAR EN CADA UNO DE LOS GRUPOS DE FRECUENCIA. NO ES EVIDENTE UN CAMBIO EN LA IMPEDANCIA DEBIDO A LA FRECUENCIA.	54
GRÁFICA 4.3 MEDIAS DE LOS PROMEDIOS DEL NIVEL DE DAÑO AGRUPADOS POR NIVEL DE TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. SE MUESTRAN LOS ERRORES ESTÁNDAR EN CADA UNO DE LOS GRUPOS DE FRECUENCIA. NO ES EVIDENTE UN CAMBIO EN LA IMPEDANCIA DEBIDO AL TIEMPO.	55
GRÁFICA 4.4 EFECTOS DE LA CORRIENTE Y EL TIEMPO CON 0.215 KHZ DE ESTIMULACIÓN. NO SE REGISTRA NINGÚN DAÑO CON LAS CORRIENTES IGUAL A 1 Y 2.5 MÁ A NINGÚN TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVA UN CLARO INCREMENTO DEL DAÑO CONFORME INCREMENTA LA CORRIENTE.	57
GRÁFICA 4.5 EFECTOS DE LA CORRIENTE Y EL TIEMPO CON 2.15 KHZ DE ESTIMULACIÓN. NO SE REGISTRA NINGÚN DAÑO CON LAS CORRIENTES IGUAL A 1 Y 2.5 MÁ A NINGÚN TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVA UN CLARO INCREMENTO DEL DAÑO CONFORME INCREMENTA LA CORRIENTE.	58
GRÁFICA 4.6. EFECTOS DE LA CORRIENTE Y EL TIEMPO CON 21.5 KHZ DE ESTIMULACIÓN. NO SE REGISTRA NINGÚN DAÑO CON LAS CORRIENTES IGUAL A 1 Y 2.5 MÁ A NINGÚN TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVA UN CLARO INCREMENTO DEL DAÑO CONFORME INCREMENTA LA CORRIENTE.	59
GRÁFICA 4.7. EFECTOS DE LA CORRIENTE Y EL TIEMPO CON 215 KHZ DE ESTIMULACIÓN. NO SE REGISTRA NINGÚN DAÑO CON LAS CORRIENTES IGUAL A 1 Y 2.5 MÁ A NINGÚN TIEMPO DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVA UN MAYOR EFECTO A MAYOR TIEMPO DE ESTIMULACIÓN A EXCEPCIÓN DE LOS VALORES MEDIDOS A 25 MÁ, DONDE NO HAY NINGUNA DIFERENCIA EN EL DAÑO.	60
GRÁFICA 4.8. EFECTOS DEL TIEMPO Y LA CORRIENTE CON 10 MÁ DE ESTIMULACIÓN. SE PUEDE OBSERVAR UNA CLARA TENDENCIA DE INCREMENTO EN EL DAÑO CONFORME AUMENTA LA	

FRECUENCIA. NO SE OBSERVA UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL INCREMENTO DE DAÑO DEBIDO AL INCREMENTO EN EL TIEMPO DE ESTIMULACIÓN.	61
GRÁFICA 4.9. EFECTOS DEL TIEMPO Y LA CORRIENTE CON 25 mA DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVA QUE A BAJAS FRECUENCIAS EXISTE UNA MAYOR DISPERSIÓN QUE A ALTAS FRECUENCIAS, DONDE EL RESULTADO ES MUY HOMOGÉNEO.	62
GRÁFICA 4.10 EFECTOS DEL TIEMPO Y LA CORRIENTE CON 100 mA DE ESTIMULACIÓN. SE OBSERVAN NIVELES DE DAÑO MUY HOMOGÉNEOS EN TODO EL RANGO DE FRECUENCIAS Y EN TODOS LOS TIEMPOS.	62
GRÁFICA 4.11. MEDIAS DE LOS PROMEDIOS DE AMPLITUDES DE CADA TIEMPO AGRUPADAS POR FRECUENCIAS, CONSIDERANDO TAN SÓLO LA CORRIENTE DE 1 mA. SE PUEDE OBSERVAR QUE LA IMPEDANCIA ES MÁS BAJA CONFORME AUMENTA LA FRECUENCIA DE ESTIMULACIÓN. NO SE OBSERVA UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN RELACIÓN DIRECTA CON LAS FRECUENCIAS.	63
GRÁFICA 4.12. MEDIAS DE LOS PROMEDIOS DE AMPLITUDES DE CADA TIEMPO AGRUPADAS POR FRECUENCIAS, CONSIDERANDO TAN SÓLO LA CORRIENTE DE 2.5 mA. SE PUEDE OBSERVAR QUE LA IMPEDANCIA ES MÁS BAJA CONFORME AUMENTA LA FRECUENCIA DE ESTIMULACIÓN. NO SE OBSERVA UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO YA QUE AUNQUE SÍ ES EVIDENTE QUE A MAYOR TIEMPO, HAY UN MAYOR DAÑO, ESTE ES MÍNIMO Y LAS BARRAS DE ERROR SE TRASLAPAN.	64

RESUMEN

Este trabajo de investigación caracteriza el daño que sufre la pared de la mucosa gastrointestinal, mediante análisis histopatológicos, al inyectarse energía eléctrica bajo distintas condiciones, validando así los rangos seguros de energía inyectada por el sistema de medición diseñado.

Investigadores del laboratorio de Instrumentación del departamento de Ingeniería Eléctrica de la UAMI en conjunto con la empresa Innovamédica diseñaron y desarrollaron un espectrómetro de impedancia compleja para el análisis de daño y cambios estructurales en tejido gastrointestinal. Este sistema ya ha sido validado en animales para obtener información de condiciones normales o patológicas de tejidos y brindar información temprana de diagnóstico. El manejo de impedancias en material biológico, requiere que la densidad de corriente generada en la medición de la impedancia compleja, se limite a valores bajos, de tal forma que la estimulación no genere cambios en las características lineales de la impedancia ni mucho menos daño en el tejido medido. Según Schwan y Kay (1956), la densidad de corriente generada no debe ser mayor a 1 mA/cm^2 . Se han realizado muchas investigaciones para definir los niveles de energía de corriente eléctrica a los que un humano puede estar expuesto sin causar alteraciones estructurales o afectar las mediciones, sin embargo, los rangos definidos dependen además de la frecuencia y las características intrínsecas del tejido en cuestión, de la localización y geometría de los electrodos. Estos factores generan diferencias suficientemente significativas para evaluar por medio de modelos y pruebas “*in vivo*”, la seguridad de cada sistema médico.

El objetivo central de este estudio fue demostrar mediante un análisis histopatológico, la seguridad de los parámetros de densidad de corriente utilizados por el sistema. Identificando el umbral de energía en el que se comienza a causar daño y la posible interacción que existe entre los distintos factores que definen la densidad de corriente.

Se diseñó un experimento factorial, se caracterizó el daño causado por estimulación eléctrica o coagulativa y se obtuvieron 180 muestras de tejido intestinal previamente estimuladas, a las cuales se les asignó un nivel de daño. Se hizo un análisis de interacción entre los distintos factores y un análisis de varianza (ANOVA). Se confirmó que el daño por coagulación es distinto al daño por isquemia por lo que los valores de impedancia son distintos. Los resultados mostraron que las corrientes y sus factores de interacción programadas en el sistema de espectroscopía de impedancia no generan ningún daño a la mucosa gástrica con lo que se puede afirmar que los cambios en impedancia que mide son cambios debido a daño isquémico y no a daño generado por el instrumento.

1. INTRODUCCIÓN

Las mediciones de impedancia eléctrica en tejidos y sistemas biológicos se han utilizado en una gran variedad de aplicaciones. El valor de mediciones a una sola frecuencia es limitado, sin embargo, son útiles para diferenciar grandes cambios en conductividad, por ejemplo, para diferenciar sangre, de músculo, de aire, entre otros [1]. Para medir cambios estructurales en un solo tejido se emplea la espectroscopía de impedancia, que nos proporciona una información más completa de la estructura eléctrica, y más aún la espectroscopia de impedancia compleja nos presenta también información de fase, permitiéndonos separar los componentes resistivos y reactivos del tejido.

En particular, Kun y Peura [2] han propuesto el uso de la espectrometría de impedancia para medir cambios en niveles de isquemia o perfusión de tejidos. Para tal efecto, el equipo de investigación de este proyecto diseñó y desarrolló un espectrómetro de impedancia compleja para el análisis de daño y cambios estructurales en los tejidos del tracto gastrointestinal [3, 4], en el rango de dispersión β (1KHz-100KHz), el cual corresponde a la estructura tisular [5]. Este sistema ha sido desarrollado y validado en animales [6] para obtener información de condiciones normales o patológicas de tejidos y brindar información temprana de diagnóstico.

El sistema denominado “Monitor de Espectroscopia de Impedancia”, desarrollado por Othman [3] y validado por González [4] en la UAMI y por la empresa Innovamédica, se compone de dos partes principales: el sistema de control y procesamiento de información y una sonda nasogástrica que utiliza el sistema de cuatro electrodos para inyectar una corriente en el tejido y medir los cambios de impedancia en los tejidos estimulados.

El manejo de impedancias en material biológico, requiere que la densidad de corriente generada en la medición de la impedancia compleja, se limite a valores bajos, de tal forma que la estimulación no genere cambios en las características lineales de la impedancia ni mucho menos daño en el tejido medido. Según Schwan and Kay (1956), la

densidad de corriente generada no debe ser mayor a 1 mA/cm^2 [7]. Aún cuando el dispositivo diseñado ya cumple con estándares de regulación internacional en seguridad eléctrica, como son la norma BS EN 60601-1:1990 y ANSI/AAMI ES1:1993 que reducen los riesgos de daño por corriente, es necesario validar que el sistema de medición diseñado no inyecta niveles de energía superiores a los permitidos, de tal modo que la densidad de corriente nunca sea mayor a 1 mA/cm^2 .

Se han realizado muchas investigaciones para definir los niveles de energía de corriente eléctrica a los que un humano puede estar expuesto sin causar alteraciones estructurales o afectar las mediciones [8], sin embargo, los rangos definidos dependen además de la frecuencia y las características intrínsecas del tejido en cuestión, de la localización y geometría de los electrodos. Estos factores generan diferencias suficientemente significativas para evaluar por medio de modelos y pruebas “*in vivo*”, la seguridad de cada sistema médico.

Este trabajo de investigación busca caracterizar el daño que sufre la pared de la mucosa gastrointestinal mediante análisis histopatológicos al inyectarse energía eléctrica bajo distintas condiciones, validando así los rangos seguros de energía inyectada por el sistema de medición que se diseñó.

1.1. HIPÓTESIS

Si los niveles de intensidad de corriente (menores o iguales a 2.5 mA) y los tiempos de exposición (50 ms.) del sistema de espectroscopia de impedancia diseñado no inducen cambios en las características lineales de la impedancia, entonces resulta seguro en todo su rango de frecuencias.

1.2. OBJETIVO GENERAL

- Detectar, mediante análisis histopatológicos, el umbral de energía eléctrica en el que se comienza a causar un daño a la pared del tracto gastrointestinal al ser estimulada con la sonda de medición de impedancia.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el efecto que causan los diferentes factores de intensidad, frecuencia y tiempo de estimulación en la mucosa gastrointestinal.
- Caracterizar los cambios morfológicos que sufre la mucosa gástrica y sus espectros de impedancia asociados, mediante análisis de histopatología.
- Obtener una base de datos de imágenes de microscopía de la mucosa intestinal previamente estimulada a diferentes condiciones para evaluar los cambios estructurales que sufren los tejidos.
- Obtener una base de datos de espectros de impedancia compleja de la pared gastrointestinal al ser estimulada por el EIT.

2. ANTECEDENTES

2.1. ANATOMÍA DEL TRACTO DIGESTIVO

El aparato digestivo cumple con la función fundamental para la vida de dar sustento a cada una de las células que forman el organismo. Dicho aparato (gran parte del cual se denomina tracto gastrointestinal) mide unos nueve metros de longitud y en realidad es una especie de túnel sinuoso por el que deben pasar los alimentos ingeridos. Éstos, durante la mayor parte de un recorrido que se inicia en la boca y termina en el ano, son sometidos a la acción de diversos líquidos y enzimas, y agitados por una serie de movimientos musculares de contracción que en conjunto se conocen como peristaltismo [9].

El llamado tracto gastrointestinal se subdivide en regiones identificables desde el punto de vista morfológico: el esófago, el estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (ciego, colon, recto, conducto anal y apéndice) cada una de estas partes presenta uno o más estrechamientos llamados esfínteres que, a manera de válvulas, se abren y cierran según las diferentes etapas del proceso digestivo. [9, 10]

La histología del tracto gastrointestinal, a menudo se estudia en términos de cuatro capas amplias como puede apreciarse en la figura 2.1: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa (o adventicia). El estrato seroso es la cubierta externa del tracto gastrointestinal. En la mayor parte del tubo digestivo (estómago e intestinos) el estrato seroso consiste de una película delgada de tejido conectivo cubierta por el mesotelio (un tipo de epitelio escamoso que se encuentra en las cavidades del cuerpo); dentro de la cavidad peritoneal, a esta estructura se le ha descrito como peritoneo visceral. En la cavidad abdominal, la serosa a cada lado del tracto se une para formar una estructura suspensoria llamada mesenterio, el cual alberga los suministros nerviosos y vasculares al tracto gastrointestinal.

El estrato muscular provee al tracto gastrointestinal la habilidad de la motilidad. En la mayor parte del tubo digestivo, esta cubierta consiste de dos estratos delgados de músculo liso. Las fibras musculares en el estrato interior están alineadas circularmente, mientras que en el estrato exterior tienen una orientación longitudinal.

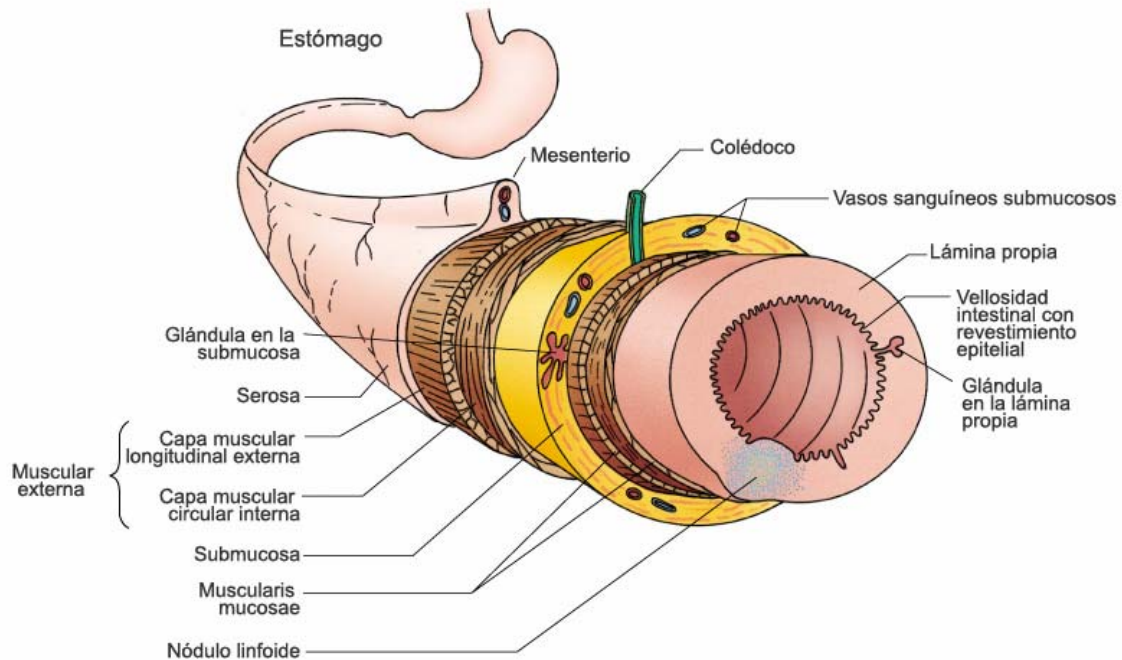


Figura 2.1 Representación esquemática de las capas del tracto gastrointestinal [10]. Reproducida de Gartner sin autorización

Esta combinación de músculo liso circular y longitudinal le permiten al tracto efectuar movimientos complejos que exprimen y empujan la ingesta en el lumen. Entre el estrato interior circular y el estrato exterior longitudinal existe otro componente del sistema nervioso del tracto digestivo: el plexo mientérico.

El estrato de la submucosa se encuentra inmediatamente debajo de la mucosa, es una capa que encierra tejido conectivo que contiene sangre y vasos linfáticos. La submucosa también contiene al plexo submucoso, el cual provee control nervioso a la mucosa.

La mucosa es la capa interior del tracto gastrointestinal y recubre el lumen. De las cuatro capas, la mucosa es la que más varía en estructura y función, lo que determina las diferentes tareas especializadas que realiza el tubo digestivo en toda su extensión. Resultan de gran importancia las células epiteliales que recubren la mucosa y que están en contacto directo con el lumen. Esta lámina de células epiteliales es significativamente diferente en cada una de las regiones del tracto digestivo. Existen diferentes tipos de células que forman el epitelio, incluyendo células dedicadas a la secreción, absorción o producción de hormonas. Estas diferencias distintivas en la anatomía del epitelio pueden observarse en las figuras 2.2, 2.3 y 2.4 en las que se muestran fotomicrografías del tracto digestivo de ratas. En las cuatro imágenes el epitelio se encuentra orientado hacia arriba.



Figura 2.2 (a): Imagen de esófago. Obsérvese que la luz está recubierta por epitelio escamoso estratificado (X17). [10]

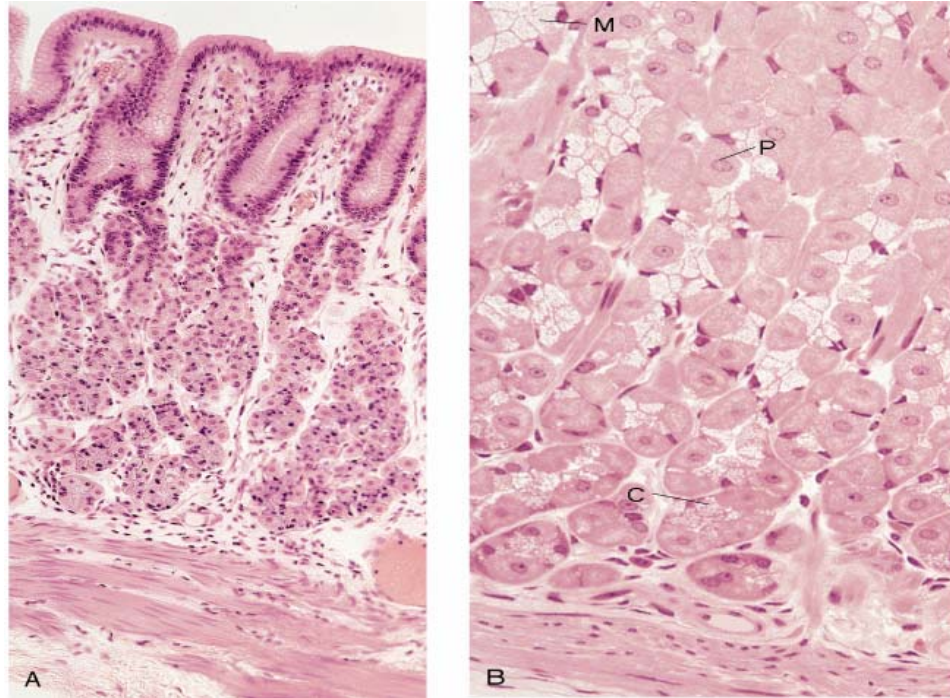


Figura 2.3. A, fotomicrografía de la mucosa del fondo del estómago (X 132). B, Fotomicrografía de las glándulas fúndicas (X270), C célula principal; M, célula mucosa del cuello; P, célula parietal [10].

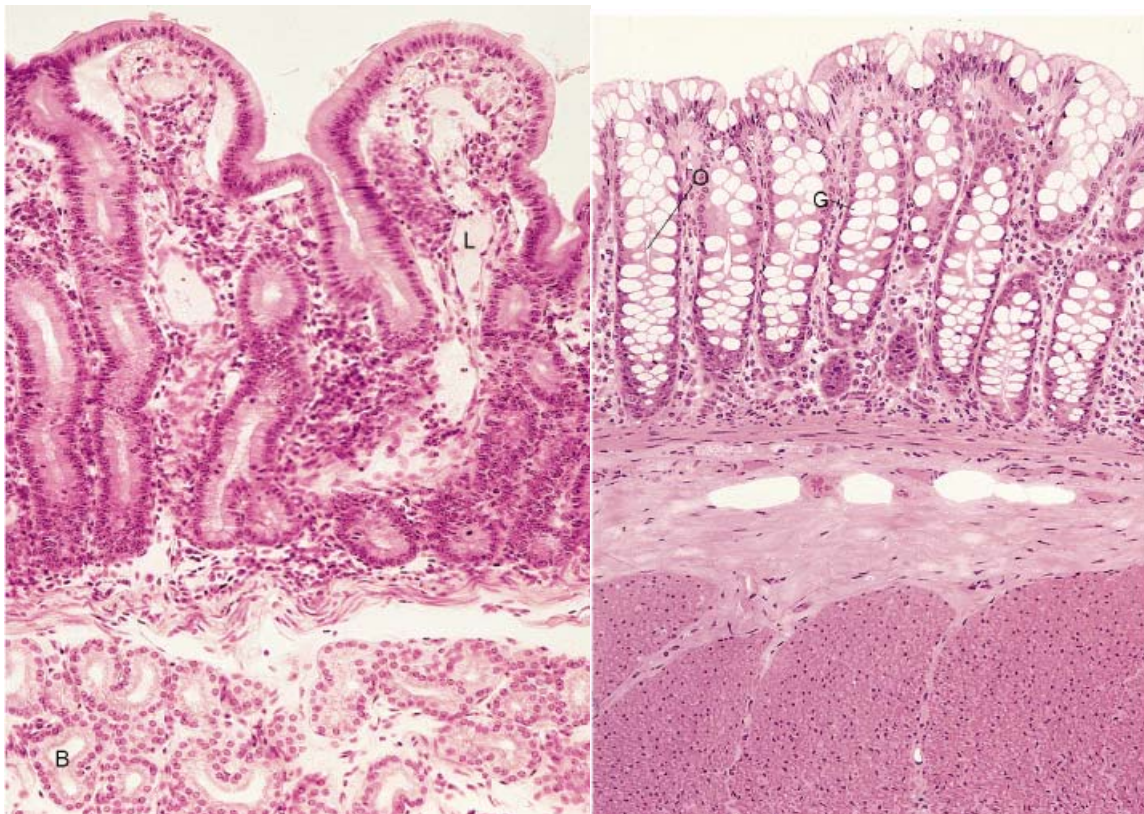


Figura 2.4 Fotomicrografía de la mucosa duodenal y fotomicrografía de colon de mono [10], ambas (X132).

El término *isquemia* se refiere a la condición en la cual el flujo sanguíneo no es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de un tejido. Cuando el suministro de nutrientes y oxígeno para un tejido se reduce o detiene por algún tiempo, se dice que el tejido entra en isquemia. Al reducirse el suministro de oxígeno, el metabolismo de las células es de tipo anaeróbico, con la consecuente producción de ácido láctico y reducción de energía celular. Además, el desalojo de los productos de deshecho como agua, iones, y bióxido de carbono, se hace más lento o se detiene por completo. En la isquemia leve (de tiempo corto o suministro disminuido pero no ausente) todos los cambios mencionados son reversibles; si la isquemia se intensifica, se hacen irreversibles, el tejido utiliza toda la energía almacenada y muere. [13]

El daño isquémico se caracteriza por consumo de oxígeno dependiente del suministro, metabolismo anaeróbico, evacuación celular insuficiente y reducción del volumen extracelular. La acumulación de ácido láctico y ácido carbónico (por exceso de CO₂) produce la caída del pH. Después de un período de isquemia se produce acumulación de iones y aumento en la osmolaridad intracelular, incremento en la permeabilidad de las membranas los cuales induce edema en el tejido y una reducción de los procesos activos de transporte. [13]

2.2. MONITOREO DE LA MUCOSA GASTROINTESTINAL

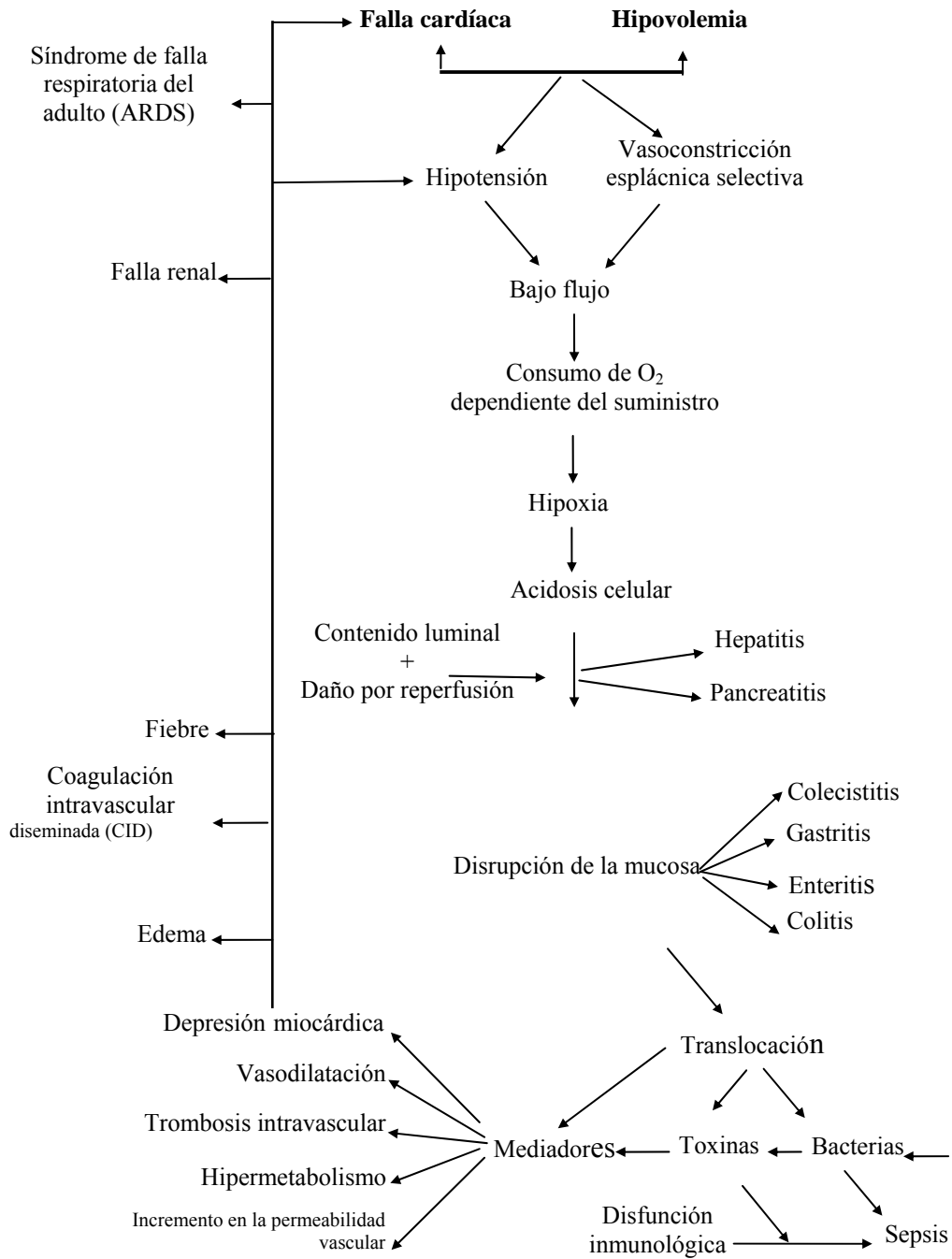
La condición de choque se define como aquella en la que el suministro de oxígeno cae por debajo de la demanda energética en algunos de los tejidos del cuerpo. Esto puede ser causado por una variedad de condiciones que incluyen hemorragia, insuficiencia cardio-respiratoria, sepsis, etc. En su primera etapa, llamada de compensación, la reacción del cuerpo puede ocultar el problema en las variables hemodinámicas a nivel sistémico como pulso, presión sanguínea, pH y gases arteriales. Al mismo tiempo, debido a los mecanismos de compensación, el suministro de nutrientes y oxígeno se reduce o detiene causando isquemia. En particular la mucosa gastrointestinal se ve comprometida tan pronto se presenta la irregularidad en cualquier otra parte del cuerpo. Luego, esta mucosa contribuye en forma crítica a la progresión del choque y la subsiguiente falla múltiple de órganos al mermarse su función vital como barrera protectora. La figura 2.5 ilustra la

patogénesis de falla múltiple de órganos, y el papel fundamental de la mucosa en este proceso [11, 13].

