

SISTEMA PARA AVALIAÇÃO AUTOMÁTICA DA ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS

Diógenes S. Moura*, Diego C. N. Silva*, Adriana Fontes**, Ajoke J. Williams*, Marcos A. C. Bezerra**, Renato E. de Araujo*

*Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

**Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil
e-mail: diogenes.fisica@yahoo.com.br

Resumo: Pinça óptica é uma ferramenta que permite prender e manipular células individualmente. Com a associação das pinças ópticas a técnicas de processamento de imagem é possível determinar automaticamente propriedades elásticas de células. A determinação de características biomecânicas de eritrócitos é importante na avaliação de células armazenadas em centros de transfusão e no diagnóstico de doenças. Este trabalho apresenta a integração de processos de avaliação automática de imagens a uma pinça óptica. O sistema apresentado permite quantificar automaticamente a elasticidade de hemácias, durante o processo de captura da célula. A viabilidade do uso do sistema é demonstrada com a avaliação de elasticidade de hemácias de doadores normais e pacientes portadores de anemia falciforme.

Palavras-chave: pinças ópticas, processamento de imagem, elasticidade, hemácias.

Abstract: *Optical tweezers is a tool used to trap and manipulate individual cells. The association of optical tweezers and image processing techniques allows automatic real-time measurements of elastic properties of cells. The determination of biomechanical properties of erythrocytes is important to the evaluation of cells stored in transfusion centers and diseases diagnostics. In this work, we combine automatic image processing techniques within an optical tweezers setup. The present system allows real-time quantification of erythrocytes elasticity, during the cell trapping. The system was evaluated by measuring the erythrocytes elasticity from normal donors and patients with sickle cell anemia.*

Keywords: *optical tweezers, image processing, elasticity, erythrocytes.*

Introdução

A deformabilidade das hemácias desempenha um papel fundamental no transporte de oxigênio através da microcirculação sanguínea. As hemácias devem suportar grandes deformações durante passagens repetidas através de microvasos e paredes fenestradas dos sinusóides do baço [1].

Diversas técnicas têm sido utilizadas para avaliação da deformabilidade de hemácias dentre elas estão:

aspiração por micropipeta [2], filtração [3], citometria de torção magnética [4] e pinças ópticas [5].

A pinça óptica é uma ferramenta que através do aprisionamento óptico, baseado na transferência de momento do fóton, pode ser utilizada como instrumento de medida e manipulação [6].

Em particular, no estudo da biologia eritrocitária, a pinça óptica permite a medida de propriedades mecânicas e elétricas (tais como: adesão, viscosidade da membrana, elasticidade celular e potencial Zeta) de hemácias normais e alteradas por algum fator externo como, por exemplo, doenças hematológicas ou armazenamento em bancos de sangue [5, 7]. Dentre as propriedades mensuráveis pela técnica de pinça óptica, destaca-se a elasticidade. A deformação de hemácias é necessária para a transposição de capilares e sinusóides esplênicos pela célula [8], garantindo o transporte de gases pelo corpo. Alguns trabalhos demonstraram a alteração desta propriedade reológica em decorrência de fatores extrínsecos à célula, como fármacos, ou intrínsecos, como as hemoglobinopatias [9]. Na literatura, uma crescente atenção vem sendo dada as hemoglobinopatias, devido a sua alta incidência na população e a procura de novos processos de diagnósticos. Além disso, a cada dia são propostos novos fármacos e muitas vezes não se avalia o seu efeito nas células.

O uso de pinças ópticas na determinação da elasticidade de hemácias é acompanhado de uma metodologia, para processamento dos dados/imagens, laboriosa, sujeita a erros oriundos do usuário da técnica e que não é realizada em tempo real. Neste contexto, processos automáticos de análise de imagens podem apresentar-se como ferramentas poderosas quando associadas a pinças ópticas. Em particular, processamento de imagens vem sendo aplicado nas diversas áreas das ciências da vida, permitindo uma análise rápida e reprodutível de dados, como por exemplo, na identificação e classificação de células [10] e na contagem de ovos de mosquitos transmissores de doenças [11].

Este trabalho apresenta a integração de processo de avaliação automática de imagens a um sistema de pinça óptica. O sistema apresentado permite quantificar elasticidade de hemácias automaticamente, durante o processo de captura da célula. Até o presente momento

existem poucos estudos na literatura integrando técnicas de processamento de imagens a sistema de pinça óptica.

Materiais e métodos

Os métodos para preparo das amostras, aprisionamento das hemácias utilizando pinça óptica e medidas de sua elasticidade serão descritos a seguir.