El daño a las membranas de la mucosa gastrointestinal permite en primera instancia el paso de endotoxinas, en particular el lipopolisacárido (LPS). Más adelante se promueve la translocación de bacterias enteras a la circulación linfática y portal, y a la cavidad peritoneal. También se expone a la pared intestinal a procesos de autodigestión y úlceras. La probabilidad de falla múltiple de órganos y muerte se encuentra directamente relacionada con el daño isquémico a la mucosa gastrointestinal.[13]

De acuerdo con Fiddian-Green [13], el 80% de los pacientes de terapia intensiva que fallecieron a causa de una falla orgánica múltiple presentaron isquemia esplácnica (infarto y gangrena del intestino, hígado y/o páncreas). La isquemia esplácnica también se observó en el 50% de los pacientes sometidos a cirugías cardíacas, de los cuales únicamente el 1.1% observaron manifestaciones clínicas. El infarto transmural del intestino es el principal hallazgo en la autopsia del 3% de todos los pacientes que mueren en el hospital. Puede deducirse que la isquemia esplácnica es altamente incidiosa en los pacientes de terapia intensiva y, al mismo tiempo, difícil de detectar sino hasta la autopsia.

En experimentos realizados con cerdos, se observó que un descenso del pH intramucoso produce un aumento de la permeabilidad mucosa [14]. El incremento de la permeabilidad de la mucosa durante la isquemia se desarrolla antes de presentarse cualquier evidencia histológica de daño a la mucosa [15].



Causas y efectos de la isquemia esplácica

Figura 2.5 Patogénesis de falla múltiple de órganos y papel fundamental de la mucosa intestinal durante la isquemia. [11]

El daño isquémico en la mucosa comienza en las capas superficiales y se extiende progresivamente al interior. Los músculos constituyen la última parte de la pared intestinal en ser afectada, por tanto no muestran evidencia de daño tisular hasta que se exponen a oclusiones vasculares totales por varias horas. El infarto transmural ocurre después de al menos 8 horas de isquemia severa [15]. Para pacientes en estado crítico, un grado bajo de isquemia no oclusiva de la mucosa puede persistir por días o semanas sin convertirse en infarto transmural. Para el caso de pacientes con isquemia crónica, grados bajos de isquemia de la mucosa pueden también persistir por meses sin convertirse en infarto siempre y cuando la isquemia se limite a las capas superficiales de la mucosa y la tasa de incremento de la destrucción celular en la región sea igual a la tasa de incremento de células renovadas y reconstruidas a partir de secciones no isquémicas [16].

La mucosa intestinal es especialmente susceptible a los radicales libres producidos por la reoxigenación de la mucosa hipóxica [17]. El grado del daño por reperfusión es también una función de la severidad de la acidosis intra mucosa presente antes de la reperfusión [18]. Ni el daño por reperfusión ni el incremento en la permeabilidad de la mucosa suceden sin una previa acidosis intra mucosa. La severidad del daño por reperfusión inducida por choque en animales se atenúa al prevenir dicha reperfusión por medio de inhibidores de la xantina oxidasa como el *alopurinol*, o por quelantes de radicales libres como la superóxido dismutasa [19].

Todos estos estudios han demostrado lo susceptible que es la mucosa intestinal ante situaciones de choque y como se traduce en un indicador temprano de la salud de los pacientes. En los últimos años se han desarrollado y evaluado varias terapias enfocadas a evitar o limitar los efectos negativos del daño isquémico en la mucosa [21], sin embargo la efectividad de estas terapias depende de forma crucial del estado de la mucosa en el momento de la intervención.

El único método que ha demostrado valor para este tipo de pacientes y ha encontrado un uso clínico regular es la medición indirecta del pH intramucoso (pHi), por tonometría

gástrica o colónica, Este método desarrollado por Fiddian Green [22, 23] utiliza una sonda intestinal que lleva un globo de silicón en la punta distal, con una pared muy delgada y permeable a gases.

Es importante el poder determinar si el daño a la mucosa es irreversible y si ha perdido su función de barrera. Cuando el tiempo de isquemia es corto, se considera que se ha presentado un daño isquémico todavía reversible, por lo que es óptimo prevenir o limitar una situación de daño isquémico en la mucosa mediante técnicas de resucitación hemodinámicas agresivas, vasodilatadores para aumentar la perfusión local, oxigenación intraluminal y reducción de los requerimientos de oxígeno, eliminando focos de infección, pus y enfriando el tejido. También se puede prevenir el peligro de bacterias en el lumen, mediante antibióticos y lavados gástricos. En contraste, si el tiempo de isquemia es prolongado, se puede llegar a un punto en el que el daño isquémico es suficientemente grave y es importante prevenir daño adicional por reperfusión mediante aislamiento del tejido, confinando endotoxinas y bacterias, también se debe pensar en eliminar radicales libres por medios farmacológicos y limitación gradual de la perfusión [20].

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA IMPEDANCIA DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS

2.3.1. Propiedades Eléctricas de los Materiales Dieléctricos

Entre las distintas propiedades físicas de los tejidos biológicos, las propiedades eléctricas han sido estudiadas ampliamente. La conductividad (σ) y la permitividad (ϵ), y en concreto su evolución frecuencial. Estos dos parámetros, que rigen el comportamiento eléctrico de los materiales, determinan la densidad de corriente inducida (J) y la densidad de carga (D) en el material cuando se les aplica un campo eléctrico unitario (E).

$$D = \epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot E = \epsilon \cdot E$$

$$J = \sigma \cdot E$$

Donde ϵ y σ son, como se ha dicho, la permeabilidad relativa y la conductividad del medio y ϵ_0 es la permeabilidad dieléctrica del vacío.

2.3.2. Conceptos Básicos de las Bioimpedancias

Un tejido biológico puede modelarse, desde un punto de vista estructural, como la agrupación de una serie de elementos denominados células, que están inmersas en un medio iónico denominado medio extracelular. Así mismo en el interior de la célula existe también una concentración de fluidos e iones, el medio intracelular, que es donde tienen lugar los procesos metabólicos del cuerpo. La frontera entre ambos es la membrana celular, encargada del control osmótico de los dos medios. Las alteraciones más usuales sobre los medios intra y extracelulares son aquellas en las que uno de los dos experimenta una variación en su volumen, ya sea debido a un aumento o disminución de la cantidad de fluido, o bien al aumento o disminución de la concentración de iones disueltos en él.

Las características eléctricas de los tejidos y sus dispersiones vendrán determinadas, por tres efectos diferentes. Por una parte por las características de las células, ya sean sus propias características eléctricas, o la integridad y normalidad de las mismas. Por otra parte, la variación de los volúmenes en los medios intra y extracelular. El último punto a considerar serán los efectos de doble capa que surgen al tratar con agrupaciones de elementos celulares (Rigaud et al, 1996) como es el caso de los tejidos biológicos.

Se ha observado que si se inyecta una corriente de alta frecuencia, se produce un efecto de cortocircuito en la membrana circular, circulando dicha corriente tanto por el medio intra como por el extracelular. Sin embargo, si la frecuencia de excitación es baja, sólo atraviesa el medio extracelular, siendo el valor de la impedancia medida mayor a estas frecuencias que a las altas. Es por tanto necesario que existe algún comportamiento de relajación, como en los materiales dieléctricos, que modele este comportamiento frecuencial de los tejidos.

2.3.3. Las Dispersiones en los Tejidos Biológicos

En los tejidos biológicos, como materiales dieléctricos que son, se observa una disminución de la permitividad y un aumento de la conductividad al aumentar la frecuencia Fig. 2.6.

El aumento de la conductividad se puede interpretar como un aumento del porcentaje de volumen de la suspensión que es accesible a la corriente inyectada, Foster y Schwan [36]. Se pueden observar tres zonas de variación de conductividad, que se denominan dispersiones. La primera es para frecuencias inferiores a 100 Hz, en ella la célula es poco conductora comparada con el medio extracelular. Su valor modelado por un estudio realizado por Maxwell, donde cuantificaba esta conductividad con la relación

$$\sigma = \sigma_a \frac{1-p}{1+\frac{p}{2}} + \sigma_i \frac{9p}{(2+p)^2}$$

donde σ_a y σ_i representan las conductividades del medio y de las células en suspensión respectivamente, y p el porcentaje de las células en suspensión. Con esta ecuación se obtienen conductividades típicas de 0.1 Sm^{-1} en el límite de corriente continua

La segunda zona plana se considera para frecuencias entre 1 KHz y 100 MHz. Este comportamiento de dispersión se debe a la estructura celular del tejido, y su constante dieléctrica mayor a frecuencias bajas se debe a la membrana de la célula. Relativamente, esta dispersión es fácil de determinar para el tejido muscular. Típicamente, su frecuencia central se encuentra dentro del rango de 10 KHz a 50 KHz, y el cambio en la impedancia es del 40 al 60% [5, 42].

La dispersión γ aparece a frecuencias muy altas (más de 100 MHz). A estas frecuencias, las propiedades eléctricas del tejido están determinadas por su cantidad de agua y de electrolitos, así como de su contenido de proteína. La conductancia del tejido se incrementa rápidamente a más de 1 GHz y su constante dieléctrica se decrementa a más de 3 GHz. Ambos efectos se deben al comportamiento del agua a altas frecuencias. Una

correcta medición de la impedancia *in vivo* a estas frecuencias es muy difícil de lograr [5, 42].

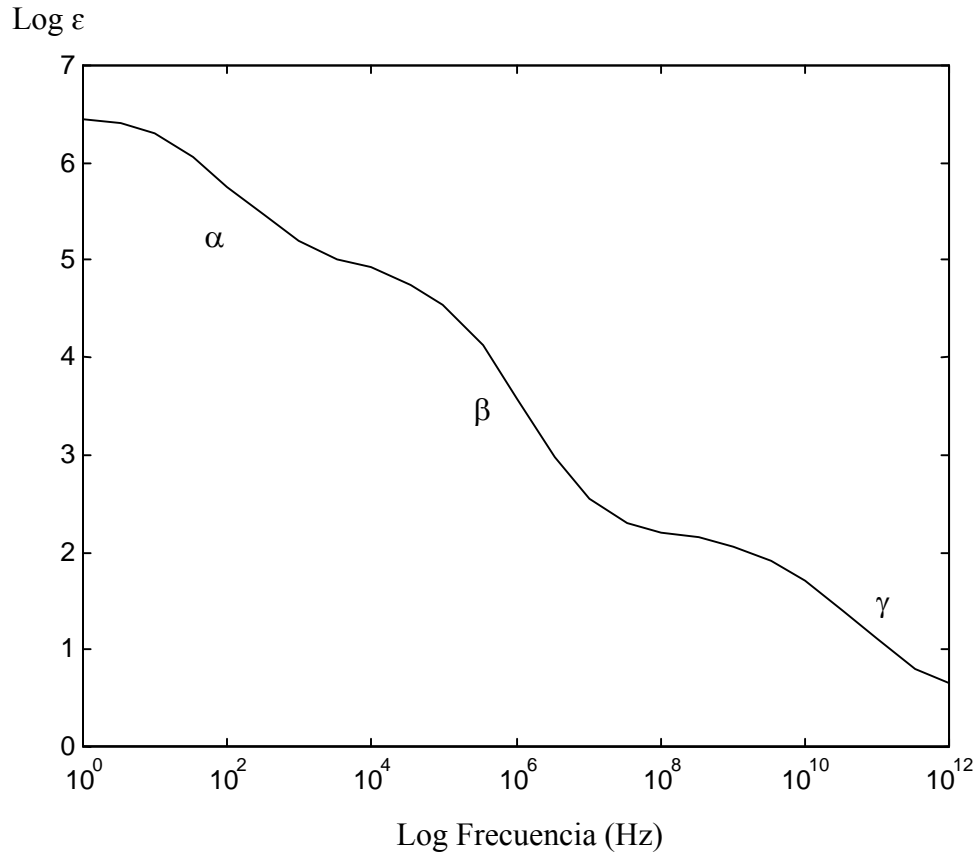


Figura 2.6 Comportamiento de la permitividad de los tejidos biológicos (Schwan., 1957).

La mayoría de las investigaciones [24] se han realizado para determinar las propiedades eléctricas del tejido *in situ* y en diferentes órganos. Han demostrado que en función del avance de la isquemia, los tejidos de los órganos muestran cambios en los espectros de impedancia [37]. El comportamiento de las dispersiones α y β en relación con el tiempo, después de un ataque de isquemia, ha sido objeto de investigación de donde se derivan las siguientes conclusiones:

- Después de los cambios iniciales debido a la isquemia, la conductancia del tejido es dependiente del tiempo durante las primeras veinticuatro horas después de la obtención de la muestra de tejido. Posteriormente la

conductancia empieza a incrementarse hasta que ocurre un colapso casi completo de la estructura celular del tejido.

- La resistencia a frecuencia altas (mayores a aquellas de la región de dispersión β) no es muy significativa para la isquemia y la posterior degradación y muerte del tejido. Esta independencia se debe a la condición de las membranas celulares en la cual los flujos intracelular y extracelular se igualan casi por completo debido a su comparable fuerza iónica.
- Los pequeños cambios dependientes del tiempo en la resistencia a altas frecuencias indica una diferencia pequeña entre los valores de resistencia interna y externa, los cuales no pueden ser mantenidos durante el rompimiento de las células.
- En el tejido la dispersión α termina mas rápido que la dispersión β . Además, la dispersión α depende estrechamente de las condiciones bajo las cuales se conserva la muestra.

Se concluye que, debido a que la dispersión β refleja los cambios en la estructura celular de los tejidos, es la más adecuada para determinar las propiedades eléctricas del tejido isquémico. [24, 37]

2.4. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA

De acuerdo con Macdonald [25] y Ristic [26] la espectroscopía de impedancia es un término general que incluye la aplicación de corriente eléctrica alterna a diferentes frecuencias, a un material en particular, y el registro de los cambios de voltaje, al atravesar la corriente eléctrica dicho material; así como el análisis subsecuente de la respuesta en frecuencia para producir información útil acerca de las propiedades fisicoquímicas de un sistema. La espectroscopía de impedancia abarca tanto los métodos de medición como las técnicas para analizar e interpretar los resultados.

Los métodos de medición se refieren a las técnicas para caracterizar la impedancia compleja de un material en un determinado rango de frecuencias. La espectroscopía de

impedancia no se limita a mediciones de impedancia. Se puede también medir admitancia compleja, constantes dieléctricas, entre otras. Sin embargo, aunque las mediciones son en principio simples, en la práctica presentan complicaciones debido a diferentes razones. El rango de frecuencias de medición puede extenderse sobre varios órdenes de magnitud (en algunos casos involucrando más de doce órdenes), y por otro lado, los valores de la impedancia pueden también abarcar varios órdenes de magnitud en el rango de frecuencias de interés (debido a los componentes resistivos y capacitivos del material). El desempeño de los electrodos utilizados como interfaz con el material de interés depende del voltaje de corriente directa (DC) entre los electrodos y el material. El sistema de medición debe proveer y controlar este voltaje DC. Todos estos factores combinados hacen que la medición presente fluctuaciones.

El análisis e interpretación de los datos obtenidos es necesario para la caracterización del material estudiado. La primera etapa consiste generalmente en un análisis de los espectros de frecuencia de los datos obtenidos. El análisis gráfico lleva al experimentador a formarse una idea sobre la estructura física y los procesos que se presentan en el material.

Existen otras formas visuales en que pueden presentarse los datos. Las gráficas de impedancia contra frecuencia (espectro) son frecuentemente útiles en los casos en donde el material medido es en general conductivo. En casos no-conductivos, los espectros de admitancia y de constante dieléctrica son más útiles. Si la impedancia medida tiene propiedades capacitivas más que inductivas, resulta de mayor utilidad graficar la reactancia negativa ($-\text{Im}\{Z\}$) como función de la resistencia ($\text{Re}\{Z\}$) en el plano complejo (en un gráfico de Nyquist). También son muy útiles las gráficas tridimensionales en donde la admitancia imaginaria se grafica contra la admitancia real y contra el logaritmo de la frecuencia. Estas gráficas 3D permiten una mejor comprensión de los datos medidos y, además, los eventuales errores en las mediciones son más fáciles de detectar.

2.5. EL SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA DESARROLLADO

Con estos antecedentes, el laboratorio de Instrumentación Biomédica de la UAM-I inició una línea de investigación en diagnóstico y monitoreo del daño isquémico intestinal utilizando la espectroscopia de Impedancia. Existen diversos métodos aplicados a la medida de impedancia eléctrica. Aparecen sistemas basados en puentes de impedancias, en circuitos resonadores, en medida de corriente y tensión, en analizadores de redes (reflectometría en el dominio frecuencial) o reflectometría en el dominio temporal. Dado que el margen de frecuencias en el que se trabaja abarca desde los cientos de Hertz hasta los megahertz, los métodos más usualmente utilizados son los de medida de tensión y corriente o bien el pseudopuente balanceado, existiendo diferentes equipos comerciales. Sin embargo, el equipo de investigadores de la UAM-I en conjunto con la empresa Innovamédica, desarrollaron y validaron un prototipo clínico de un espectrómetro de impedancia compleja utilizando un nuevo método de puente de desmodulación síncrona descrita por Othman [3]. El instrumento desarrollado puede medir la impedancia compleja del tejido a frecuencias arbitrarias desde 100 Hz hasta 1 MHz y se encuentra calibrado a una resistencia nominal de $47 \Omega^1$. La corriente inyectada a la sonda y al tejido es de 1 mA, pero puede ser ajustable a través de software, manejando un rango de 0.1 mA hasta 5.0 mA. Así mismo, para lograr maximizar la resolución del sistema, la amplitud del voltaje de salida es variable y depende de la corriente inyectada. Este instrumento se compone de dos partes principales: la parte correspondiente al instrumento en si y la parte correspondiente al control, la cual se basa en una computadora (PC) portátil. La parte de instrumentación mide la impedancia compleja del tejido sobre el rango de frecuencia requerido. La PC controla las operaciones del instrumento, la recolección de datos y el almacenamiento y análisis de éstos. El sistema fue patentado por Sacristán [33-35].

Se utiliza el sistema de cuatro electrodos (ver figura 2.7). En este sistema los electrodos exteriores inyectan una corriente de excitación en el tejido. La corriente a su vez genera un

¹ Para este estudio, el sistema se calibró a 10 ohms. De lo contrario no era posible medir la impedancia usando corrientes mayores a 10 mA.

voltaje, el cual es medido por los electrodos interiores. La impedancia de entrada del sistema de medición de voltaje debe ser varios órdenes de magnitud mayor que la impedancia del tejido medido y que aquella de la interfase electrodo-tejido. Así, toda la corriente inyectada pasa a través del tejido, solamente una proporción despreciable pasa a través de los electrodos interiores y éstos no cambian la distribución de corriente en el tejido. Además, el voltaje de la interfase electrodo-tejido para los electrodos interiores es despreciable y el voltaje medido es igual al voltaje en el tejido. La impedancia total (definida como el voltaje medido entre la corriente inyectada) representa la impedancia del tejido únicamente.

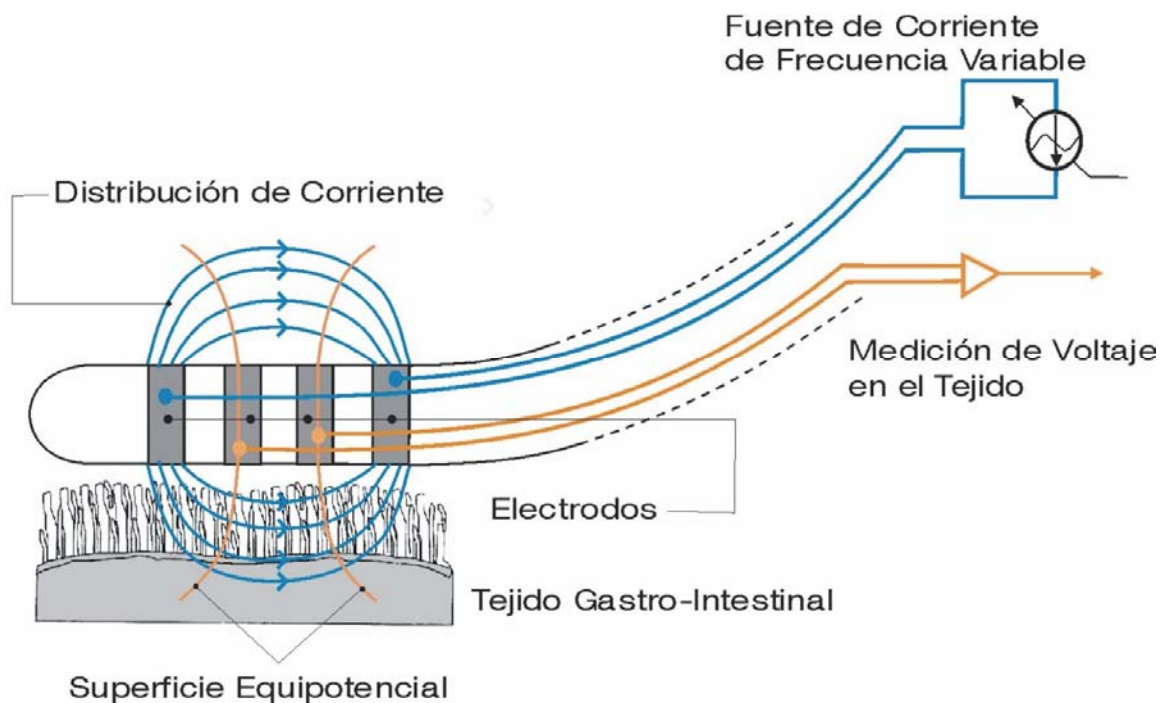


Figura 2.7. Sonda de medición con sistema de cuatro electrodos para la medición de la impedancia compleja del tejido. La fuente de corriente produce una excitación senoidal constante en el tejido a través de los dos electrodos exteriores. Las mediciones complejas de voltaje se realizan mediante los dos electrodos interiores.

Cada electrodo mide 1 mm de grosor y están separados por 1 mm de material aislante. El diámetro de la sonda es de 16 fr. Este diámetro se seleccionó de acuerdo al diámetro comúnmente más utilizado en las unidades de terapia intensiva. Se realizó un diseño utilizando sondas precomerciales, los prototipos para evaluación clínica son fabricados por la empresa TYCO en colaboración con la empresa Innovamédica. Las figuras 2.8 y 2.9 muestran la imagen real del instrumento y la sonda desechable de uso

clínico.

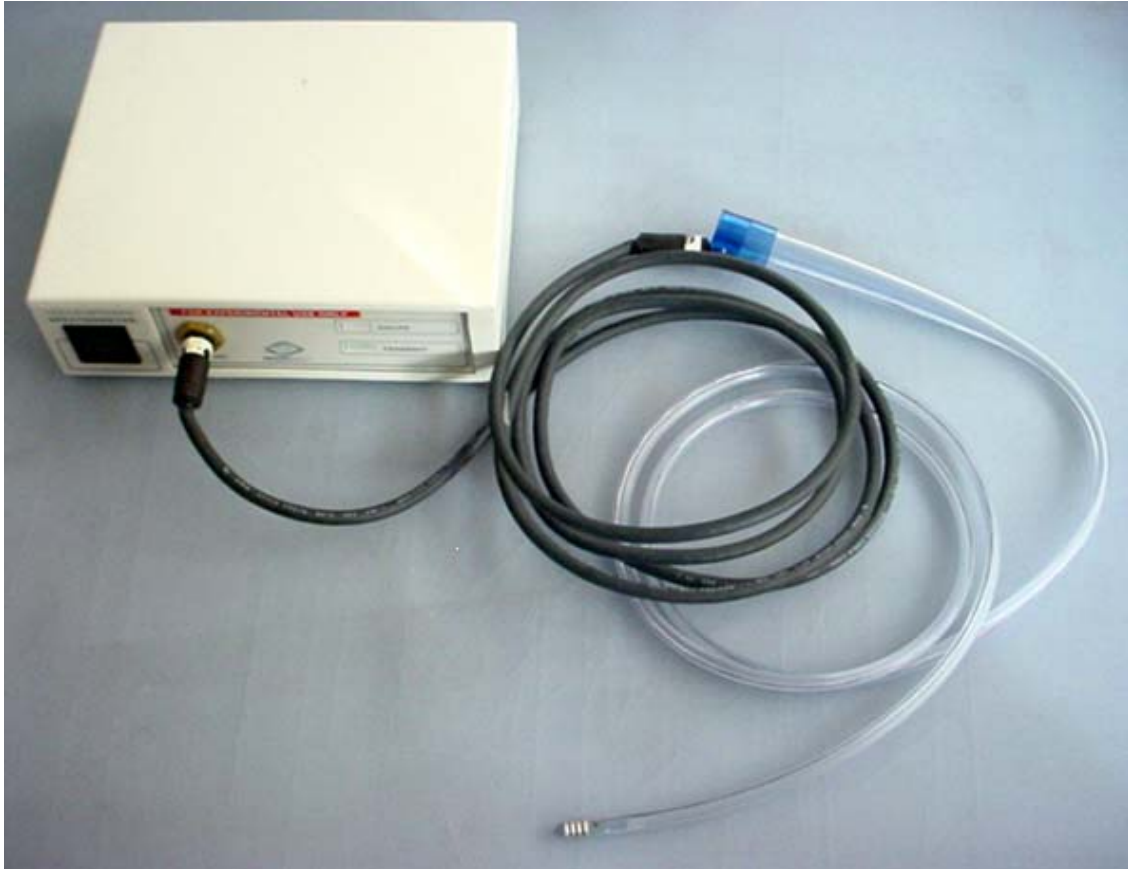


Figura 2.8. Imagen real final del instrumento de medición y la sonda desechable para evaluación clínica desarrollada por Innovamédica y fabricada por TYCO.

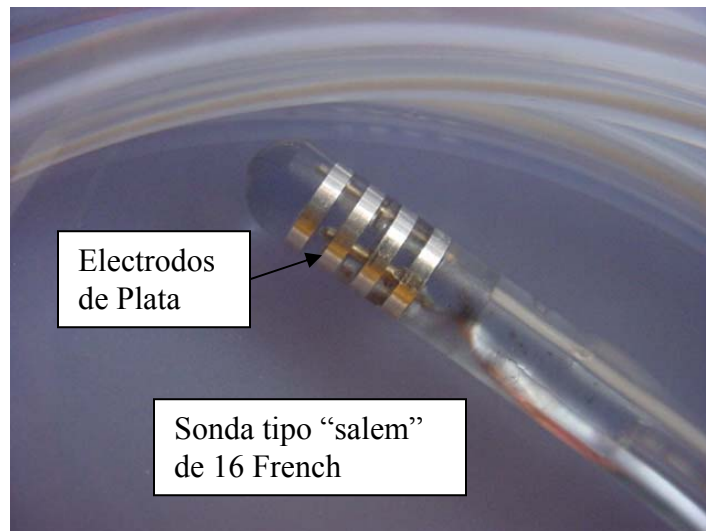


Figura 2.9. Imagen real final de la sonda desechable desarrollada por Innovamédica y fabricada por TYCO (Diámetro 16 Fr).

Se caracterizó el sistema mediante una serie de experimentos “*in vivo*”. Los espectros complejos completos del tejido (Resistencia vs Reactancia) fueron reproducibles en su forma para cada grupo experimental y mostraron tener información con un alto coeficiente de correlación con los niveles de daño estimados y también con las etapas experimentales del modelo y con el nivel de pH_i medido [3, 4]

Como parte de la validación del sistema se efectuó la implementación computacional del modelo utilizando FEMLABTM, para evaluar el desempeño del modelo de propagación de corriente eléctrica en el tejido intestinal sometido a espectroscopía de impedancia y al mismo tiempo se confirmó teóricamente que la densidad de corriente máxima. 0.022 mA/cm² se encuentra a varios órdenes de magnitud abajo de la densidad de corriente mínima que pueda dañar el tejido, 1 mA/cm², dándonos un amplio margen de seguridad. [27]

Se realizaron estudios pioneros mediante un imán de resolución de 4.7 T (Resonancia Magnética) en la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, en Estados Unidos de América, se obtuvieron imágenes de alta resolución de la mucosa intestinal a diferentes niveles de daño, al igual que mediciones de pH, niveles energéticos y difusión de líquidos en la pared intestinal con lo que se validó el significado fisiológico de la escala de daño isquémico en una variedad de condiciones de isquemia mucosal [28].

Otros estudios [38] demostraron la viabilidad del método para guiar la terapia comparando una terapia convencional con una terapia experimental guiada por espectroscopía de impedancia. Finalmente se realizó un primer estudio en humanos y se caracterizaron los espectros de impedancia en sujetos sanos. Se encontró reproducibilidad entre espectros medidos bajo las mismas condiciones de registro y la base de datos generada sirve como referencia de control para el segundo estudio clínico, donde se está caracterizando espectros de impedancia registrados bajo condiciones patológicas.

Todos estos antecedentes demuestran el enorme potencial del sistema de espectroscopía de impedancia desarrollado por la UAM-I en vinculación con Innovamédica S.A. de C.V.

Actualmente la tecnología se encuentra en evaluación clínica. Aún cuando el sistema cumple con la normativa referente a protección eléctrica como son la norma BS EN 60601-1:1990 y ANSI/AAMI ES1:1993, la empresa Innovamédica ha detectado la necesidad de identificar el umbral de corriente eléctrica en la que el tejido de la pared gástrica comienza a sufrir daño. La detección de este umbral permitirá validar todas las corrientes por debajo del mismo y podrán usarse de manera segura en investigaciones clínicas posteriores. El incremento en corriente brindará un mayor rechazo a señal de ruido (SNR), permitiendo usar el máximo rechazo a señal de ruido que permite el instrumento (Gerth and Geddes).

2.6. DAÑO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA.

Uno de los aspectos más importantes en el uso de mediciones de impedancia eléctrica es el extremo cuidado que se debe tomar para inyectar corrientes al tejido cuyos valores se encuentren por debajo de los umbrales de percepción del paciente, entendido este como la más pequeña corriente que produce una sensación de picazón u hormigueo y corrientes con valores muy por debajo de aquellas que puedan provocar daño al tejido, asegurando al mismo tiempo que estas brindan la información necesaria para el análisis de espectroscopia de impedancia. La cantidad de corriente que va a fluir en el cuerpo de un individuo depende de cómo está aterrizado eléctricamente y de la impedancia entre la corriente y la fuente en el individuo (Chaterjee y Gandhi, [29]). Campos eléctricos de baja frecuencia pueden causar corrientes eléctricas potencialmente peligrosas al paciente.

La teoría tradicional [30] describe que el daño tisular depende de la densidad de corriente y esta depende principalmente de tres factores:

- 1) La ruta y resistencia/conductividad eléctrica del tejido atravesado por la corriente eléctrica
- 2) El calor generado por la corriente (intensidad de corriente)
- 3) La duración o tiempo de contacto con la fuente eléctrica.

Posteriormente, teorías adicionales agregaron que la frecuencia de la corriente determina significativamente los traumas causados por choque eléctrico. De tal forma, la corriente

de baja frecuencia se distribuye uniforme y perpendicularmente a la ruta de la corriente [31]. Como consecuencia, la densidad de distribución de la corriente depende de la conductividad eléctrica de los tejidos presentes y de la frecuencia de la corriente. La distribución de la corriente de baja frecuencia en el tejido es determinada por la densidad, orientación, forma y tamaño de las células ya que la membrana celular funciona como una barrera iónica. La corriente de baja frecuencia es en su mayoría frenada por los fluidos del citoplasma. La distribución de corriente de alta frecuencia a través del cuerpo, por ejemplo RF o microondas, depende de otros parámetros. La membrana celular no funciona como barrera efectiva al paso de la corriente por lo que esta pasa a través del citoplasma. La tabla 2.1 presenta los rangos de frecuencia mayormente utilizados, sus aplicaciones más comunes y los posibles efectos dañinos en el tejido [31]

Frecuencia	Aplicaciones Generales	Efecto dañino al tejido
Baja Frecuencia (dc, 10 KHz)	Electricidad Comercial baterías	Calentamiento por trabajo (Joule heating) electroporación de membrana
Radio Frecuencia (10 KHz - 100 MHz)	Radio-comunicación, diathermia, electrocirugía	calentamiento por trabajo (Joule heating) calentamiento dieléctrico de las proteínas (dielectric heating)
Microondas (100 MHz - 100 GHz)	Calentamiento por microondas	calentamiento dieléctrico del agua (dielectric heating of water)
Luz (3.8 - 7.5 x 10 ¹⁴ Hz)	Visión, aplicaciones de láser	calentamiento molecular y efectos de blanqueamiento
Ionizada (>= 10 ¹⁴ Hz)	radiación ionizada UV, X-ray, ramma, etc)	calentamiento atómico

Tabla 2.1. Rangos de Frecuencia, aplicaciones más comunes y el efecto dañino asociado. Reproducido sin autorización de Lee, Zhang y Hanning. Biophysical Injury Mechanisms in Electrical SOC Trauma [31].

Como se podrá notar, el daño de tejido se debe a muchas causas y esto produce un muy complejo patrón de daño.

Muchos investigadores y organismos de estándares de seguridad eléctrica [8] han realizado estudios para definir la máxima exposición permisible de corriente eléctrica a la que un humano puede estar expuesto sin causar alteraciones estructurales o afectar las

mediciones. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los rangos definidos dependen además de la frecuencia y las características intrínsecas del tejido en cuestión, de la localización y geometría de los electrodos. Estos factores generan diferencias suficientemente significativas para evaluar por medio de modelos y pruebas in vivo, la seguridad de cada sistema, además, no existen los datos suficientes que incluyen todas las posibles variantes para poder formular los parámetros eléctricos adecuados y la máxima exposición permisible en todas las situaciones, pero sí existen resultados que presento para tomarlos de referencia de partida.

Dalziel demostró que para una corriente eléctrica de 60 Hz, el umbral de corriente de rechazo “no-let-go” para una corriente inducida en el antebrazo es 16 mA para hombre y 11 mA para mujeres [32]

Geddes, L.A. ha mostrado diferentes rangos de umbral de percepción y tolerancia a la estimulación de corriente sinusoidal dependiendo de la localización de los electrodos. Encontró que A 60 Hz el nivel de tolerancia de la corriente varía de 4 a 100 mA. El umbral de sensación con electrodos en mano fue de 5.2 mA para corriente directa y 1.1 mA para corriente alterna de 60 Hz. Alrededor de 300 Hz, el umbral de percepción incrementa (Figura 2.10). En una aplicación directa de corriente en los ventrículos, el simple paso de una corriente con una intensidad baja y frecuencia baja produce fibrilación ventricular. Los factores críticos son la intensidad de la corriente, la ruta, la duración de exposición y la frecuencia de la corriente. Al incrementar la frecuencia, es necesaria más corriente para producir fibrilación ventricular. También demostró la relación directamente proporcional entre el área del electrodo y el umbral de percepción de corriente, siendo mucho menor el umbral mientras menor es el área del electrodo (Figura 2.11)

Otros autores [8] han definido la máxima exposición permisible para ambientes controlados, como se muestra en la Tabla 2.2, donde la corriente inducida en el cuerpo humano es medida a través de cada pie, no debe exceder los siguientes valores:

$$I = 1000f \text{ mA (para } 0.003 < f \leq 0.1 \text{ MHz)}$$

Donde

I es el promedio de la corriente en un segundo

f es la frecuencia en MHz

$I = 100 \text{ mA}$ (para $0.1 < f < 100 \text{ MHz}$)

Donde

I es el valor de corriente rms durante un período de 6 minutos.

De igual forma en la figura 2.12 se puede ver el incremento de corriente conforme aumenta la frecuencia de esta. Así por ejemplo, el límite de corriente para una corriente con una frecuencia de 10 KHz es de 4.5 mA

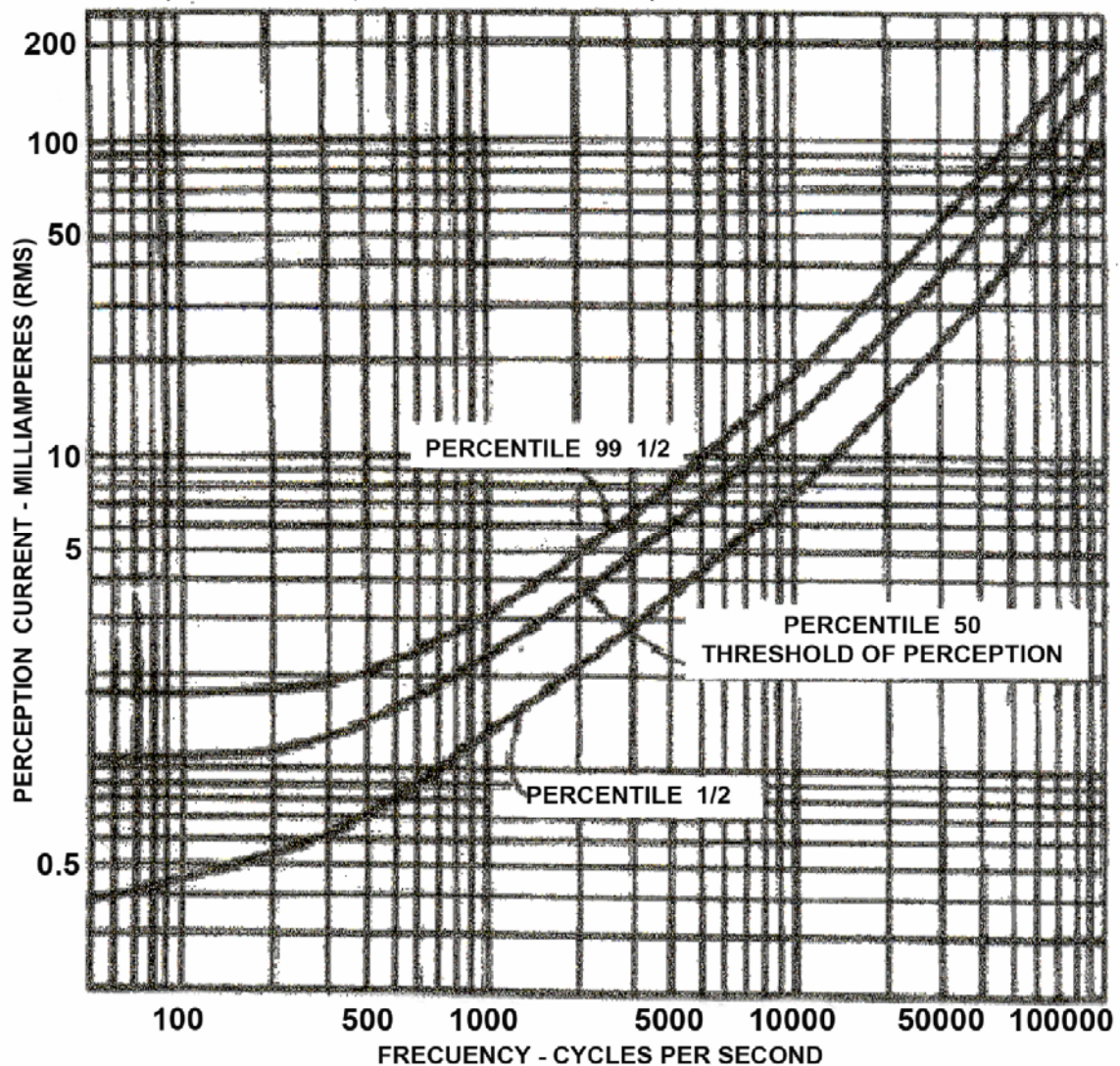


Figura 2.10. Umbral de Percepción [1].

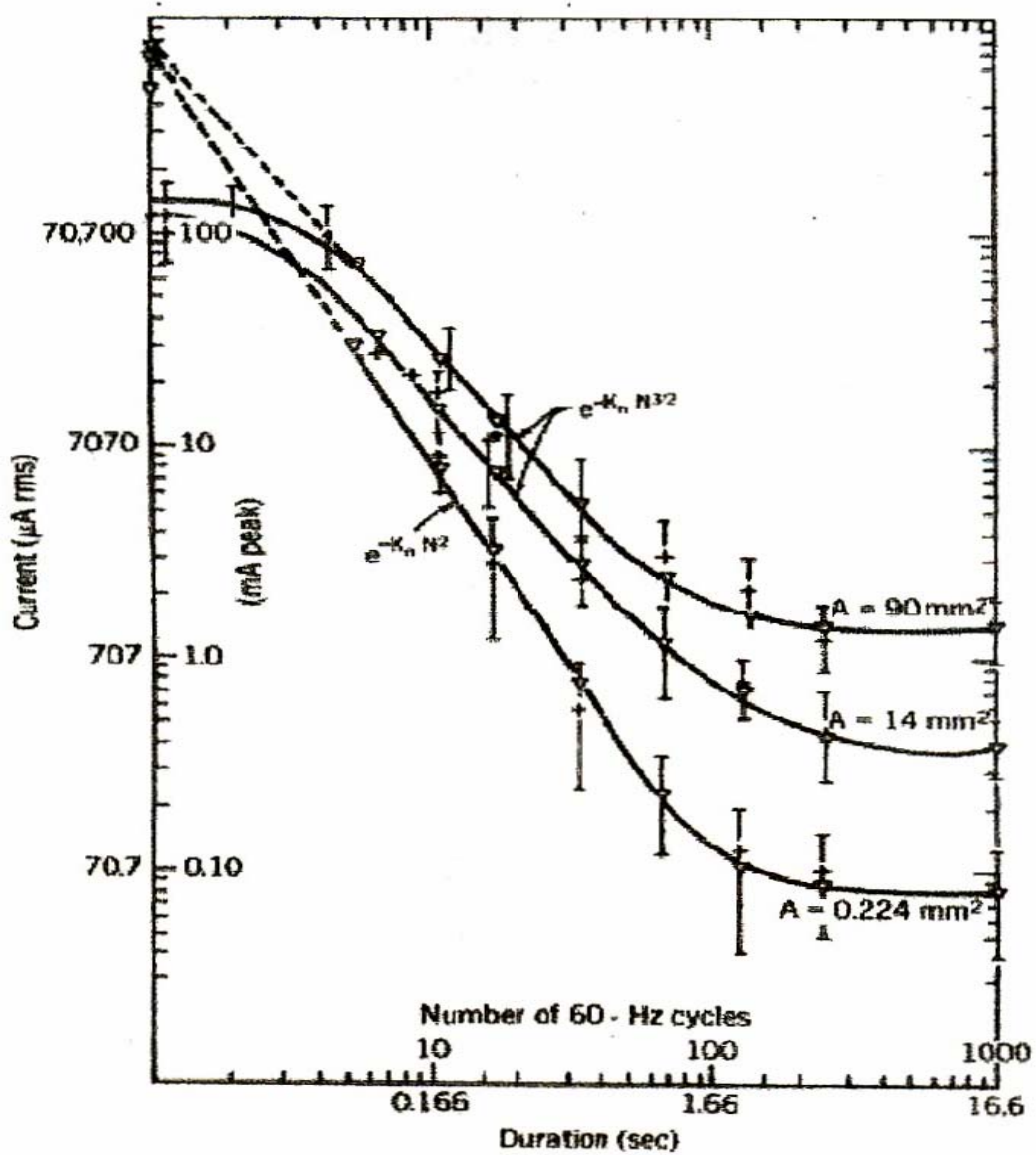


Figura 2.11. Relación entre el área del electrodo y el umbral de percepción [1].

Corrientes de RF inducidas por contacto			
Rango de Frecuencia (MHz)	Máxima corriente (mA)		Contacto
	Ambos pies	Cada pie	
0.003 - 0.1	2000f	1000f	1000 f
0.1 - 100	200	100	100

f es frecuencia en MHz

Tabla 2.2. Corrientes de RF inducidas por contacto [8].

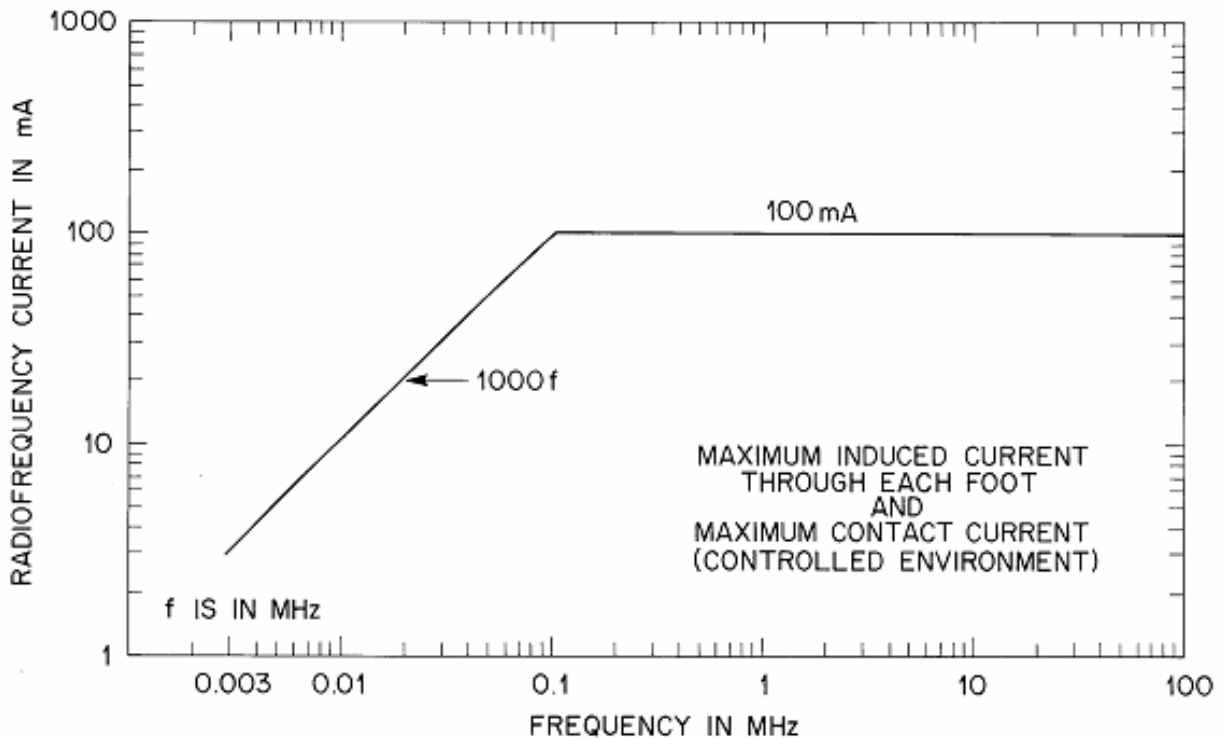


Figura 2.12. IEEE Estándares de niveles de seguridad con respecto a exposiciones a campos magnéticos de radio frecuencia, 3 kHz to 300 GHz [8].

2.7. MECANISMOS DE DAÑO BIOFÍSICO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA (CHOQUE ELÉCTRICO)

Hasta hace poco, el daño eléctrico por baja frecuencia, consideraba únicamente el daño térmico por calentamiento de trabajo (Joule heating) sin embargo en los últimos 10 años se ha encontrado que la patofisiología del tejido por daño eléctrico, es más complejo. Envuelve daño térmico, electroporación e interacciones electroquímicas y traumas mecánicos bruscos por explosiones termoacústicas de arcos de alta energía [31].

Aunque estas fuerzas eléctricas pueden alterar todos los componentes tisulares, es la delgada membrana plasmática de la célula la parte más vulnerable de la célula. La membrana plasmática de la célula resulta la estructura más importante en la determinación de la tasa de acumulación de daño tisular [31]. La más importante función de la membrana celular es proveer una barrera contra la difusión libre de iones. Si la

membrana es permeabilizada, el trabajo requerido para mantener la concentración iónica transmembránica se incrementa proporcionalmente. La conductancia de una membrana electropermeabilizada puede incrementar en bastantes órdenes de magnitud. La producción y consumo de ATP llevan a un agotamiento metabólico. Si la membrana no es sellada, pueden ocurrir paros bioquímicos y eventualmente la muerte celular.

Las fuerzas eléctricas actuando a través de la membrana puede alterar la conformación de la membrana protéica y dañar la integridad estructural de la bicapa lipídica (Ver Figura 2.13)

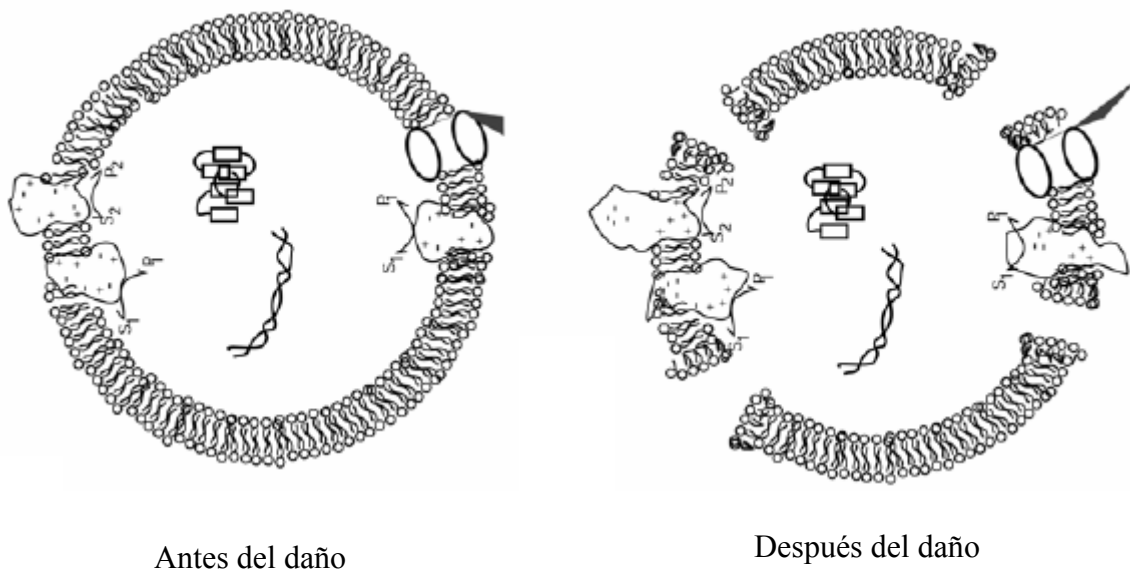


Figura 2.13. Permeabilización de la membrana celular [43].

Los principales mecanismos de daño son la electroporación de la bicapa lipídica y la desnaturalización electroconformacional de las proteínas de la membrana. En la Tabla 2.3 se muestran los distintos modos de daño celular debido a trauma eléctrico.

Electroporación: Es un término comúnmente usado para describir el proceso biofísico de la permeabilización de la membrana debido a la reorganización de lípidos de la bicapa lipídica por campos eléctricos suprafisiológicos [31]. La electroporación ha sido usada para introducir enzimas, anticuerpos, virus u otros agentes o partículas; para precipitar la fusión celular y para insertar macromoléculas dentro de la membrana celular.

La electroporación puede ser transiente o estable dependiendo de la magnitud del potencial de membrana inducido, su duración, la composición de la membrana y la temperatura. El tiempo requerido para la electroporación está en el rango de microsegundos a milisegundos. El estado físico de la bicapa lipídica es fuertemente dependiente de la temperatura.

Modos de daño tisular en trauma eléctrico			
Mecanismo de daño	Duración del Contacto eléctrico	Tejidos Susceptibles	Distribución del daño tisular
Calentamiento por trabajo (Joule heating)	1 - 10 s	Todos	proteínas membrana celular
Electroporación	10^{-5} - 10^{-4} s	Músculo Nervio	Bicapa lipídica de la membrana
Desnaturalización electroconformacional de las proteínas de la membrana	10^{-3} s	Músculo y Nervio	Proteínas de la membrana
Termoacústica (explosión)	10^{-2} s	Todos	Estructuras de las membranas

Tabla 2.3. Modos de daño tisular en trauma eléctrico. Traducida y Reproducida sin autorización de Lee, Zhang y Hanning. Biophysical Injury Mechanisms in Electrical Shock Trauma [31].

La electroporación del tejido fue inicialmente estudiada por la necesidad de comprender la patofisiología del daño eléctrico. Bhatt [31] midió la acumulación de daño por electroporación in Vitro. Después de medir la impedancia inicial, expuso al tejido a pulsos eléctricos variando la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de exposición y en un segundo estudio varió el número de pulsos y la duración de estos. El cambio en la impedancia eléctrica de baja frecuencia normalizada en el tejido muscular después de la aplicación de los pulsos de corrientes indican el daño de la membrana del tejido músculo esquelético. Se puede observar el decremento en la magnitud de la impedancia después de estimular con pulsos eléctricos. Como se puede ver en la figura 2.14 el campo eléctrico y la duración del pulso fueron factores que determinaron el incremento de daño por electroporación. Siendo menos significativo el número de pulsos

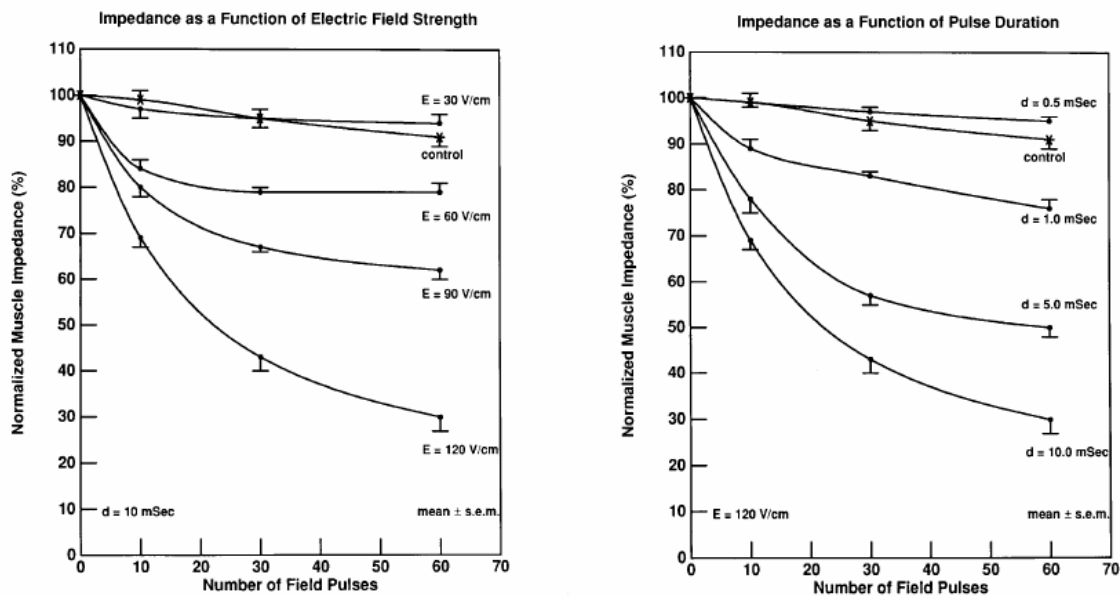


Figura 2.14 Magnitud de Impedancia de tejido muscular en función del número de pulsos eléctricos inyectados. Izquierdo: Cada curva representa un voltaje distinto, con pulsos de duración constante de 10 ms. Derecho: La duración del pulso es diferente en cada curva, mientras que el voltaje es constante a 120 V/cm. Original de Bhatt y Copiada y traducida sin autorización de Lee, Zhang y Hanning [31].

Daño por quemaduras térmicas: El paso de la corriente a través de un conductor resistivo, genera un calentamiento por trabajo que puede causar graves daños por quemadura. El término “Daño por quemadura” es usado específicamente para referirse al daño de tejido por temperaturas suprafisiológicas. Los efectos de quemaduras son relacionados con la alteración y desnaturalización de proteínas, a menudo es acompañado por cambios en las propiedades ópticas del tejido.

Debido a que los componentes de la bicapa lipídica de las membranas celulares están unidos únicamente por fuerzas de hidratación, la bicapa es muy vulnerable al daño por calentamiento. Aún a temperaturas tan sólo 6°C de la normal (p.e. 43°C) la integridad estructural de la bicapa lipídica se pierde. La permeabilización de la membrana comienza a partir de temperaturas mayores a 45°C.

Aunado a la electroporación de la membrana la cual es principalmente un fenómeno en la bicapa lipídica, altos niveles de potencial suprafisiológicos pueden producir cambios electroconformacionales de las proteínas de la membrana, los canales iónicos y las

bombas iónicas. En campos eléctricos fuertes, las moléculas protéicas se orientarán a sí mismas con lo cual cambiarán su conformación para incrementar el momento dipolo efectivo en la dirección del campo [31]. Si el campo es suficientemente intenso, estos pueden inducir daños irreversibles de las proteínas de las membranas. En particular los canales y bombas de iones.

2.8. PATRONES MORFOLÓGICOS DE LA INFLAMACIÓN AGUDA.

La inflamación aguda es la respuesta inmediata que se produce frente a un agente lesivo. Esta presenta tres componentes principales: 1) las modificaciones en el calibre de los vasos, 2) las alteraciones en la estructura de la microvasculatura y 3) la emigración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión donde se acumulan. A la salida de líquidos, proteínas y células de la sangre desde el sistema vascular hasta el tejido intersticial o las cavidades del organismo se denomina exudación [39]. De acuerdo a la intensidad de la reacción, su causa específica y el tejido y la zona concretos implicados en la misma son los factores que dan lugar a las variaciones morfológicas en los cuatro patrones básicos de la inflamación aguda. La inflamación serosa (Figura 2.15A) se caracteriza por la salida de un fluido ligero que, según el tamaño de la lesión, procede del suero sanguíneo o de las secreciones de las células mesoteliales que revisten las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica. La inflamación fibrinosa (Figura 2.15B), sucede cuando la lesión es más intensa y se produce un mayor incremento de la permeabilidad vascular, las paredes vasculares son atravesadas por moléculas de mayor tamaño, como la fibrina. El exudado fibrinoso se origina en los casos en los que la filtración vascular es de grado suficiente o bien existe en el intersticio algún estímulo procoagulante. Desde el punto de vista histológico, la fibrina aparece como un trama de hilos o fibrillas eosinófilas, y en ocasiones como un coágulo amorfo. La inflamación supurativa o purulenta (Figura 2.15C) se caracteriza por la aparición de grandes cantidades de pus o exudado purulento constituido por neutrófilos, células necróticas y líquido de edema. Por último la úlcera (Figura 2.15D) es un defecto local, o excavación, en la superficie de un órgano o tejido, secundario a la descamación o desprendimiento de tejido inflamatorio necrótico.

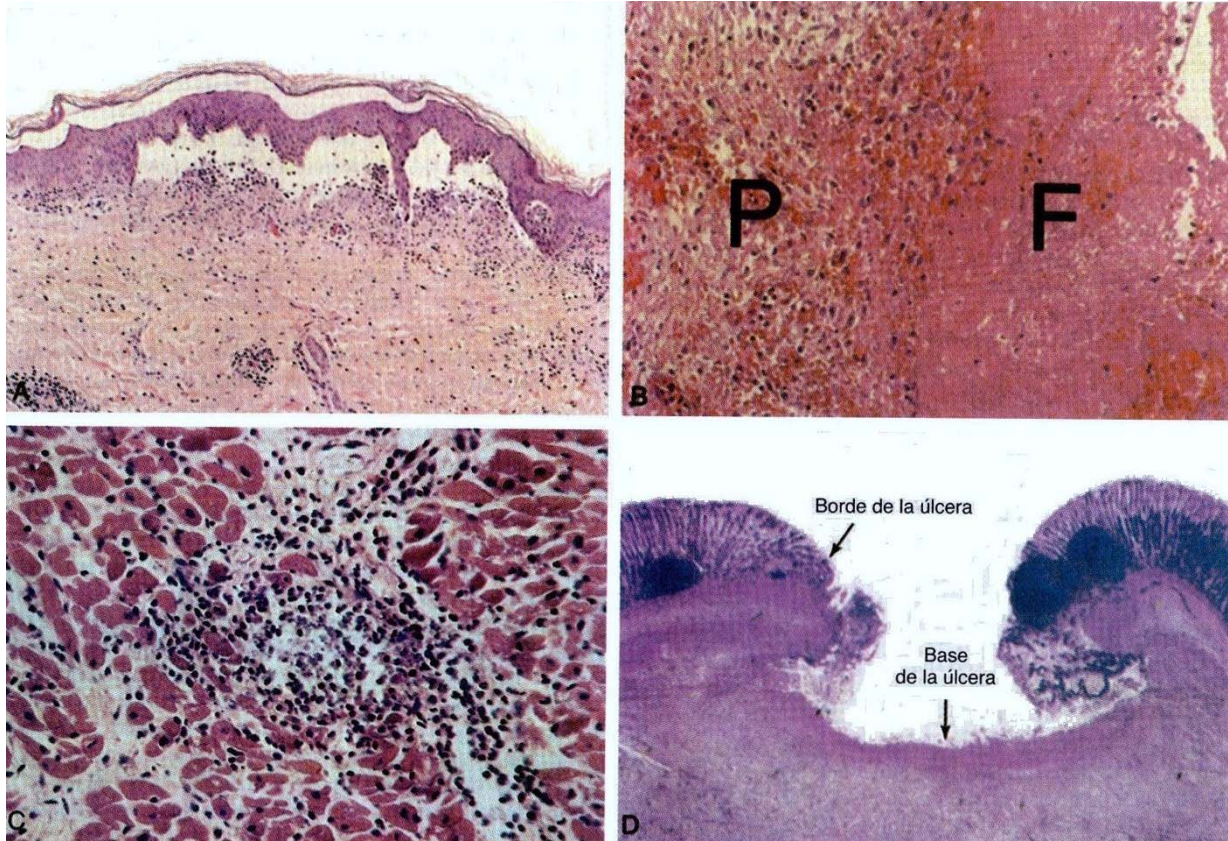


Figura 2.15. Patrones histológicos de la inflamación aguda. A, Inflamación Serosa. B, Inflamación fibrinosa. Una trama rosada de exudado de fibrina (F) cubra la superficie pericárdica (P). C, Inflamación supurativa. Un absceso bacteriano en el miocardio. D, Ulceración. Imagen de una úlcera duodenal. Copiado de Cotran y Collins [39], sin autorización.

2.9. TÉCNICAS DE MEDICIÓN HISTOPATOLÓGICA

El conocimiento histológico se genera al seguir un método de estudio en el cual podemos identificar ciertas etapas importantes [10]. Estas etapas son:

- Identificación del problema
- Técnica de preparación de los tejidos, de tal manera que asemejen cuanto más su estado natural en vivo.
- Observación y análisis de las secciones finas de tejidos.

La ejecución de dichas etapas tiene diferentes variantes, las cuales se eligen de acuerdo a variables tales como estructura y composición química de los tejidos, elementos que se

desea estudiar en los tejidos, tipo de microscopio que se va emplear en la observación y análisis [10, 40].

A la técnica de preparación de tejidos suele llamarse “Técnica histológica”. La que podemos definir como el proceso empleado en la preparación de material biológico, especialmente cortes de tejido animal y vegetal. Con el objeto de examinarlos al microscopio. Esta técnica incluye varios pasos, con la finalidad de matar rápidamente a las células sin que pierdan sus características morfológicas y químicas que tuvieron en su vida, hasta su montaje y observación microscópica. Para lograrlo se debe tomar en cuenta, el tipo de órgano que se va a estudiar así como los tejidos que lo conforman y las estructuras que de los mismos nos interesan y el tipo de microscopía a utilizar [10, 40].

Los pasos de la técnica histológica para tejidos procesados con parafina, que serán observados con microscopio fotónico, son los siguientes [40, 41]:

- Obtención del fragmento de platina, que consiste en la extracción de la biopsia.
- Fijación, se refiere al tratamiento del tejido con sustancias químicas, que retardan las alteraciones subsecuentes a la muerte y conservan su configuración normal.
- Lavado. Se refiere a la eliminación del exceso de fijador con agua.
- Deshidratación. Se aplica una serie gradual de baños de alcohol iniciando con alcohol al 50% y alcanzando de manera gradual el alcohol al 100% para eliminar el agua constituyente del tejido.
- Aclaración. El material tratado con alcohol se trata con xileno y el tejido se torna transparente.
- Inclusión. Con el objetivo de distinguir entre sí las células superpuestas en un tejido y la matriz extracelular, el histólogo debe incluir los tejidos en un medio apropiado. Para la microscopia de la luz, el medio habitual de la inclusión es la parafina.
- Corte. Una vez que se rebajan los bloques de tejido para eliminar el material de inclusión redundante, se montan para seccionarlos o cortarlos. Esta labor se lleva a cabo mediante un micrótopo, un aparato equipado con una hoja y un brazo que desciende en el bloque de tejido. Es grosor de cada corte fluctúa entre 5 y 10 μm .

- Premontaje. Los cortes de parafina se colocan en un portaobjetos de vidrio y son recubiertos con un adhesivo.
- Tinción. La tinción para microscopía de luz se lleva a cabo principalmente con colorantes hidrosolubles. Primero es necesario eliminar la parafina del corte, después de lo cual se rehidrata y tiñe el tejido.
- Montaje. Finalmente el tejido colocado en el portaobjetos es montado en el microscopio para su observación y análisis.

La técnica histológica permite no solo conservar los suficientes detalles de la estructura celular y tisular para su identificación y estudio al microscopio, sino que gracias a la tinción de dichos componentes celulares y tisulares facilita la observación de los mismos, así como brinda más elementos de análisis que nos permitirán resolver diferentes problemas.

Los colorantes más usados son la hematoxilina y eosina de manera combinada. Estos colorantes tienen composición química básica y ácida respectivamente, en tanto que a los elementos celulares con afinidad por el colorante ácido se denominan acidófilos y los que presentan afinidad por el colorante básico, basófilos. Existen muchos otros colorantes y métodos que complementan la información que da el método combinado doble de H-E. [40, 41]

Dado que la pared gastrointestinal está recubierta por tejido epitelial de revestimiento, es conveniente para el análisis de los tejidos, utilizar un método combinado, doble o triple. Estos pueden ser el ya mencionado método de Hematoxilina – Eosina donde los núcleos se teñirán de azul morado y el protoplasma y sustancias intercelulares de naranja a rojo. O bien el método combinado triple llamado método tricrómico de Gallego, donde los núcleos toman un color rojo violáceo, los haces de colágena se tornan azul verdoso, las fibras musculares de verde amarillento y la queratina y eritrocitos de amarillo [41].

3. METODOLOGÍA

La caracterización de los espectros de impedancia, la detección del umbral así como la validación de parámetros eléctricos adecuados en la estimulación eléctrica, se realizó mediante un análisis histopatológico. Para este estudio se utilizó el espectrómetro de impedancia y la sonda de medición descrita anteriormente. En todos los experimentos se utilizó una misma sonda nasogástrica.

El espectrómetro de impedancia maneja un rango de operación definido entre 0.8 mA y 5 mA y un ancho de banda que va de los 100 Hz a 1 MHz, 25 frecuencias en total, y tiene un tiempo de exposición de 50 ms. aproximadamente; para realizar estos estudios se tuvo que diseñar y adaptar un amplificador de corriente a la salida del espectrómetro de impedancia que permitiera amplificar la corriente hasta 100 mA respetando el ancho de banda deseado (Anexo 1). La sonda descrita anteriormente determina el espacio entre electrodos que definen el espacio máximo por donde circula la corriente en la pared gastrointestinal y el área de contacto superficial. Por lo tanto los parámetros adecuados a determinar fueron la intensidad de corriente, la frecuencia y el tiempo de estimulación

3.1. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETIVO

Para la experimentación in vivo, se utilizaron ratas de bioterio cepa Wistar.

3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

3.2.1. Criterios de inclusión

Ratas machos sanas, con un peso aproximado entre 150 y 200 gramos.

Ayuno de 12 hrs. previas al experimento.

3.2.2. Criterios de exclusión

La presencia evidente de algún tipo de enfermedad en el espécimen que afectase el resultado del experimento.

3.2.3. Ubicación espacio temporal

Los experimentos se realizaron en el quirófano experimental del Centro de Investigación en Imagenología e Instrumentación de CBI en colaboración con el bioterio del INCICH, el departamento de patología del INCICH e Innovamédica S.A. de C.V.

3.2.4. Diseño Experimental

Se realizó un experimento factorial buscando estudiar la interacción entre:

A) Intensidad de corriente (mA), 5 niveles: 1, 2.5, 10, 25, 100.

B) Tiempo de estimulación, 3 niveles: 50 ms, 0.2 s y 2 s.

Y C) Realizando todas las pruebas con cada una de estas frecuencias (Hz), 4 niveles: 215 Hz, 2.15 KHz, 21.5KHz, 215KHz.

Se hicieron 15 estimulaciones por cada tipo de muestra distinta, con un período de 2 segundos entre cada una de ellas para permitir la relajación del tejido.

En total se obtuvieron 4 conjuntos de muestras de 5 niveles de corriente por 3 niveles de tiempo de estimulación. El número de muestras de la misma condición fue de 3 (n), por lo que en total se obtuvo una base de tejidos de 180 muestras biológicas.

Se realizaron mediciones de control por cada una de las ratas, para asegurar que al final del procedimiento la mucosa no presentaba evidencias de isquemia que afectaran el resultado del estudio. La muestra control no era sometida a estimulación eléctrica.

3.2.5. Especificación de variables

Biopsias intestinales para identificar y medir el daño por estimulación.

3.2.6. Procedimiento

El experimento consistió en inyectar corrientes eléctricas en la pared gastrointestinal del íleon de rata. Estas corrientes variaron la frecuencia, la duración del estímulo y la intensidad según la condición deseada. La corriente fue inyectada utilizando la sonda

nasogástrica de medición de impedancia compleja. El protocolo experimental se realizó de la siguiente manera:

1. Se pesaba a cada rata para asegurar que se cumplía con el criterio de inclusión y se ponía en ayuno durante 12 hrs.
2. Se anestesiaba a cada animal utilizando una mezcla anestésica de tres componentes, donde 1 ml. de mezcla estaba compuesto por 0.25 ml de Ketamina, anestésico de uso veterinario; 0.05 ml de Xilacina, tranquilizante preanestésico de uso veterinario, 0.1 ml de Maleato de acepromacina tranquilizante preanestésico de uso veterinario y 0.6 ml de solución salina. Se utilizó una dosis aproximada de 0.0034 ml/gr., y se administraba por vía intramuscular en dos sesiones. 2/3 partes en una primera dosis y 1/3 parte a los 15 minutos. 5 minutos después de colocar la dosis completa, el animal se encontraba completamente anestesiado
3. Se realizaba una incisión quirúrgica en la pared abdominal y se identificaba la zona de interés del intestino delgado, el íleon de rata, el cual se marcaba con seda quirúrgica. Ver figura 3.1.
4. Ya identificada la zona de interés se hacía una pequeña incisión en el intestino por donde se introducía la sonda nasogástrica (Figuras 3.2 y 3.3).
5. Una vez colocada la sonda, en contacto con la pared del íleon, se acomodaban los intestinos dentro de la cavidad abdominal y se inyectaba la corriente con los parámetros seleccionados, los estímulos fueron seleccionados de forma aleatoria antes de empezar los experimentos.
6. Inmediatamente después de estimular el tejido, se obtenía una biopsia asegurándose de tener la zona de intestino afectada (Figura 3.4)
7. Finalmente la Biopsia era fijada en una solución con formaldehído al 10%.
8. El procedimiento se realizaba en menos de un minuto, por lo que el sangrado era mínimo y el daño causado por la estimulación era localizado a una mínima zona del intestino. Por cada rata se obtenían 7 distintas muestras. La 7ª y última muestra correspondía a la muestra control. Con la que se podía verificar el estado de la mucosa al final de todo el proceso.

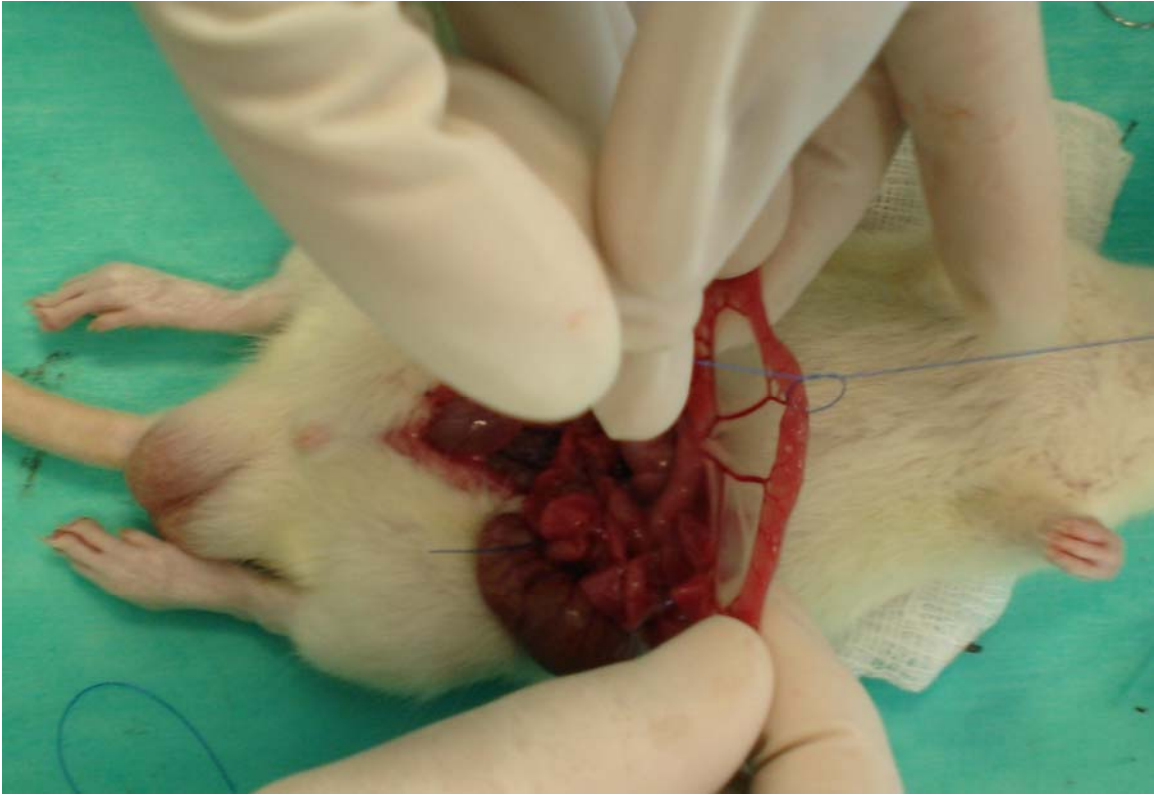


Figura 3.1. Identificación del íleon de rata.



Figura 3.2. Introducción de la sonda por vía quirúrgica en el intestino delgado.

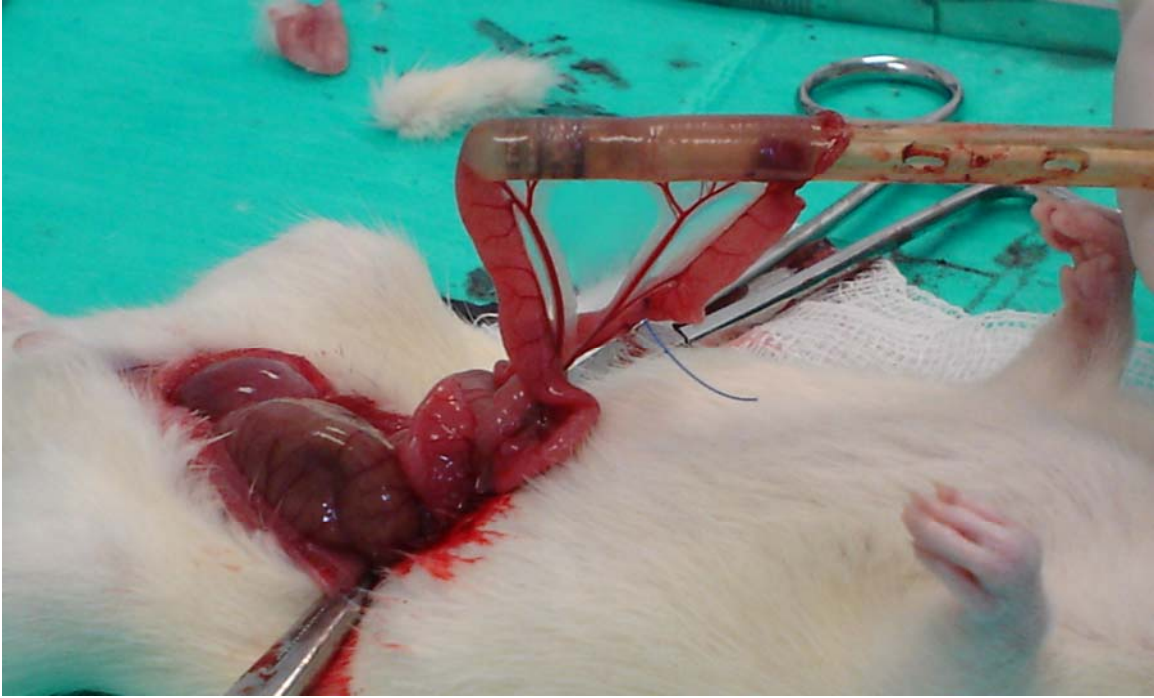


Figura 3.3. Sonda de Medición colocada y en contacto completo con la pared del íleon.

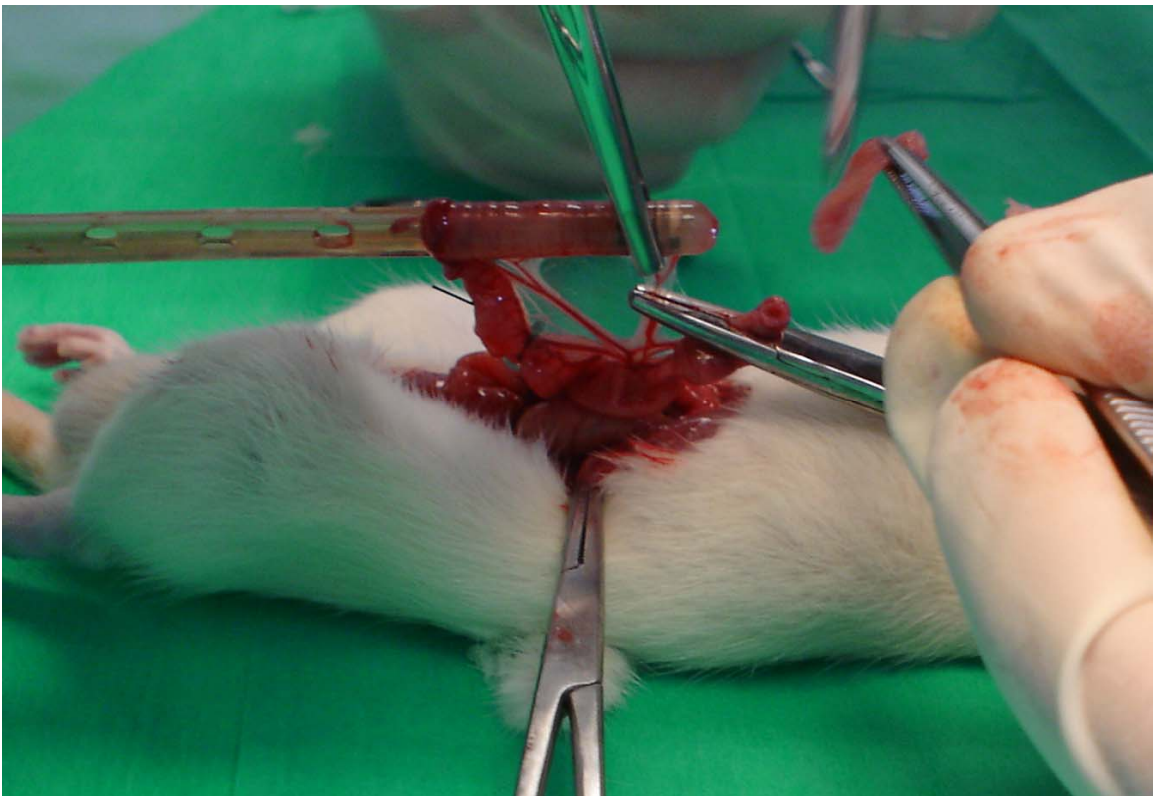


Figura 3.4. Toma de muestra biológica estimulada.

De cada intestino de rata se tomaban cerca de 7 muestras sometidas a estimulación eléctrica. Al final de la toma de las 7 muestras, se tomaba una muestra más sin haber aplicado ningún estímulo eléctrico, misma que servía como muestra control de la rata.

3.2.7. Procesamiento de las muestras biológicas

Las biopsias fueron procesadas con la técnica histológica de rutina y teñidas con H-E (Hematoxilina y Eosina) para su posterior análisis histológico. Se realizaron cortes longitudinales a través de la muestra para asegurar la revisión de la zona que estuvo en contacto con los electrodos.

El análisis histológico para evaluar el daño de las muestras de tejido, fue un análisis doble ciego y fue realizado por un patólogo experimentado. Se utilizó un microscopio marca Zeiss. Se caracterizó el daño por quemadura eléctrica y se realizó una escala de daño identificando 5 posibles niveles.

3.2.8. Caracterización del daño por quemadura

Como parte de la metodología se caracterizó el daño por quemadura eléctrica: Éste presenta desintegración de las membranas celulares. Se identifica claramente un barrimiento de la cromatina nuclear o inclusive la ausencia de núcleos. De manera general se observa una transición brusca entre la mucosa alterada y la normal, se observa un apelmazamiento de células sin núcleo o coágulo amorfo que asemejan a células queratinizadas, esto en realidad es un exudado fibroso resultado de una inflamación aguda. No se alcanza a ver un incremento de glóbulos blancos, debido a que el tiempo de exposición es mínimo. Por otro lado, se observa que el daño es localizado en tan sólo unas vellosidades que abarcan un espacio aproximado de 1 mm. y que se encuentra en 2 o 3 partes de la muestra, esto por que la corriente se distribuye de acuerdo a la resistencia del tejido. El daño únicamente se localiza en las vellosidades del intestino, llegando a dañar tejido epitelial, lámina propia o ambos de acuerdo a la cantidad de energía entregada. En la figura 3.5 y Figura 3.6 se pueden observar las características mencionadas.



Fig. 3.5. Imagen de íleon de rata con quemadura nivel 2. Se identifica claramente una zona localizada de células queratinizadas (sin núcleos), idéntico a un exudado fibroso justo donde se realizó la estimulación . (H-E, X40)

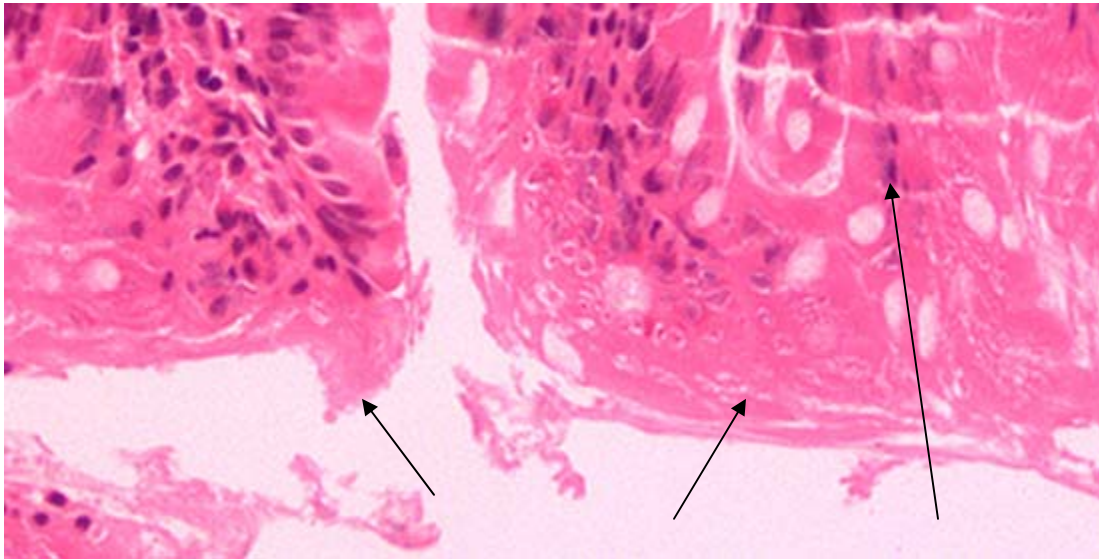


Figura 3.6. Se señala la parte distal de las vellosidades que fueron expuestas al estímulo eléctrico, las células se observan queratinizadas, y se alcanza a ver un barrimiento de cromatinas. (H-E, X100)

3.2.9. Clasificación del daño por quemadura

Con base en la caracterización descrita anteriormente y en función de la cantidad de vellosidad afectada, se clasificó el daño por quemadura o coagulación en 5 niveles:

Nivel 0: Mucosa normal, a este nivel no se observa lesión o daño alguno, las vellosidades se encuentran intactas.

Nivel 1: Se observa daño muy superficial, únicamente se afectan a las células del tejido epitelial de las vellosidades, el epitelio muestra degeneración vacuolar, inclusive hay un desprendimiento del mismo tejido epitelial necrótico (queratinizado) que deja tras de sí el molde celular de la lámina propia. La morfología semeja a la de una úlcera.

Nivel 2: Se observa un daño en tejido epitelial y en la lámina propia, pero este abarca únicamente el tercio distal o superior de la vellosidad (la proximal al lumen). Es notoria la generación de un exudado fibroso (coágulo amorfo).

Nivel 3: Este nivel es similar al nivel 2, se observa daño en tejido epitelial y en la lámina propia, pero en este nivel, la lesión llega a abarcar el segundo tercio o tercio medio de la vellosidad.

Nivel 4: En este nivel se observa daño hasta el tercer tercio o tercio basal de la vellosidad, afectando hasta glándulas de la zona basal.

La clasificación podría haberse resumido a tres niveles, por ejemplo, el nivel 0 sería mucosa normal; el nivel 1, daño superficial y primer tercio de la vellosidad y el nivel 2, segundo y tercer tercio de la vellosidad. Esta clasificación tendría la ventaja de que reduciría el posible error o traslape entre niveles. Sin embargo se ha propuesto utilizar 5 niveles o clases, pues resulta más sensible y permite un análisis más fino de la interacción de los factores.

3.2.10. Análisis Estadísticos.

A cada muestra de tejido se le asignó un nivel de daño de acuerdo a la clasificación definida y se registró en una base de datos junto con la información general de la rata. Por cada muestra biológica el sistema registraba 15 valores de impedancia, estos eran promediados y relacionados directamente con la muestra biológica obtenida.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo del daño con los distintos factores, y un análisis de varianza (ANOVA) para identificar los factores más significativos en la generación del daño. En este análisis la variable dependiente usada fue el nivel de daño asignado a cada una de las muestras histológicas, mientras que los factores de influencia usados en el análisis fueron la corriente de excitación, el tiempo y la frecuencia de estimulación.

Así mismo, se calculó la cantidad de energía entregada al tejido por cada muestra. Se identificó el umbral energético en donde comienza a causarse daño por quemadura y se generó un modelo relacionando el daño con la cantidad de energía entregada. Finalmente se logró identificar a qué valores de los factores de densidad de corriente estudiados, el sistema de EIT no genera daño.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

Fueron realizados 35 experimentos con el modelo experimental descrito en la metodología. Los primeros 5 conformaron un estudio piloto para definir las dosis de anestésicos adecuados, el número de muestras biológicas por animal y revisar el correcto funcionamiento del sistema de estimulación. Ninguno de estos animales fue incluido en el análisis de los resultados.

Para la obtención de todos los datos se utilizaron 30 ratas cepa Wistar con un peso aproximado promedio de $172.5 \text{ grs} \pm 8.12$, de las cuales se obtuvieron 7 muestras biológicas por cada una de ellas. En total se obtuvieron 210 muestras de mucosa intestinal. De estas, 180 muestras sometidas a estimulación eléctrica y las 30 muestras biológicas restantes son las muestras control de cada una de las ratas. Se obtuvieron 176 valores de impedancia compleja relacionadas con cada una de las muestras biológicas, sin embargo, los valores correspondientes a niveles de corriente iguales o mayores a 10 mA, son incorrectos pues la mayoría de los valores medidos saturaron el sistema. En la Tabla A-1 del Anexo 1 se muestran todos los datos experimentales incluidos en el análisis de resultados. Los datos que se presentan en dicha tabla son número de sujeto, peso, condición de estimulación, el nivel de daño asignado, amplitud y fase de la impedancia registrada y la energía entregada calculada.

A continuación se presentan los cortes histológicos del íleon de rata, representativos de cada nivel de daño identificado y descrito en el capítulo anterior.

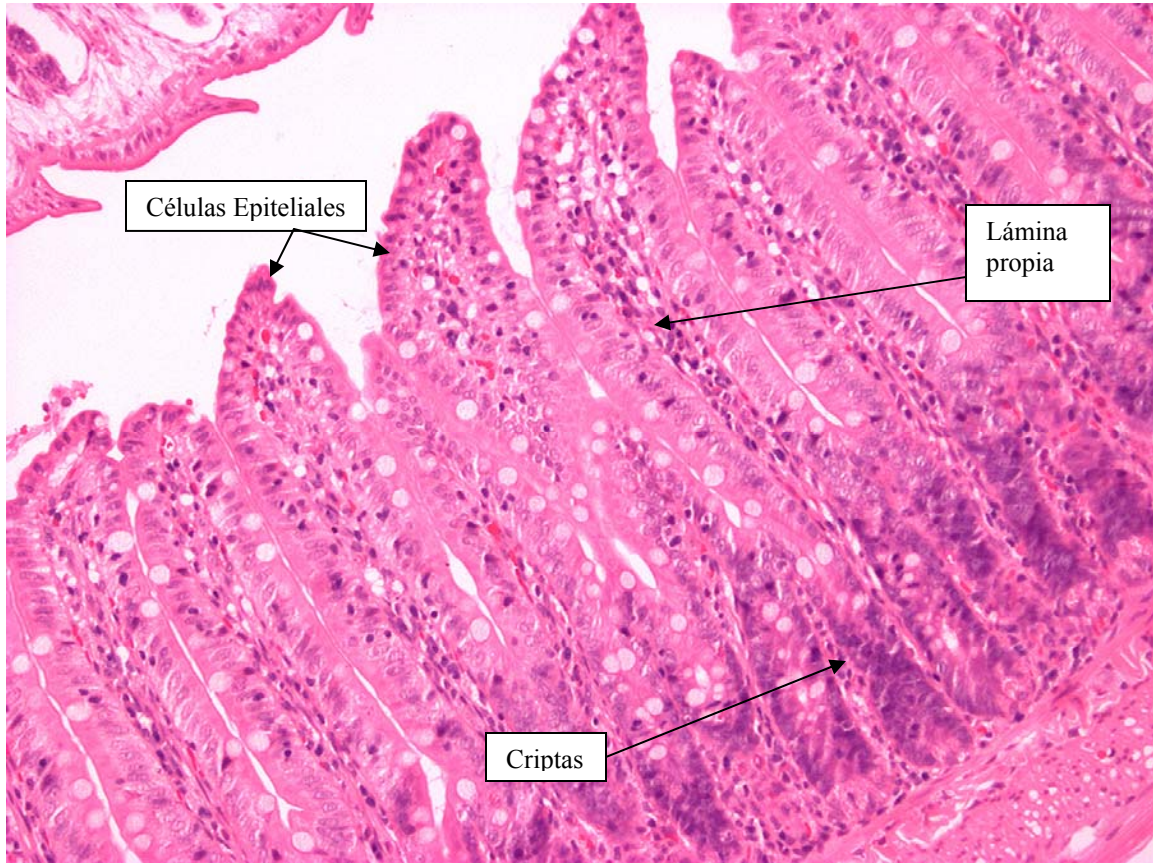


Figura 4.1 Fotografía del íleon de rata con Nivel 0. Se observa todas las vellosidades intactas, se observan claramente células epiteliales cilíndricas, algunas células calciformes, el tejido conectivo de la lámina propia y glándulas en la zona de las criptas. No se registra ningún tipo de lesión o daño. (H-E. X100).



Figura 4.2. Fotografía del íleon de rata con *Nivel 1*, daño superficial. Se observan claramente dos zonas afectadas que abarcan entre 4 y 6 vellosidades, tanto arriba como abajo. Se encuentran células queratinizadas sin núcleo y un desprendimiento del tejido epitelial el cual deja tras de sí el molde celular de la lámina propia. Técnica H-E. Ampliación X10

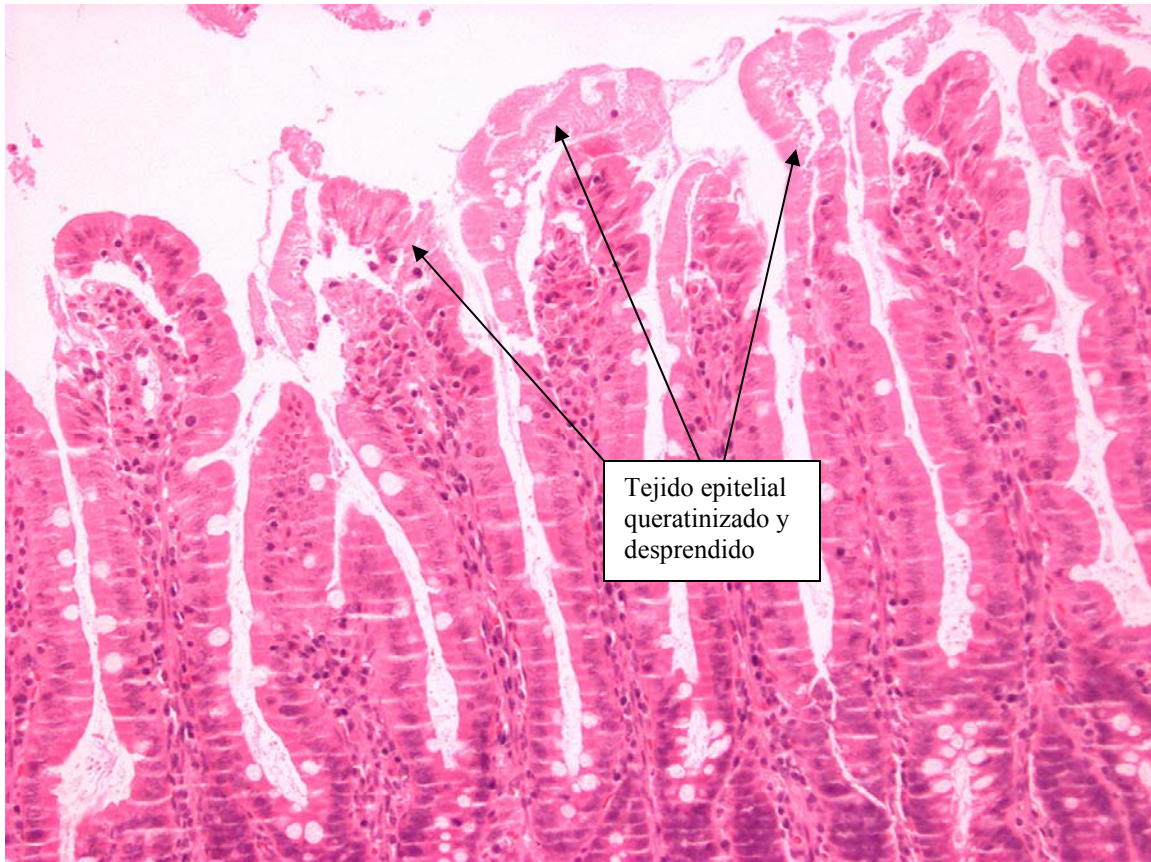


Figura 4.3. Fotografía del ileon de rata con Nivel 1, daño superficial. Esta es la misma fotografía que la anterior pero con esta ampliación se muestra con mayor claridad el tejido epitelial queratinizado y desprendido de la lámina propia. (H-E, X100)

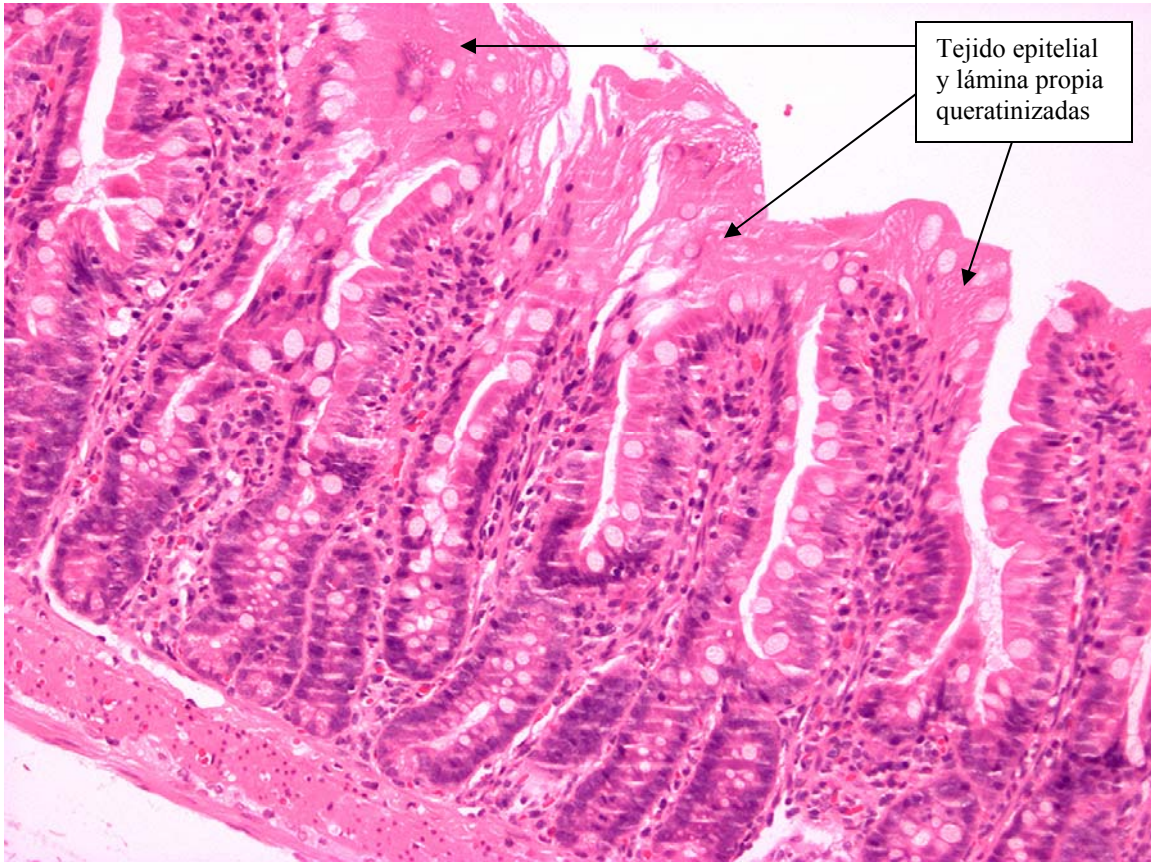


Figura 4.4. Fotografía del íleon de rata con Nivel 2, daño del tercio distal de la vellosidad. En este corte se observa que se alcanza a dañar tejido epitelial y lámina propia, afectando al tercio distal de la vellosidad. Se muestran células queratinizadas, y un apelmazamiento o coágulo amorfo conformado por fibrina (exudado fibrinoso) resultado de la inflamación aguda. (H-E, X100)



Figura 4.5. Fotografía del íleon de rata con Nivel 3, daño del tercio intermedio de la vellosidad. En este corte se observa claramente la transición brusca entre la mucosa normal y la mucosa lesionada. Se observan lesiones en tejido epitelial y en la lámina propia, afectando hasta al tercio intermedio de la vellosidad. Se observa un gran coágulo amorfo que es la gran trama rosada de exudado de fibrina. (H-E, X10)



Figura 4.6. Fotografía del íleon de rata con Nivel 4, daño del tercio basal de la vellosidad. En este corte se observan vellosidades dañadas hasta la zona de las glándulas, afectando tejido epitelial y lámina propia. Como en los otros niveles donde se encuentra daño, hay apelmazamiento de células queratinizadas o exudado de fibrina. También se observan artefactos correspondientes a la técnica histológica. (H-E, X100)

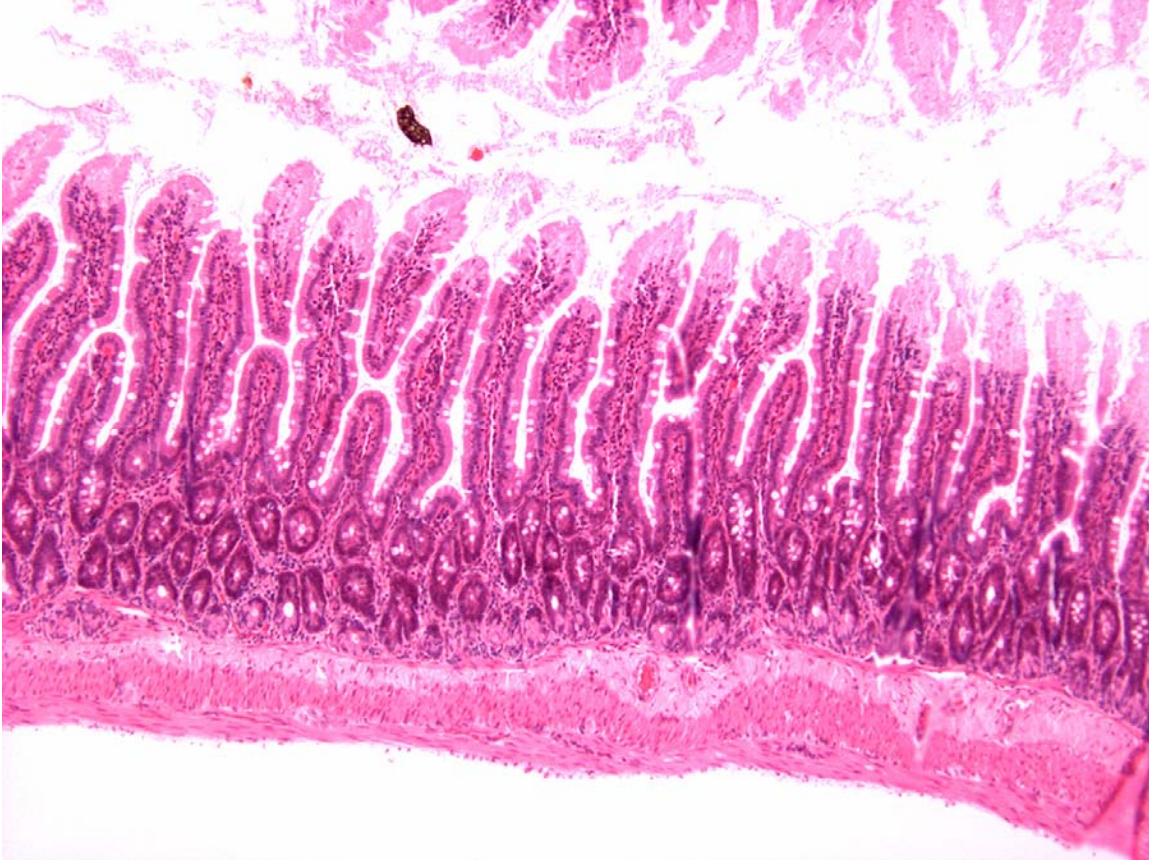


Figura 4.7. Fotografía del ileon de rata con daño isquémico. A diferencia del daño caracterizado por coagulación, el daño isquémico no es localizado en una zona claramente delimitada, sino se extiende por toda la mucosa gastrointestinal. Se observa muerte celular por falta de núcleo, más no se muestran coágulos amorfos de fibrina resultado de una inflamación aguda, sino una desintegración paulatina de las vellosidades, comenzando por las puntas. (H-E, X10)

De las 180 muestras biológicas que se programaron en el diseño experimental, se cuenta con 174 muestras. 4 de ellas no se hicieron por un error de programación de condición (I1T1F2, I1T1F4, I2T2F2 y I4T3F3) una de ellas se perdió por un error en la técnica histológica, esta se incluyó incorrectamente y la muestra no se pudo reincluir y recuperar. Y finalmente se descartó una muestra para el análisis (I1T2F3) pues presentó isquemia, sin presentar daño coagulativo y no fue posible asignarle un nivel de daño con certidumbre. De las 30 muestras de control, ninguna de ellas presentó daño por coagulación y sólo una de ellas mostró señales de isquemia.

De los valores de Impedancia (Amp y Fase) y los valores de energía inyectada a cada muestra, se cuentan con 176 valores, de los cuales únicamente los valores que corresponden a las corrientes de 1 mA y 2.5 mA son confiables, ya que en los demás valores se encontró que los amplificadores de instrumentación se saturaban generando un cálculo incorrecto de los parámetros eléctricos del tejido. Esta situación impidió hacer un análisis de relación entre el nivel de energía inyectado y el daño medido por histopatología. Sin embargo sí se logró hacer un análisis de relación entre el nivel de corriente inyectada y el daño medido por histopatología.

4.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

El ANOVA es una técnica en la que la varianza total de un conjunto de datos se divide en dos o más componentes, y cada uno de ellos se asocia con una fuente específica de variación, de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total.

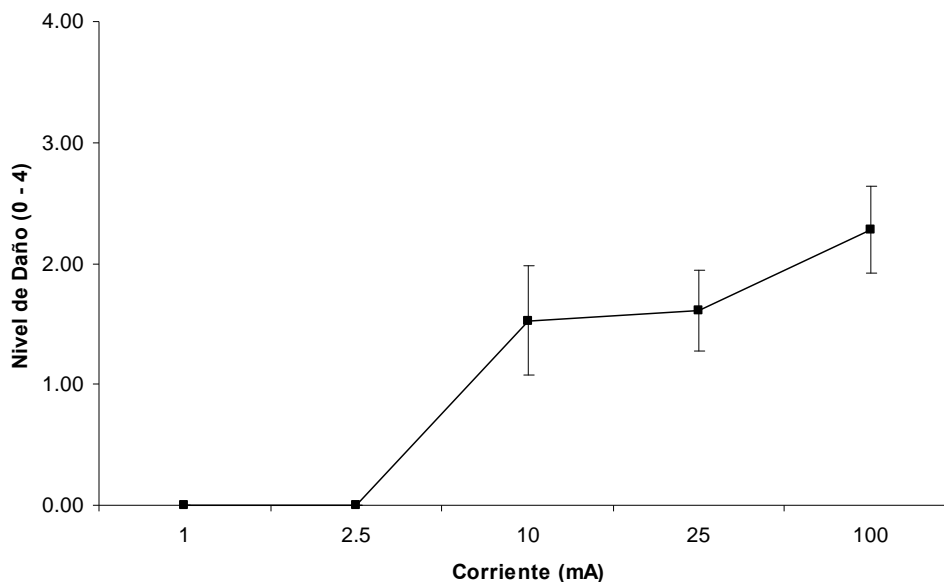
En nuestro caso, realizamos una ANOVA para analizar la magnitud con la que contribuyen la corriente (I), el tiempo de estimulación (T) y la frecuencia (F) en la variación del daño en la pared de la mucosa gastrointestinal. Los resultados de este análisis se resumen en la tabla 4.1. Ahí podemos observar que el principal factor de influencia en el incremento del daño es la corriente, con una $F = 9.9$ y una $P < 0.0001$. Los factores de tiempo y frecuencia no afectan significativamente el cambio del nivel del daño.

ANOVA						
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	P	(Alpha=0.05)
A: corriente	4	129.6083	32.40208	54.38	0.000000*	1
B: Tiempos	2	1.194889	0.5974445	1	0.370149	0.221053
AB	8	3.646464	0.455808	0.76	0.634241	0.340037
C: Frecuencia	3	3.667701	1.222567	2.05	0.110655	0.514065
AC	12	8.402716	0.7002264	1.18	0.309406	0.64043
BC	6	0.7341366	0.1223561	0.21	0.974504	0.101759
ABC	24	10.6796	0.4449833	0.75	0.792855	0.584467
S	113	67.33334	0.5958702			
Total (Ajustado)	172	227.3873				
Total	173					

Tabla 4.1. Análisis de la varianza del nivel de daño a diferentes intensidades de corriente, frecuencia y tiempo de estimulación. Observe que la variación debida a la corriente es mucho mayor que los demás factores (P<0.0001). Se utilizó el software de estadística comercial NCSS.

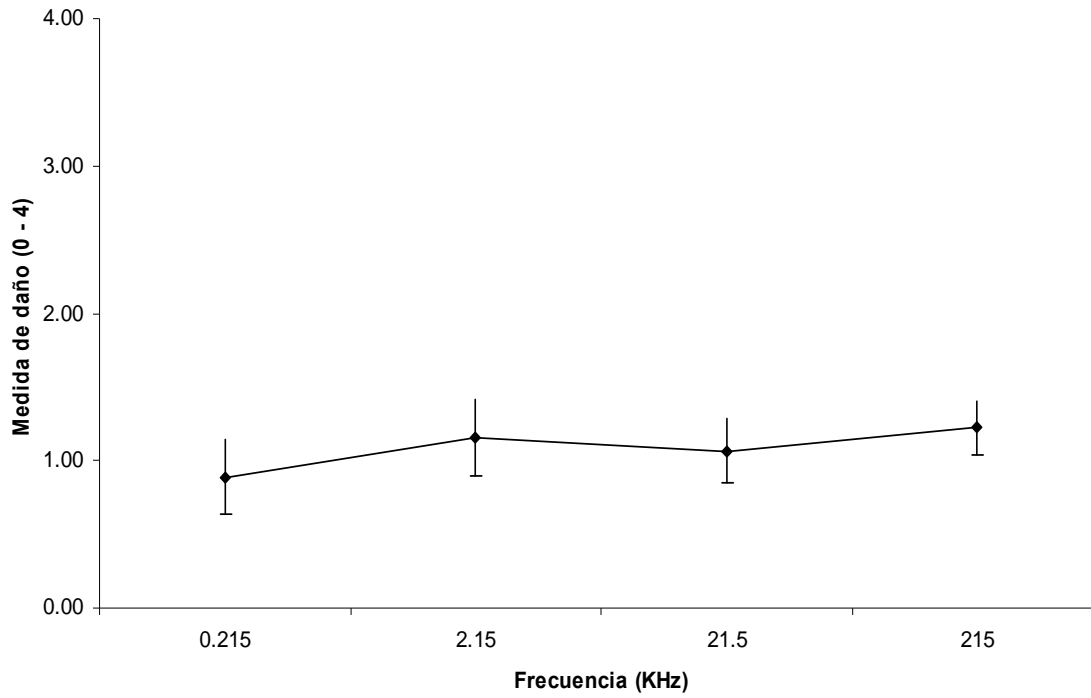
A continuación se muestran las gráficas con la media de los promedios del nivel de daño considerando todas las muestras histológicas obtenidas.

Variación del nivel de daño en función del nivel de corriente (I)



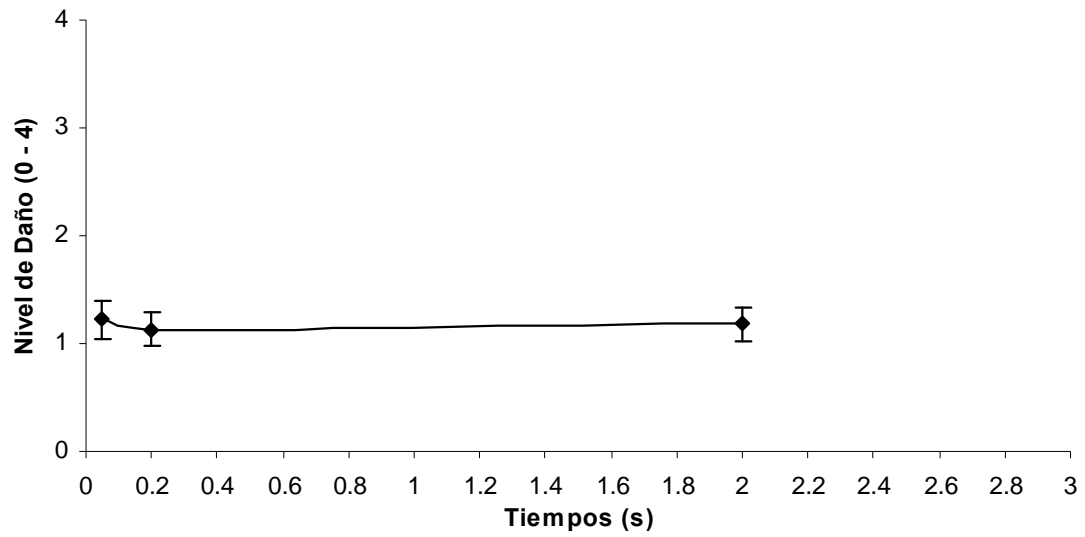
Gráfica 4.1 Medias de los promedios del nivel de daño agrupados por nivel de corriente. No se registra ningún daño a 1 y 2.5 mA. Claramente se observan cambios incrementales en el daño al incrementarse la corriente a partir de 10 mA. Se muestran los errores estándar en cada uno de los grupos de corrientes.

Variación del nivel de daño en función de la frecuencia (F)



Gráfica 4.2 Medias de los promedios del nivel de daño agrupados por nivel de frecuencia. Se muestran los errores estándar en cada uno de los grupos de frecuencia. No es evidente un cambio en la impedancia debido a la frecuencia.

Variación del nivel del daño en función del Tiempo (T)



Gráfica 4.3 Medias de los Promedios del nivel de daño agrupados por nivel de tiempo de estimulación. Se muestran los errores estándar en cada uno de los grupos de frecuencia. No es evidente un cambio en la impedancia debido al tiempo.

4.3. EFECTOS DE LOS FACTORES DE ESTIMULACIÓN EN LA MUCOSA GÁSTRICA, MEDIANTE EL NIVEL DE DAÑO.

En esta sección se presentan el análisis estadístico descriptivo de los casos estudiados más representativos. Se realizó un análisis del daño encontrado en el tejido en función de los tres factores de influencia. Cada nivel de cada factor se analizó de manera independiente en conjunto con el total de niveles de los otros dos factores. En cada caso se calculó la media (μ) y el error estándar como medida de dispersión. Se graficaron los casos representativos buscando la interacción entre los factores, es decir, si un cambio en uno de los factores produce un cambio en la respuesta en un nivel del otro factor diferente del que se produce en otros niveles de ese factor, podríamos decir que existe interacción entre los dos factores.

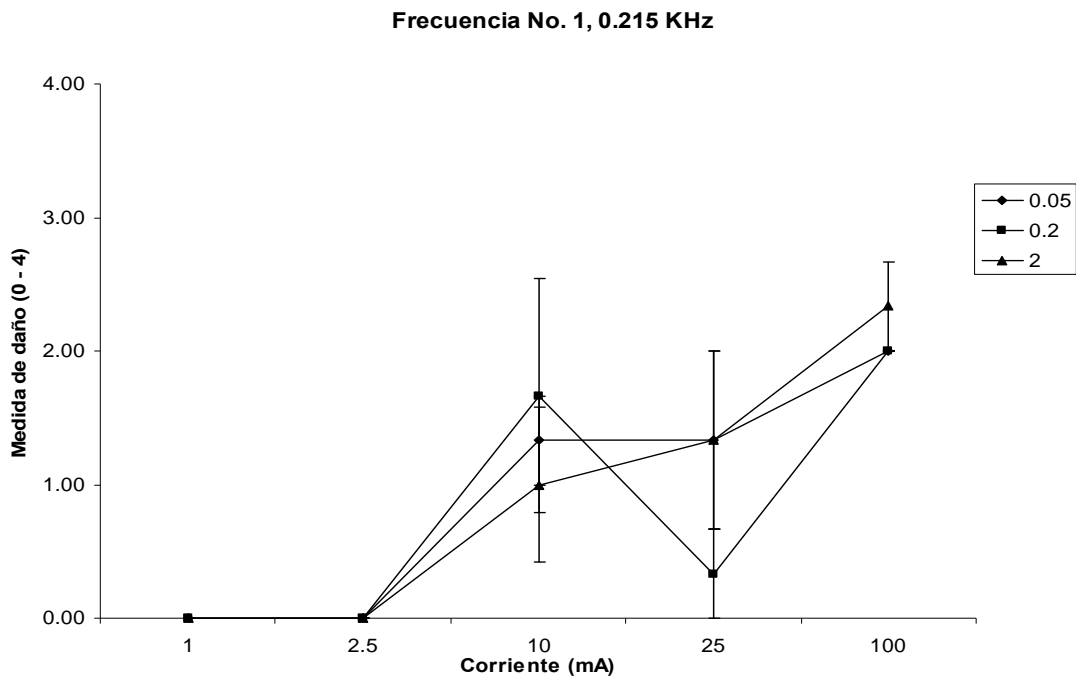
En esta sección, se observa que la dispersión es mínima en la mayoría de los casos. También se hace notar que para los niveles de tiempo seleccionados no es evidente una interacción significativa con los factores de frecuencia y corriente, con algunas excepciones que se comentan en cada caso. También se aprecia que a los niveles de corriente de 1 y 2.5 mA no se registró ningún nivel de daño, mientras que a los 3 siguientes niveles sí se registra daño sin que los distintos niveles de tiempo o frecuencia afecten significativamente.

4.3.1. Factor de Frecuencia (F), interacción entre el tiempo y la corriente.

Factor Frecuencia = 0.215 KHz			
Factor I (mA)	Factor Tiempo (T), s		
	0.05	0.2	2
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	1.33	1.67	1.00
25	1.33	0.33	1.33
100	2.00	2.00	2.33

Error Estándar			
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	0.33	0.88	0.58
25	0.67	0.33	0.67
100	0.00	0.00	0.33

Tabla 4.2. Relación de las μ de daño registradas con F = 0.215 KHz, en cinco niveles de corriente y en 3 niveles de tiempo. Indicando el error estándar de cada grupo. (n = 3)



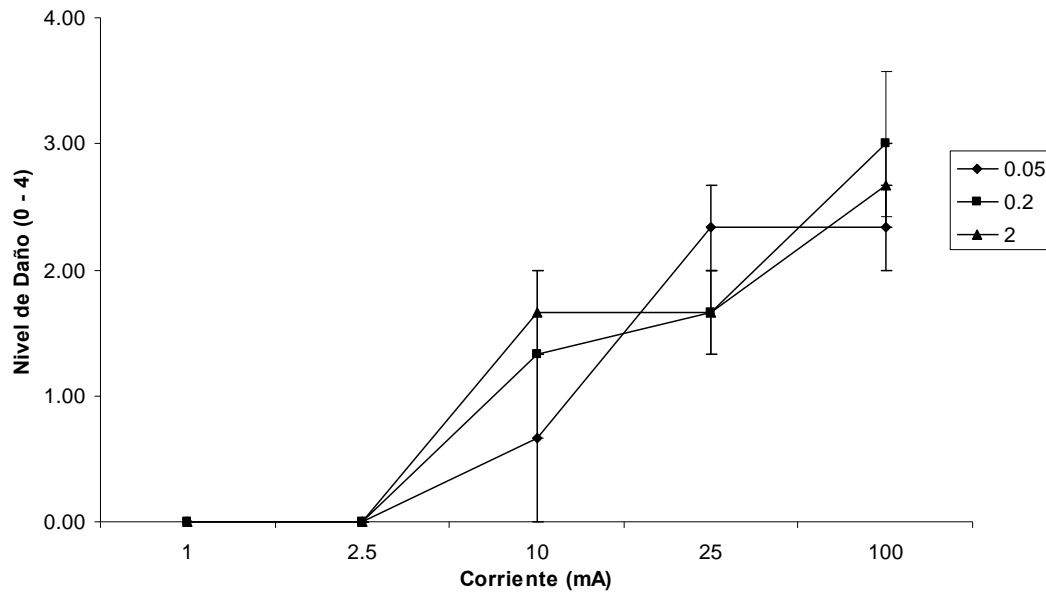
Gráfica 4.4 Efectos de la corriente y el tiempo con 0.215 KHz de estimulación. No se registra ningún daño con las corrientes igual a 1 y 2.5 mA a ningún tiempo de estimulación. Se observa un claro incremento del daño conforme incrementa la corriente.

Factor Frecuencia = 2.15 KHz			
Factor I (mA)	Factor Tiempo (T), s		
	0.05	0.2	2
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	0.67	1.33	1.67
25	2.33	1.67	1.67
100	2.33	3.00	2.67

Error estándar			
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	0.67	0.67	0.33
25	0.33	0.33	0.33
100	0.33	0.58	0.33

Tabla 4.3. Relación de las μ de daño registradas con F = 2.15 KHz, en cinco niveles de corriente y en 3 niveles de tiempo. Indicando el error estándar de cada grupo. (n = 3)

Frecuencia No. 2, 2.15 KHz

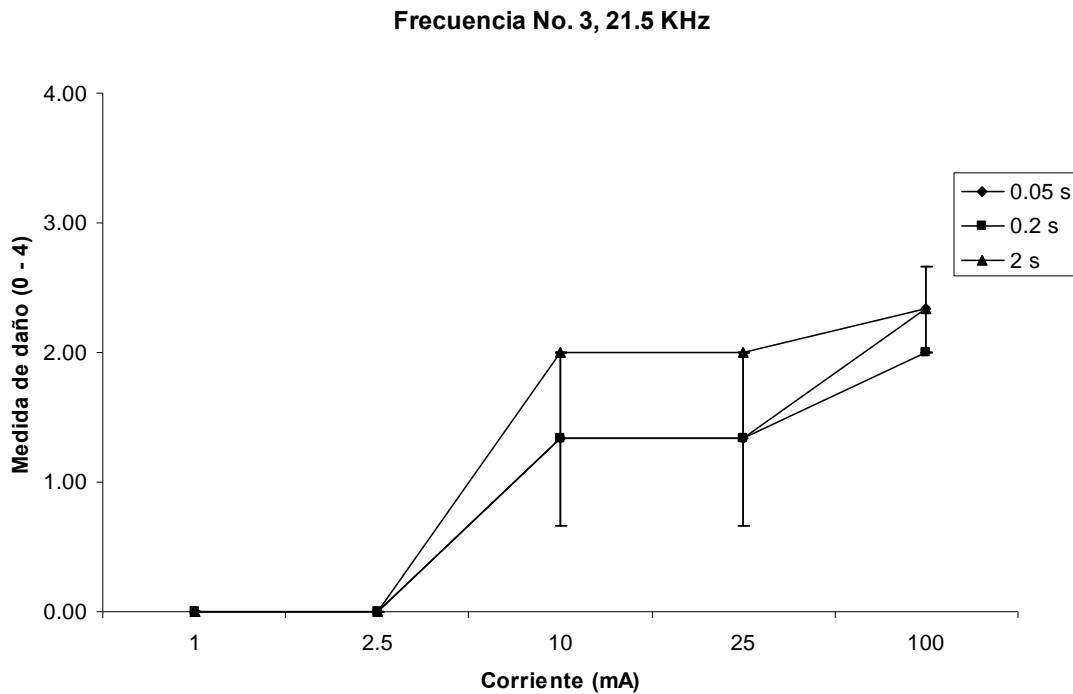


Gráfica 4.5 Efectos de la corriente y el tiempo con 2.15 KHz de estimulación. No se registra ningún daño con las corrientes igual a 1 y 2.5 mA a ningún tiempo de estimulación. Se observa un claro incremento del daño conforme incrementa la corriente.

Factor Frecuencia = 21.5 KHz			
Factor I (mA)	Factor Tiempo (T), s		
	0.05 s	0.2 s	2 s
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	1.33	1.33	2.00
25	1.33	1.33	2.00
100	2.33	2.00	2.33

Error estándar			
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	0.67	0.67	0.00
25	0.67	0.67	0.00
100	0.33	0.00	0.33

Tabla 4.4. Relación de las μ de daño registradas con F = 21.5 KHz, en cinco niveles de corriente y en 3 niveles de tiempo. Indicando el error estándar de cada grupo. (n = 3)

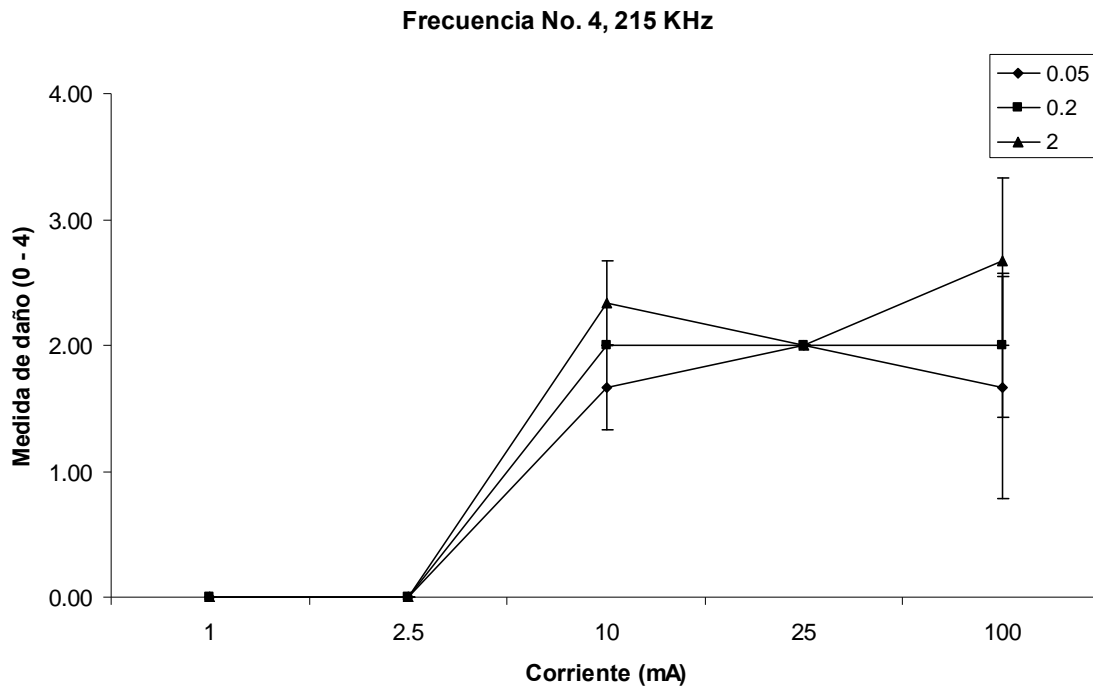


Gráfica 4.6. Efectos de la corriente y el tiempo con 21.5 KHz de estimulación. No se registra ningún daño con las corrientes igual a 1 y 2.5 mA a ningún tiempo de estimulación. Se observa un claro incremento del daño conforme incrementa la corriente.

Factor Frecuencia = 215 KHz			
Factor I (mA)	Factor Tiempo (T), s		
	0.05	0.2	2
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	1.67	2.00	2.33
25	2.00	2.00	2.00
100	1.67	2.00	2.67

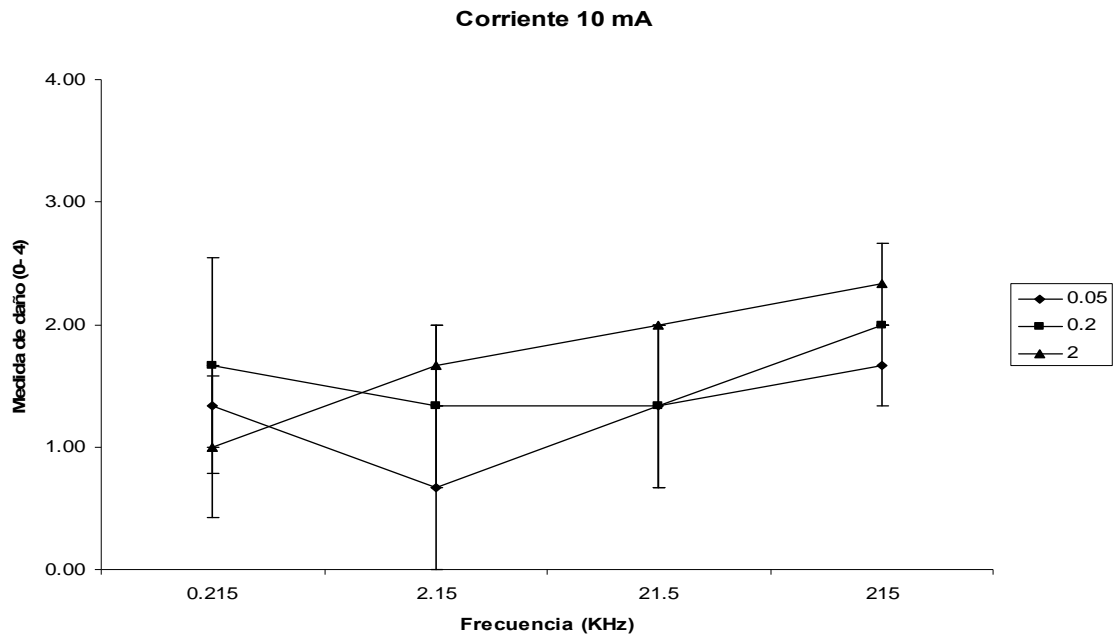
Error estándar			
1	0.00	0.00	0.00
2.5	0.00	0.00	0.00
10	0.33	0.00	0.33
25	0.00	0.00	0.00
100	0.88	0.58	0.67

Tabla 4.5 Relación de las μ de daño registradas con F = 215 KHz, en cinco niveles de corriente y en 3 niveles de tiempo. Indicando el error estándar de cada grupo. (n = 3)

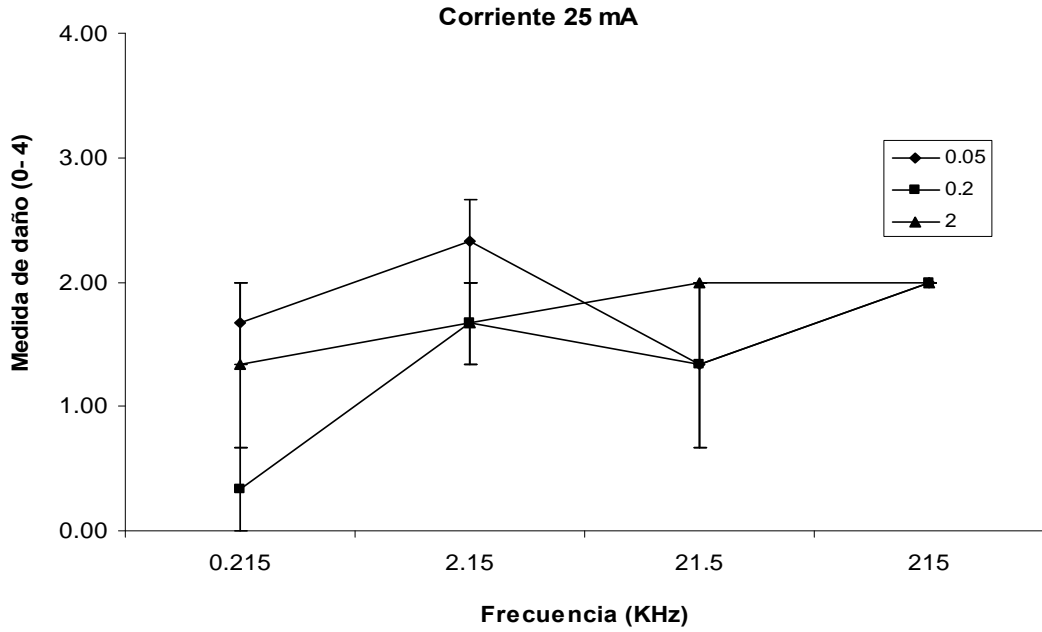


Gráfica 4.7. Efectos de la corriente y el tiempo con 215 KHz de estimulación. No se registra ningún daño con las corrientes igual a 1 y 2.5 mA a ningún tiempo de estimulación. Se observa un mayor efecto a mayor tiempo de estimulación a excepción de los valores medidos a 25 mA, donde no hay ninguna diferencia en el daño.

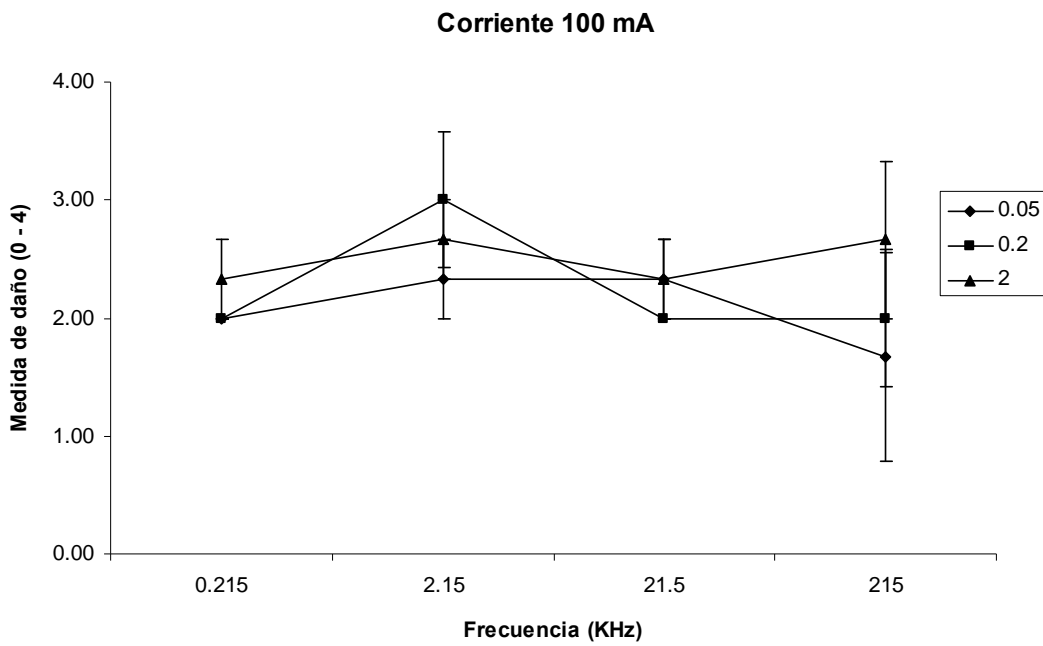
4.3.2. Factor de Corriente (I), interacción entre el tiempo y la Frecuencia.



Gráfica 4.8. Efectos del tiempo y la corriente con 10 mA de estimulación. Se puede observar una clara tendencia de incremento en el daño conforme aumenta la frecuencia. No se observa una diferencia significativa en el incremento de daño debido al incremento en el tiempo de estimulación.



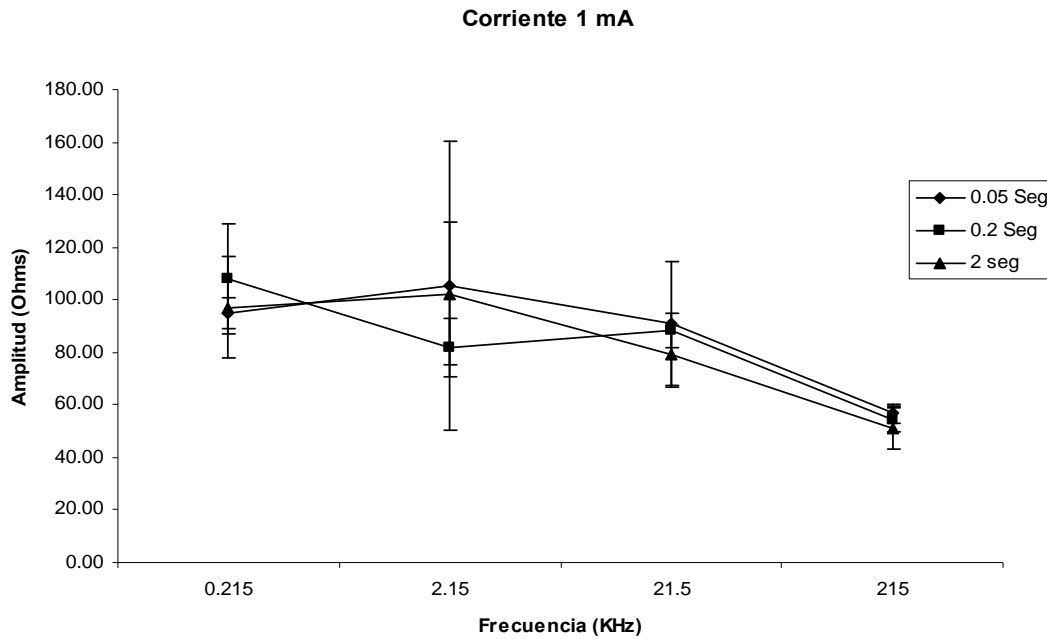
Gráfica 4.9. Efectos del tiempo y la corriente con 25 mA de estimulación. Se observa que a bajas frecuencias existe una mayor dispersión que a altas frecuencias, donde el resultado es muy homogéneo.



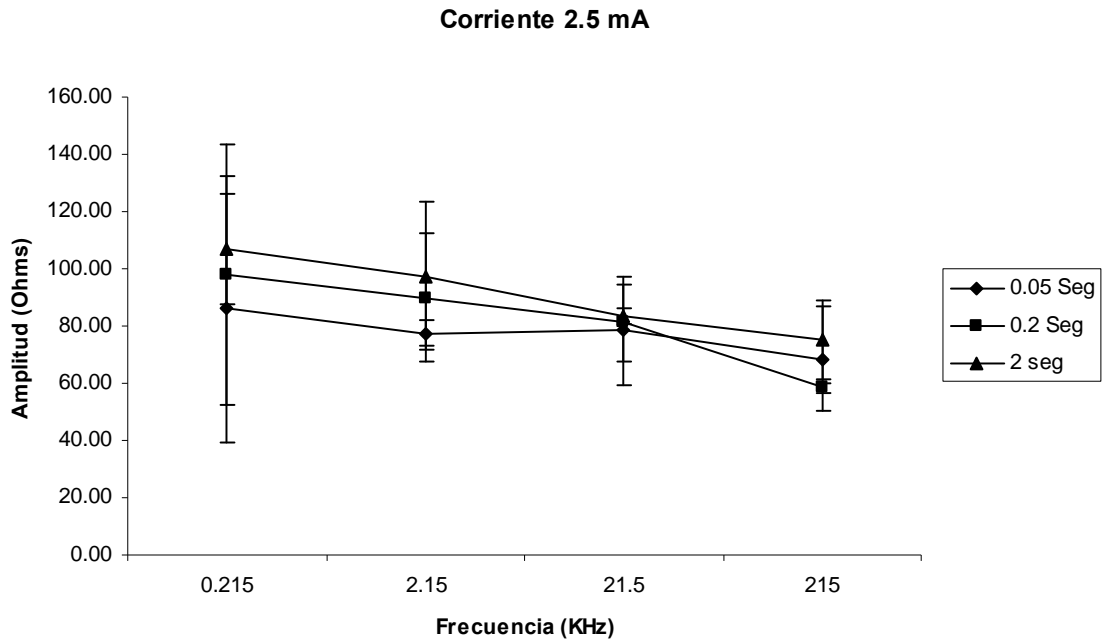
Gráfica 4.10 Efectos del tiempo y la corriente con 100 mA de estimulación. Se observan niveles de daño muy homogéneos en todo el rango de frecuencias y en todos los tiempos.

4.4. AMPLITUD DE ESPECTROS DE IMPEDANCIA DE LA MUCOSA GÁSTRICA.

Se obtuvieron espectros de impedancia de la mucosa gástrica bajo condiciones de estimulación de 1 y 2.5 mA. A continuación se muestran las gráficas obtenidas.



Gráfica 4.11. Medias de los promedios de amplitudes de cada tiempo agrupadas por frecuencias, considerando tan sólo la corriente de 1 mA. Se puede observar que la impedancia es más baja conforme aumenta la frecuencia de estimulación. No se observa una diferencia significativa en función del tiempo en relación directa con las frecuencias.



Gráfica 4.12. Medias de los promedios de amplitudes de cada tiempo agrupadas por frecuencias, considerando tan sólo la corriente de 2.5 mA. Se puede observar que la impedancia es más baja conforme aumenta la frecuencia de estimulación. No se observa una diferencia significativa en función del tiempo ya que aunque sí es evidente que a mayor tiempo, hay un mayor daño, este es mínimo y las barras de error se traslapan.

5. Discusión

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL NIVEL DE DAÑO.

En primer lugar es importante mencionar que histológicamente las características identificadas como daño por coagulación, mencionadas en el capítulo 3 de esta tesis, son muy distintas a las características encontradas por daño isquémico. Esto se puede deber principalmente a la diferente evolución en tiempo con la que se incrementa una lesión en comparación con la otra. En el caso del daño por isquemia, presenta despegamiento del epitelio, desintegración paulatina de las puntas, edema, hemorragia intersticial e hiper celularidad de la lámina propia y necrosis con esfacelación de la mucosa. Al contrario, las lesiones provocadas por estimulación eléctrica, a excepción del desprendimiento del epitelio, no presenta ninguna de las características mencionadas, no se observan agregados linfocitarios ni edema, sino una inflamación aguda que desemboca en el desprendimiento del epitelio y en la formación de un exudado fibroso o coágulo amorfo. Esto se pudo corroborar al no encontrar muestras de incremento en los leucocitos en el daño por coagulación. Como una posible consecuencia primordial de estas diferencias, la impedancia resultante de una alteración patológica por isquemia en la mucosa gástrica tendría diferencias significativas en relación con la impedancia resultante de alteraciones en la mucosa por quemadura o inflamación aguda como es el caso de este estudio.

5.2. DATOS EXPERIMENTALES.

La tabla del anexo A-1 que corresponde al total de datos de experimentación obtenidos durante el estudio experimental. Se cuenta con 174 muestras histológicas con alguna clase de estimulación y 30 muestras más que no recibieron estimulación alguna. Así mismo, se cuentan con 176 mediciones de impedancia compleja y 176 valores de energía inyectada al tejido. Sin embargo sólo los valores de impedancia correspondientes a las

corrientes de 1 y 2.5 mA son confiables, ya que como se comentó en el capítulo 4, el espectrómetro presentó una saturación en la mayoría de los espectros correspondientes a niveles superiores o iguales a 10 mA. Obsérvese que cada valor de amplitud y fase, muestra una dispersión. Esa dispersión es la desviación estándar resultante de las 15 repeticiones de cada caso. En el caso de la amplitud, la desviación es mínima lo cual demuestra que el valor de la impedancia permaneció constante durante las 15 mediciones. Sin embargo se obtuvo un valor de amplitud, I2T2F1 que presenta una desviación estándar mayor al 50%. Se revisaron las 15 repeticiones y se observó que hubo un posible error en la captura de algunos de los 15 datos, generando una señal altamente ruidosa, este valor no fue incluido en el análisis de varianza. De igual forma los valores de fase presentan también desviaciones mínimas, por lo que el valor de la fase permaneció constante durante las 15 mediciones.

5.3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

El análisis de varianza realizado utilizando el nivel de daño asignado en función de los distintos niveles de corriente (I), frecuencia (F) y Tiempo (T) nos confirma lo que gráficamente hemos identificado. El ANOVA mostró que el factor con mayor efecto en el cambio de la morfología histológica y por tanto puede presumirse, más no afirmarse, en el cambio de la impedancia, es la corriente que mostró una $P < 0.0001$, mientras que la frecuencia y el tiempo no mostraron ser factores significativos. En la Gráfica 4.1 se muestra el promedio de todos los datos agrupados por nivel de corriente, se puede observar claramente un incremento en el nivel de daño conforme aumenta el nivel de corriente, este patrón es el esperado conforme a que a mayores corrientes, se incrementa la temperatura causando daños en las membranas de las células y se genera el efecto de electroporación debido a los campos eléctricos. De igual forma se puede ver que a niveles de 1 y 2.5 mA no se registró ningún daño por medios histopatológicos, esto en gran parte porque no se alcanzan los niveles de energía necesarios. De acuerdo a los valores de impedancia medidos, el nivel promedio de energía inyectado con corrientes de 1 mA es

de 5.08 μ Joules y con corrientes de 2.5 mA, el promedio estimado es de 20 μ Joules lo cual son niveles de energía muy bajos.

En la Gráfica 4.2 se muestra el promedio de todos los datos agrupados por nivel de frecuencia. Considerando todos los datos, es mínimo el efecto entre el nivel de daño y el cambio en la frecuencia. Con base en los rangos de frecuencia presentados en el capítulo 2, podemos ver que las células sufren daño desde niveles de corriente directa (DC) hasta altas frecuencias, con algunas diferencias biofísicas dependiendo del rango de frecuencia, por lo que es de esperarse que la frecuencia no haga una diferencia significativa. Finalmente en la gráfica 4.3 se muestra el promedio de todos los datos agrupados por nivel de tiempo, al igual que con las frecuencias, no se observa una asociación significativa entre el nivel de daño y los tiempos de estimulación usados. En este caso, es muy posible que los tiempos de estimulación seleccionados estén muy por arriba de aquellos niveles donde se observe una mayor sensibilidad. Los estudios encontrados utilizan niveles de 0.5 ms a 10 ms, mientras que en este estudio partimos de 50 ms, debido a que es el nivel de excitación definido en el equipo de medición.

5.4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ESTIMULACIÓN EN LA MUCOSA GÁSTRICA, MEDIANTE EL NIVEL DE DAÑO.

El análisis de los niveles de daño muestra que estimulando el tejido a 1mA y 2.5 mA, no se causa daño en la mucosa gástrica. El daño se registra a partir de los 10 mA, y al aumentar la intensidad de corriente de estimulación, el nivel de daño es mayor, esto se puede notar claramente en el incremento de las medias de cada nivel de corriente presentado en las gráficas 4.4 a la 4.7 del capítulo 4. Como hemos mencionado, este efecto es el esperado, considerando que a una mayor energía eléctrica, se incrementará en proporción la temperatura y se generarán campos eléctricos que desnaturalizan las membranas celulares. También se quiere hacer notar que hay un efecto de la frecuencia en estimulaciones con 10 mA de corriente (gráfica 4.8) Se puede observar un incremento en las medias de los valores de daño, efecto que desaparece a corrientes más altas (Gráficas 4.9 y 4.10). Este efecto refleja un par de cosas importantes: a) la primera, correspondiente al incremento del daño con relación al incremento de la frecuencia,

guarda mucha relación a los distintos mecanismos de efectos biológicos que se generan a distintos niveles de frecuencias. De 0 a 10 KHz sufre daño por calentamiento o electroporación, a partir de los 10KHz, además del efecto por calentamiento, tiene un efecto dieléctrico sobre las proteínas, por lo que al ir incrementando la frecuencia el daño se acumula. B) es posible que a 10 mA, el daño no sea tan contundente como a corrientes mayores y es por eso que en las gráficas posteriores no vemos ningún efecto de la frecuencia. También podemos notar en la gráfica 4.8, que al parecer, a 10 mA existe una interacción entre la frecuencia 2.15 KHz y el tiempo de 2 segundos, ya que la respuesta cambia en comparación de los demás niveles de tiempo. Si observamos las gráficas 4.6 a la 4.7, es evidente que a las corrientes de 10, 25 y 100 mA, hay un incremento en las pendientes de los valores de daño y debido al incremento en el tiempo, estas pendientes se separan (sólo en las corrientes de 10 y 100 mA.). Este efecto es muy notorio en la gráfica 4.7, donde el efecto de las corrientes 10 y 100 mA aumenta las pendientes y el efecto del tiempo separa dichas pendientes. Al contrario, a 25 mA, no presenta cambios en la separación de las pendientes lo que podría significar un efecto de interacción diferente entre el tiempo y el nivel de 25 mA que en los otros niveles de corrientes. Esto es más evidente en la segunda y cuarta frecuencia.

Por otro lado, aunque los resultados no concluyen contundentemente que el tiempo sea un factor que influya significativamente en las alteraciones a los tejidos y por tanto la generación del daño, cabe mencionar que sí se observa mayor daño en función del tiempo, a 10 mA de estimulación como se puede observar en la Gráfica 4.8. Esta y las anteriores observaciones hacen pensar que a 10 mA, el tejido es sumamente sensible a las interacciones entre el tiempo, la frecuencia y el nivel de corriente de estimulación, no siendo así en niveles mayores de corriente donde el efecto de la corriente es muy superior al efecto del resto de los factores.

Con respecto al análisis de la amplitud de la impedancia medida, en función de la corriente inyectada bajo distintas condiciones, podemos discutir lo siguiente.

Obsérvese que desde un análisis frecuencial, para las corrientes de 1 y 2.5 mA, la amplitud de la impedancia es mayor a bajas frecuencias y disminuye a altas frecuencias como podemos ver en las gráficas 4.11 y 4.12. Este es un patrón muy caracterizado y tiene que ver con la oposición que ponen las células al paso de la corriente a bajas frecuencias, no siendo así a altas frecuencias. A niveles iguales o superiores a 10 mA, la amplitud de la impedancia no se pudo calcular con confiabilidad por lo que no se pudo hacer un análisis a detalle de estas señales.

Aunado a lo anterior, la frecuencia 21.5 KHz, parece ser la que muestra un mayor efecto en la impedancia en comparación con las demás frecuencias. Si se observan las gráficas 4.11 y 4.12., podrán notar que es en esta frecuencia donde la impedancia comienza a disminuir en mayor grado y en comparación con las frecuencias menores teniendo la mayor caída a 215 KHz. Esto es importante considerarlo para futuros estudios donde se quiere considerar una sola frecuencia. Finalmente también nótese que a un tiempo de estimulación de 2 segundos, estos cambios son más pronunciados en todas las frecuencias.

5.5. DETECCIÓN DE UMBRAL DE DAÑO.

Con base en los resultados encontrados por el análisis histopatológico, no se encontró daño por debajo de 2.5 mA, sino hasta niveles de 10 mA es donde se comienza a causar daño. De acuerdo a esta evidencia, podríamos afirmar que los niveles de 1 y 2.5 mA no causaron ningún daño bajo las condiciones experimentales y que el umbral de daño está por arriba de los 10 mA. Sin embargo, habría que hacer un estudio adicional que evaluar el rango de corrientes entre 2.5 y 10 mA para definir un umbral con mayor certeza.

6. Conclusiones

Se caracterizó el daño por estimulación eléctrica, el cual presentó características histológicas distintas al daño isquémico. Se clasificó en 5 niveles y con base en estos se hizo el análisis de los resultados.

Los resultados experimentales probaron que valores iguales o menores a 2.5 mA no causan ninguna alteración en los tejidos de la pared de la mucosa, ni ningún tipo de daño, esto en ninguna de las frecuencias, ni en ninguno de los tiempos de estimulación, por lo que podría presumirse que los cambios de impedancia medida durante su uso clínico, refleja los cambios debidos a condiciones clínicas del paciente y no a interacciones entre el instrumento y la zona de medición. Lo anterior aprueba la hipótesis de este trabajo y valida la seguridad de estos parámetros en el uso clínico del sistema de espectroscopia de impedancia. Sin embargo dadas las condiciones ideales del modelo experimental, donde los electrodos tenían pleno contacto superficial con la pared gastrointestinal y considerando que esta situación no será del todo repetible en casos clínicos reales, no se recomienda utilizar valores de corriente mayores a 1 mA, ya que al reducir el área de contacto, se incrementa la densidad de corriente, por lo que es recomendable manejar los niveles mínimos de estimulación. Aunado a la disminución del área de contacto, en condiciones clínicas, los tejidos estarán expuestos a cambios de impedancia provocados por condiciones de isquemia, estos cambios de impedancia pueden provocar un incremento en la susceptibilidad al paso de la corriente, por lo que se enfatiza la recomendación de usar los mínimos niveles de estimulación permisibles.

Se encontró que la corriente es el principal factor de influencia en la generación de cambios estructurales en la mucosa, el análisis de varianza mostró una $P < 0.001$ para la corriente, mientras que los demás factores no presentaron cifras significativas de influencia en el daño tisular. Sin embargo, se observó que la frecuencia juega un papel importante al interaccionar con el tiempo en niveles de corriente iguales a 10 mA, pues sí se observaron tendencias de incremento del daño conforme aumenta la corriente y el tiempo.

Debido a la falta de datos de impedancia compleja correspondientes a niveles iguales o mayores a 10 mA, no se logró calcular y detectar un umbral de energía en el que se comienza a causar daño, sin embargo sí se comprobó que a partir de 10 mA se genera daño tisular. Esto no asegura que con niveles superiores a 2.5 mA y menores a 10 mA no se generan alteraciones estructurales en los tejidos.

6.1. TRABAJOS FUTUROS

Este estudio valida los niveles permisibles en el uso de la espectroscopía de impedancia con el sistema diseñado. Sin embargo, el autor recomienda los siguientes estudios de consolidación:

Realizar un estudio enfocado en el rango de corrientes entre 2.5 y 10 mA, bajo dos modelos distintos: uno en el que se midan las características normales del tejido sano y posteriormente otro modelo en el que se cause daño isquémico al tejido para así medir los cambios de sensibilidad y resistencia del tejido al estar expuesto a cambios estructurales. Se propone que en este estudio se obtengan espectros de impedancia compleja que permitan encontrar el umbral de energía y realizar comparaciones bajo las distintas condiciones experimentales y de igual forma se recolecten muestras biológicas que permitan identificar los cambios estructurales que se estarán monitoreando con el sistema de espectroscopía de impedancia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geddes, L. A.; Baker L. E. Principles of Applied Biomedical Instrumentation. 3ª. Edición. Wiley & Sons Publication. Estados Unidos de América. 266-273, 537-578. 1989.
2. Kun S, Peura RA, “Tissue ischemia detection using impedance spectroscopy”, Proceedings, IEEE/EMBS 16th Annual International Conference, PP. 868-9, Baltimore, 1994.
3. Othman, Salah. Espectrómetro de impedancia para monitoreo de daño isquémico tisular. Tesis de Maestría. Posgrado en Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. Diciembre 1999.
4. González Díaz, César A. Evaluación de un sistema de espectroscopía de impedancia para monitoreo de daño isquémico en la mucosa intestinal. Tesis de Maestría. Posgrado en Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. Mayo 2000.
5. Schwan HP., “Electrical properties of Tissue and Cell Suspension”, Adv. Biol. Med. Phys., Vol. 5, pp. 147-209, 1957.
6. González CA, Villanueva C, Othman S, Narváez R, Sacristán E, “Impedance spectroscopy for monitoring ischemic injury in the intestinal mucosa”, Physiological Measurements 2003; 24(2): 277-289.
7. Schwan P. Herman, Kay F Calvin. “Specific Resistance of Body Tissues”. Circulation Research, Vol. IV, November 1956.
8. IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 KHz to 300 GHz. IEEE Std C95.1, 1999 Edition.
9. Guyton, A. C. Tratado de Fisiología Médica. 6ª. Edición. Editorial Interamericana. México. 1987.
10. Gartner L.P., Hiatt J.L., “Texto Atlas de Histología” Edit. McGraw-Hill. 2ª Ed. 2002.

11. Fiddian-Green RG, "The role of the gut in shock and resuscitation", *The importance of regional blood flow in the critically ill patient*, Clinical Intensive Care, Supplement to Vol.3 No.1, 1992.
12. Doglio et al-"Gastric mucosal pH as a prognostic index of mortality in critically ill patients", Critical Care Medicine, Vol. 19 No. 8: 1037-1040, 1991.
13. Fiddian-Green, Richard G. Studies in splanchnic ischemia and multiple organ failure. In: Splanchnic ischemia and multiple organ failure. Editors: Marston, Bulkley, Fiddian-Green, Haglund. The C. V. Mosby Co. St. Louis, MI, U.S.A. 1989.
14. Fink MP, Antonsson JB, Wangtl, Rothschild HR . "Etiology of Increased Intestinal Permeabilidad in endotoxin pigs: limited role for mesenteric hypoperfusion." Archives of surgery. Vol. 126. 1991.
15. Haglund U, Bulkley GB, Granger DN, " On the Pathophysiology of Intestinal Ischemic Injury", Acta Phys. Scand. Vol. 153. 1987.
16. Fiddian-Green R G.; "Role of the gut in shock and resuscitation", Bailliere's Clinical Anesthesiology, Vol.5, No.1, 1991.
17. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR & McCord JM "Ischemic Injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals." Gastroenterology Vol. 82. 1982.
18. Haglund U, Montgomery A & Borgstrom A "Intraluminal Pancreatic proteases and Intestinal Mucosal Injury During Ischemia and Reperfusion" . Circulatory Shock . 1990.
19. Grisham, M.B. Granger, D. N. "Free Radicals: Reactive Metabolites of O₂ as mediators of postischemic reperfusion injury." In: Splanchnic ischemia and multiple organ failure. Editors: Marston, Bulkley, Fiddian-Green, Haglund. The C. V. Mosby Co. St. Louis, MI, U.S.A. 1989.
20. ACCM practice parameters, Part 2: "Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients", Critical Care Medicina, 1998.
21. Shoemaker WC, Apple PL, Kran HB, et al. "Prospective trials of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patient". Chest (in press).

22. Fiddian-Green RG, "Tonometry: Theory and Applications", Intensive Care World, 9(2):60.65, 1992.
23. Gutierrez G, and Steven D. Brown, "Gastric Tonometry: A New Monitoring Modality in The Intensive Care Unit", J Intensive care Med. Vol. 35, 1995.
24. Chaudhary S. S., Mishra R. K., Swarup A., Thomas J. M., "Dielectric properties of normal and malignant human tissues at radiowave and microwave frequencies". Indian J Biochen Biophys. Vol 19.
25. Macdonald J.D, "Impedance spectroscopy". Annals of Biomedical Engineering, Vol. 20, 1992.
26. Ristic B., "Development of a System for Tissue Ischemia Monitoring and Measurement using Impedance Spectroscopy", Thesis for Philosophy Doctor Degree (Biomedical Engineering), September, 1997.
27. Sánchez Y., Modelo de propagación de corriente eléctrica en el tejido intestinal sometido a espectroscopía de impedancia. 2004.
28. E. Sacristán, R. Amador, A. Rodríguez, M. Does, B Damon, J. Gore, "Dual frequency coil and MRIS Method for the Characterization of Ischemic Injury in the Intestinal Wall. IEEE – EMBS 2003.
29. Chatterjee I., D. Wu, and O.P. Gandhi (1986) Human Body Impedance and Threshold Currents for Perception and Pain for Contact Hazard Analysis in the VLF-MF Band IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. 33, No. 5, pp. 486-494.
30. M. Stephen Morse, "A study of carpal Tunnel Injury Following Electrical Trauma, IEEE-EMBS 2000.
31. Raphael C. Lee, Dajun Zhang, Jurgen Hannig., "Biophysical Injury Mechanics in Electrical Shock Trauma" Annu Rev. Biomed Eng. 2000.
32. Dalziel, C.F. and T.H. Mansfield (1950) EFFECT OF FREQUENCY ON PERCEPTION CURRENTS Trans. AIEE, Vol. 69, Pt. II, pp. 1162-1168.
33. Sacristán Emilio., IMPEDANCE SPECTROSCOPY SYSTEM AND CATHETER FOR ISCHEMIC MUCOSAL DAMAGE MONITORING IN HOLLOW VISCOUS ORGANS. No. Pat. US 6,882,879. 2005.

34. Sacristán E., IMPEDANCE SPECTROSCOPY METHOD FOR MONITORING ISCHEMIC MUCOSAL DAMAGE IN HOLLOW VISCOUS ORGANS. No. Pat. US 6, 965,795. B2. 2005.
35. Othman S., Sacristán E., COMPLEX IMPEDANCE SPECTROMETER USING PARALLEL DEMODULATION AND DIGITAL CONVERSION. No. Pat. 6,970,738. 2005.
36. Foster, K.R., Schwan, H.P. Dielectric Properties of tissue. CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 1989, 17, 25-104.
37. Gersing E., "Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs". Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45, 1998. 145-9.
38. González D.C.A., "Validación de la terapia guiada por espectroscopia de impedancia eléctrica gástrica de un modelo experimental de choque séptico inducido" Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-I. 2003.
39. Cotran R.S., Kumar V., Collins T., "Robbins: Patología Estructural y Funcional". Edit. McGraw-Hill, Interamericana. 6ª Ed. 2000.
40. Leeson T.S., Leeson C.R., Paparo A.A., "Texto/Atlas de Histología". Edit. McGraw-Hill Interamericana. 1ª ed. 1990.
41. Estrada F.E. et al., "Manual de Técnicas Histológicas". Edit. AGT Editor, S.A. 1ª Ed. 1982.
42. Martinsen, Ø.G., Grimmes, S., Schwan H. P. Interface Phenomena and Dielectric Properties of Biological Tissue. Encyclopedia of Surface and Colloid Science 2002.
43. Matthews, K.L., II, Chen, C.-T., Aarsvold, J.N., Mintzer, R.A., Cooper, M., Block, T.A., Capelli-Schellpfeffer, M.; Lee, R.C. Current research in radiotracer imaging of electroporation injury EMBS, 1996. Proceedings of the 18th Annual International Conference of the IEEE Volume 5, Issue. Nov 1996 Page(s):2187 – 2188. vol.5 Digital Object Identifier 10.1109/IEMBS.1996.646489

8. ANEXO 1

Tabla A-1. Resumen de resultados experimentales

Rata No.	Peso	Condición	<i>n</i>	Nivel Daño	Imp: Amp (Ω)	Imp: Fase (°)	Energía (J)
9	180.36		1	0	101.77 ± 3.25	6.22 ± 1.71	5.0886E-06
15	167.85	I1T1F1	2	0	92.67 ± 4.21	6.54 ± 2.08	4.63392E-06
20	166.43		3	0	90.65 ± 3.72	7.7 ± 2.26	4.53272E-06
25	172.65		1	0	84.16 ± 2.38	3.85 ± 1.55	1.68323E-05
2	176.51	I1T2F1	2	0	119.36 ± 2.5	4.8 ± 0.73	2.38728E-05
1	187.70		3	0	121.02 ± 6.05	4.97 ± 1.88	2.42044E-05
7	183.06		1	0	78.84 ± 2.49	7.52 ± 2.70	0.000157694
15	167.85	I1T3F1	2	0	94.98 ± 4.94	4.32 ± 1.4	0.00018997
22	165.48		3	0	117.35 ± 5.11	4.68 ± 2.02	0.000234714
7	183.06		1	0	66.73 ± 2.63	5.89 ± 1.84	3.33694E-06
25	172.65	I1T1F2	2				
13	167.17		3	0	144.40 ± 3.96	2.17 ± 1.82	7.22016E-06
14	174.17		1	0	94.10 ± 2.28	2.67 ± 0.93	1.88214E-05
5	170.54	I1T2F2	2	0	79.90 ± 2.97	5.27 ± 2.41	1.59803E-05
27	180.46		3	0	71.47 ± 2.82	0.74 ± 2.08	1.42957E-05
14	174.17		1	0	132.65 ± 4.74	3.91 ± 2.09	0.000265307
8	159.64	I1T3F2	2	0	93.6 ± 5.78	4.9 ± 2.48	0.000187205
27	180.46		3	0	80.61 ± 3.40	1.72 ± 2.78	0.00016123
17	176.60		1	0	63.61 ± 2.51	2.8 ± 1.67	3.18069E-06
24	167.27	I1T1F3	2	0	107.47 ± 5.93	0.5 ± 1.7	5.37381E-06
11	179.76		3	0	101.03 ± 4.01	1.62 ± 1.24	5.05157E-06
6	170.32		1	0	81.85 ± 1.68	-4.33 ± 1.01	1.63708E-05
28	189.75	I1T2F3	2		88.46 ± 4.58	0.48 ± 2.84	1.76937E-05
16	174.43		3	0	94.55 ± 3.42	-2.05 ± 2.66	1.89105E-05
10	164.62		1	0	77.39 ± 1.73	1.85 ± 1.41	0.000154784
19	167.95	I1T3F3	2	0	68.75 ± 2.39	1.94 ± 2.28	0.000137506
30	172.55		3	0	91.44 ± 2.16	-3.41 ± 2.0	0.0001829
18	174.19		1	0	54.08 ± 2.29	-15.64 ± 2.78	2.70427E-06
30	172.55	I1T1F4	2	0	59.36 ± 2.87	-16.04 ± 3.04	2.96814E-06
8	159.64		3				
5	167.17		1	0	49.97 ± 1.94	0.1 ± 2.43	2.20859E-05
13	170.32	I1T2F4	2	0	59.72 ± 2.8	-12.94 ± 1.84	3.89282E-05
21	170.54		3	0	53.68 ± 2.72	-14.21 ± 1.41	1.75372E-05
7	183.06		1	0	45.87 ± 1.58	-10.53 ± 1.83	9.17472E-05
23	153.57	I1T3F4	2	0	60.09 ± 2.73	-10.08 ± 2.62	0.000120187
27	180.46		3	0	46.75 ± 2.56	-8.98 ± 2.49	9.35083E-05
14	174.17		1	0	79.24 ± 1.72	3.88 ± 0.87	2.47637E-05
12	166.63	I2T1F1	2	0	135.08 ± 10.84	3.67 ± 1.05	4.2215E-05
24	167.27		3	0	43.29 ± 0.19	-5.65 ± 0.27	1.35307E-05
8	159.64		1	0	142.70 ± 7.16	2.62 ± 0.34	0.000178377
23	153.57	I2T2F1	2	0	51.74 ± 34.69	-0.6 ± 1.6	6.46846E-05
2	176.51		3	0	98.46 ± 1.75	5.6 ± 0.65	0.00012308
18	174.19		1	0	109.82 ± 2.40	4.79 ± 0.52	0.001372868
23	153.57	I2T3F1	2	0	86.26 ± 1.47	7.18 ± 1.08	0.001078365
26	176.92		3	0	124.88 ± 5.53	3.36 ± 1.17	0.00156108
5	170.54		1	0	81.19 ± 3.26	2.85 ± 0.92	2.53721E-05
18	174.19	I2T1F2	2	0	78.57 ± 1.83	4.06 ± 1.32	2.45538E-05
20	166.43		3	0	72.52 ± 1.7	6.42 ± 1.21	2.26645E-05
7	183.06		1	0	105.6 ± 1.61	2.58 ± 0.57	0.000132006
2	176.51	I2T2F2	2	0	73.99 ± 1.29	5.41 ± 0.72	9.24976E-05
			3				
10	164.62		1	0	111.11 ± 8.78	2.72 ± 0.93	0.001388878
21	167.53	I2T3F2	2	0	113.78 ± 4.13	2.98 ± 1.18	0.001422295
28	189.75		3	0	67.57 ± 1.58	6.42 ± 1.35	0.000844631

Rata No.	Peso	Condición	n	Nivel Daño	Imp: Amp (Ω)	Imp: Fase ($^\circ$)	Energía (J)
16	189.75		1	0	62.41 \pm 1.13	-0.54 \pm 0.91	1.95059E-05
21	167.53	I2T1F3	2	0	72.91 \pm 1.68	0.5 \pm 1.28	2.27873E-05
9	180.36		3		99.6 \pm 6.16	-1.62 \pm 0.82	3.11265E-05
5	170.54		1	0	89.06 \pm 1.18	0.22 \pm 1.10	0.000111337
28	189.75	I2T2F3	2	0	65.82 \pm 1.41	1.59 \pm 1.05	8.22795E-05
29	180.60		3	0	88.52 \pm 1.06	-0.71 \pm 0.42	0.000110659
10	164.62		1	0	85.59 \pm 8.05	-1.55 \pm 2.04	0.001069987
13	167.17	I2T3F3	2	0	81.65 \pm 1.28	0.64 \pm 1.01	0.001020678
1	187.70		3	0	83.62 \pm 4.67	-0.45 \pm 1.52	0.001045332
11	179.76		1	0	81.63 \pm 6.93	-11.97 \pm 0.57	2.55109E-05
25	172.65	I2T1F4	2	0	55.48 \pm 0.97	-11.66 \pm 0.77	1.73397E-05
20	166.43		3	0	105.30 \pm 1.36	-12.80 \pm 1.36	3.29077E-05
21	167.53		1	0	58.90 \pm 0.50	-10.48 \pm 0.36	7.36333E-05
22	165.48	I2T2F4	2	0	56.45 \pm 1.69	-14.52 \pm 1.18	7.05727E-05
2	176.51		3	0	59.62 \pm 0.72	-11.12 \pm 0.31	7.4534E-05
9	180.36		1	0	78.26 \pm 18.58	-9.6 \pm 8.08	0.00097827
15	167.85	I2T3F4	2	0	60.36 \pm 1.99	-9.81 \pm 1.04	0.000754562
28	189.75		3	0	87.43 \pm 1.84	-8.55 \pm 1.06	0.001092995
15	167.85		1	1	35.93 \pm 1.10	-143.41 \pm 2.66	0.000179697
20	166.43	I3T1F1	2	1	38.98 \pm 0.55	-146.52 \pm 3.68	0.000194945
6	170.32		3	2	35.71 \pm 0.70	-144.81 \pm 2.68	0.000178595
29	180.60		1	3	40.13 \pm 0.70	-153.81 \pm 2.8	0.000802776
16	174.43	I3T2F1	2	0	41.68 \pm 0.77	-162.93 \pm 1.95	0.000833792
3	162.38		3	2	40.94 \pm 0.54	-157.41 \pm 1.72	0.000818843
8	159.64		1	1	43.02 \pm 1.15	-150.31 \pm 2.9	0.00860418
19	167.95	I3T3F1	2	2	38.34 \pm 1.48	-145.4 \pm 2.83	0.007668795
22	165.48		3	0	46.17 \pm 0.99	-7.02 \pm 1.41	0.009235067
10	164.62		1	0	40.47 \pm 0.76	-163.83 \pm 2.68	0.000202389
19	167.95	I3T1F2	2	2	40.72 \pm 0.61	-154.39 \pm 3.69	0.000203645
23	153.57		3	0	11.17 \pm 4.41	-39.03 \pm 78.23	5.58791E-05
13	167.17		1	2	34.91 \pm 0.41	-158.84 \pm 1.98	0.000698387
28	189.75	I3T2F2	2	2	39.38 0.60	-160.0 \pm 3.32	0.00078762
1	187.70		3	0	38.90 \pm 0.42	-155.73 \pm 1.68	0.000778022
25	172.65		1	2	36.31 \pm 2.04	-168.15 \pm 3.28	0.007262191
12	166.63	I3T3F2	2	1	41.83 \pm 1.31	-163.83 \pm 3.18	0.00836746
5	170.54		3	2	39.79 \pm 0.71	-159.72 \pm 2.5	0.00795986
26	176.92		1	2	46.53 \pm 0.93	-171.05 \pm 3.8	0.000232664
8	159.64	I3T1F3	2	0	42.53 \pm 1.17	-10.03 \pm 6.88	0.000212673
22	165.48		3	2	43.41 \pm 1.048	-176.2 \pm 2.89	0.000217079
4	177.63		1	2	42.59 \pm 1.09	-169.42 \pm 2.84	0.000851864
17	176.60	I3T2F3	2	0	45.14 \pm 1.22	-173.02 \pm 3.43	0.000902955
30	172.16		3	2	43.83 \pm 1.21	-166.71 \pm 3.02	0.000876766
14	174.17		1	2	40.35 \pm 0.75	-169 \pm 2.82	0.008071052
3	162.38	I3T3F3	2	2	42.14 \pm 0.56	-176.97 \pm 1.92	0.008429787
23	153.57		3	2	40.53 \pm 0.62	-170.07 \pm 3.23	0.008107815
12	166.63		1	2	38.18 \pm 1.24	-154.15 \pm 2.75	0.000190925
21	167.53	I3T1F4	2	2	34.42 \pm 0.75	-151.95 \pm 2.31	0.000172116
4	177.63		3	1	37.89 \pm 1.84	-154.3 \pm 3.6	0.000189471
19	167.95		1	2	36.21 \pm 0.91	-157.31 \pm 2.16	0.000724254
29	180.60	I3T2F4	2	2	36.53 \pm 1.03	-152.9 \pm 2.38	0.000730761
3	162.38		3	2	35.60 \pm 0.48	-145.9 \pm 0.89	0.000712075
4	177.63		1	3	43.44 \pm 0.51	-168.67 \pm 2.3	0.008689502
16	174.43	I3T3F4	2	2	40.49 \pm 0.87	-146.32 \pm 18	0.008099239
29	180.60		3	2	35.44 \pm 0.78	-156.36 \pm 1.3	0.007088782

Rata No.	Peso	Condición	n	Nivel Daño	Imp: Amp (Ω)	Imp: Fase ($^\circ$)	Energía (J)
9	180.36		1	1	9.09 \pm 1.12	-4.11 \pm 7.45	0.000284374
10	164.62	I4T1F1	2	2	10.65 \pm 4.39	-170.42 \pm 2.53	0.000332979
16	174.43		3	2	5.66 \pm 2.20	-168.34 \pm 1.31	0.000176991
7	183.06		1	0	9.41 \pm 3.97	-170.82 \pm 4.92	0.001176888
29	180.60	I4T2F1	2	0	2.63 \pm 0.41	-129.87 \pm 9	0.000329021
12	166.63		3	1	22.47 \pm 1.10	-177.75 \pm 0.63	0.00280924
21	167.53		1	2	8.91 \pm 2.28	-171.72 \pm 0.61	0.011139734
26	176.92	I4T3F1	2	0	34.4 \pm 4.7	-167.47 \pm 1.56	0.043005583
4	177.63		3	2	7.23 \pm 0.69	-164.96 \pm 2.55	0.009039866
18	174.19		1	2	9.8 \pm 0.43	-166.97 \pm 0.91	0.000306943
24	167.27	I4T1F2	2	3	9.14 \pm 0.53	-163.04 \pm 2.4	0.000285891
3	162.38		3	2	11.64 \pm 0.79	-158.65 \pm 2.5	0.000363916
18	174.19		1	2	6.70 \pm 0.60	-135.82 \pm 5.79	0.000837688
23	153.57	I4T2F2	2	1	6.30 \pm 1.92	-132.52 \pm 18.53	0.000788113
4	177.63		3	2	13.65 \pm 0.97	-166.43 \pm 0.9	0.001706983
3	162.38		1	1	9.23 \pm 0.96	-172.15 \pm 3.56	0.011540449
29	180.60	I4T3F2	2	2	6.80 \pm 0.10	-104.97 \pm 2.12	0.008505761
19	167.95		3	2	7.17 \pm 0.41	-144.05 \pm 1.6	0.008963356
27	180.46		1	0	24.84 \pm 0.27	-179.44 \pm 0.44	0.000776313
19	167.95	I4T1F3	2	2	23.52 \pm 0.42	-176.32 \pm 0.7	0.000735261
5	170.54		3	2	20.88 \pm 0.76	-170.16 \pm 0.42	0.000652679
11	179.76		1	0	12.80 \pm 0.75	-174.84 \pm 1.55	0.001600997
15	167.85	I4T2F3	2	2	25.84 \pm 0.28	-179.31 \pm 0.44	0.003230443
30	172.17		3	2	17.25 \pm 0.62	-166.5 \pm 0.79	0.002156739
11	179.76		1	2	25.02 \pm 0.17	-179.14 \pm 0.47	0.031278776
17	176.60	I4T3F3	2				
29	180.60		3	2	28.09 \pm .41	-161.53 \pm 0.86	0.020466742
14	174.17		1	2	27.45 \pm 0.32	-161.12 \pm 0.68	0.000857976
26	176.92	I4T1F4	2	2	18.57 \pm 0.65	-138.17 \pm 1.82	0.000580533
12	166.63		3	2	27.45 \pm 0.47	-161.14 \pm 0.44	0.000857936
7	183.06		1	2	29.16 \pm 0.31	-167.39 \pm 0.95	0.003645124
16	174.43	I4T2F4	2	2	28.97 \pm 0.49	-165.65 \pm 0.79	0.003622326
27	180.46		3	2	27.53 \pm 0.48	-158.11 \pm 0.74	0.003442009
9	180.36		1	2	27.86 \pm 0.60	-161.61 \pm 0.83	0.034826306
24	167.27	I4T3F4	2	2	27.19 \pm 0.26	-158.65 \pm 1.01	0.033995167
30	172.81		3	2	28.52 \pm 0.15	-157.58 \pm 0.62	0.035655754
24	167.27		1	2	6.37 \pm 1.05	13.05 \pm 3.74	0.003188331
4	177.63	I5T1F1	2	2	4.19 \pm 0.10	0.24 \pm 3.68	0.002095062
17	176.60		3	2	5.28 \pm 0.57	6.65 \pm 3.71	0.002641697
12	166.63		1	2	3.75 \pm 0.24	-17.81 \pm 1.88	0.007506018
18	174.19	I5T2F1	2	2	3.81 \pm 0.19	-0.87 \pm 3.37	0.00762742
17	176.60		3	2	5.43 \pm 0.17	-15.36 \pm 3.81	0.01087633
10	164.62		1	3	5.05 \pm 0.06	-17.83 \pm 1.69	0.10102913
2	176.51	I5T3F1	2	2	4.30 \pm 0.29	-8.81 \pm 2.02	0.086146869
29	180.60		3	2	4.51 \pm 0.08	1.05 \pm 3.52	0.090347113
13	167.17		1	3	5.44 \pm 0.54	-43.2 \pm 5.44	0.002720304
27	180.46	I5T1F2	2	2	4.62 \pm 0.88	-43.94 \pm 14.79	0.002310134
22	165.48		3	2	6.08 \pm 0.41	-49.25 \pm 2.41	0.003043869
14	174.17		1	4	4.72 \pm 0.70	-32.17 \pm 8.79	0.009455433
6	170.32	I5T2F2	2	2	6.18 \pm 0.97	-24 \pm 0.75	0.012368145
25	172.65		3	3	6.48 \pm 0.11	-41.5 \pm 2.71	0.012974708
11	179.76		1	3	3.62 \pm 1.13	-40.14 \pm 23.31	0.07247404
22	165.48	I5T3F2	2	2	2.62 \pm 0.44	-5.16 \pm 87.02	0.052583645
24	167.27		3	3	2.99 \pm 0.65	-58.52 \pm 20.96	0.059867435

Rata No.	Peso	Condición	n	Nivel Daño	Imp: Amp (Ω)	Imp: Fase ($^\circ$)	Energía (J)
17	176.60		1	2	4.07 ± 0.84	-89.43 ± 4.02	0.002038113
20	166.43	I5T1F3	2	2	1.94 ± 0.14	-111.8 ± 25.03	0.000974446
14	174.17		3	3	3.04 ± 0.15	-95.05 ± 2.12	0.001523548
20	166.43		1	2	3.81 ± 0.17	-99.37 ± 2.7	0.00762428
28	189.75	I5T2F3	2	2	2.07 ± 0.12	-60.75 ± 6.57	0.004157684
3	162.38		3	2	2.78 ± 0.06	-118.6 ± 2.38	0.005562184
13	167.17		1	3	3.45 ± 0.21	-99.95 ± 4.99	0.069035408
24	167.27	I5T3F3	2	2	3.07 ± 0.16	-111.3 ± 3.42	0.538713131
30	172.31		3	2	2.70 ± 0.11	-122.6 ± 1.85	0.054006629
15	167.85		1	0	10.40 ± 0.34	-132.2 ± 1.34	0.005204277
26	176.92	I5T1F4	2	2	6.86 ± 0.31	-147.9 ± 1.98	0.003430228
4	177.63		3	3	6.58 ± 0.15	-150.5 ± 0.7	0.003294261
11	179.76		1	3	7.82 ± 1.04	-144.0 ± 92.8	0.015644863
17	176.60	I5T2F4	2	1	7.45 ± 0.16	-170.4 ± 1.49	0.014900401
28	189.75		3	2	8.76 ± 0.01	-173.4 ± 2.31	0.017536019
6	170.32		1	4	8.26 ± 0.69	-161.9 ± 4.53	0.165354964
21	167.53	I5T3F4	2	2	7.06 ± 0.27	-173.5 ± 3.91	0.141290772
28	189.75		3	2	8.72 ± 0.04	-157.1 ± 1.87	0.174508982

Tabla A-1. Datos experimentales. Para cada muestra se indica el nivel de daño medido, los valores de impedancia medidos con su respectiva desviación estándar correspondiente a las 15 repeticiones en cada muestra y el nivel de energía inyectado a cada muestra

Donde:

Corrientes (mA)	
I1	1
I2	2.5
I3	10
I4	25
I5	100

Tiempos (S)	
T1	0.05
T2	0.2
T3	2

Frecuencias (Hz)	
F1	215
F2	2.15K
F3	21.5 K
F4	215 K

**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO
TISULAR POR ESTIMULACIÓN
ELÉCTRICA DE UN SISTEMA DE
ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA**

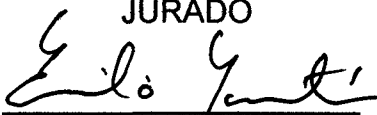
Comunicación de Resultados para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS (Ingeniería Biomédica) de

JAVIER PINZÓN TODD

Diciembre 2007

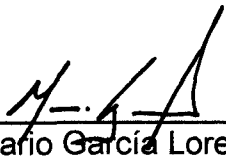
ASESOR Dr. EMILIO SACRISTÁN ROCK

JURADO



Dr. Emilio Sacristán Rock

Profesor Titular – Posgrado en Ingeniería Biomédica
Departamento de Ingeniería Eléctrica



Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Titular – Posgrado en Ciencias Biológicas
Departamento de Biología de la Reproducción



Dr. César A. González Díaz

Universidad del Ejército y Fuerza Aérea
Escuela Militar de Graduados de Sanidad