Preparo das amostras – As amostras avaliadas foram coletadas na Fundação Hemope, em dois tubos de 5 mL vacutainer, um contendo anticoagulante EDTA e o outro sem solução anticoagulante. Todas as amostras coletadas e testes realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Hemope (nº. 001/2011). As hemácias, obtidas a partir do tubo de sangue com EDTA, foram diluídas no soro do próprio paciente na proporção (0,5 µL/ 500 µL). Os testes foram realizados em até duas horas após a coleta do material e seguiram todos os padrões de coleta e controle de qualidade comumente aplicados.

Sistema de pinça óptica – Uma pinça óptica (Figura 1) foi montada para aprisionamento das células. A pinça óptica utiliza um laser Nd:YAG (1064 nm –IPG Photonics, EUA). O diâmetro e a divergência do feixe de luz são controlados um telescópio. A pinça óptica foi construída em um microscópio (Zeiss-Axiolab) equipado com uma câmera CCD e um estágio x-y-z motorizado (Prior Scientific – Prior II), controlado por um joystick ou pelo computador através da plataforma Labview. O sistema utiliza uma lente objetiva de imersão em óleo (100 x, NA=1.25, Zeiss).

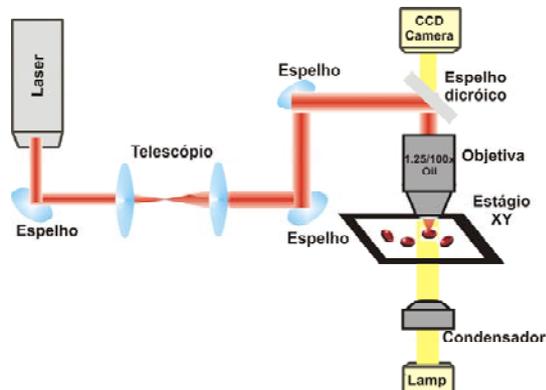


Figura 1: Configuração do sistema de pinça óptica.

Sistema de medição automática – O sistema de medição da elasticidade permite a avaliação das hemácias em tempo real, durante o aprisionamento das células. O sistema também possibilita posterior análise das hemácias pelo processamento dos vídeos obtidos pela pinça óptica. O sistema de medição automática consiste de três etapas: aquisição, segmentação das imagens e medida da elasticidade das células. A Figura 2 mostra um diagrama que representa estas etapas.

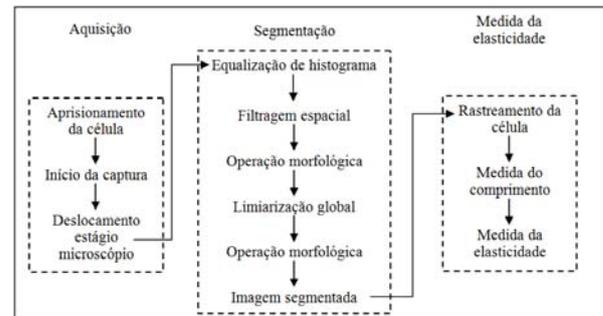


Figura 2: Diagrama das etapas do processo de medida automática da elasticidade.

Aquisição – Após o aprisionamento das hemácias pela pinça óptica a captura do vídeo é iniciada. Para aquisição dos vídeos foi utilizada uma câmera CCD que está conectada a uma placa de captura (Pinnacle). Todo processo de captura é feito utilizando a plataforma Labview. O estágio do microscópio, também controlado por Labview, move-se com 6 velocidades diferentes determinadas previamente. O início da captura foi sincronizado com o início que o estágio começava a mover-se. Vídeo, em formato AVI 24 bits, com imagens de 352 x 240 de tamanho, foram gerados.

Segmentação – Segmentação consiste em um processo de identificação de partes de uma imagem. Para segmentar foi realizada uma equalização de histograma com o objetivo de aumentar o contraste. Um filtro de média 5x5, para remover ruídos e suavizar a imagem, foi acompanhado de uma convolução. A operação morfológica de dilatação foi utilizada para remover objetos menores da imagem. Em seguida, a imagem foi binarizada utilizando um limiar global. Uma segunda operação morfológica foi realizada para eliminar objetos menores.

Medida de elasticidade – Com a imagem segmentada a célula foi rastreada utilizando-se um filtro de detecção de bordas. A distância entre duas extremidades das bordas da célula forneceu o comprimento em pixels, ao longo do tempo, que depois foram convertidos para micrômetros. Para cada velocidade foram usadas as médias dos 10 maiores comprimentos.

A elasticidade da célula está relacionada com seu comprimento de acordo com a seguinte expressão [12]:

$$L = L_0 + \left(\frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right) V \quad (1)$$

Com L sendo o comprimento da célula após deformação. L_0 é o comprimento inicial da hemácia, η a viscosidade do meio, μ é a constante elástica da célula e Z_{eq} é uma grandeza relacionada com a geometria do sistema e V é a velocidade de arrasto da célula. Segundo a equação (1), a avaliação do comprimento da hemácia para diferentes velocidades de arraste (140 µm/s, 175 µm/s, 210 µm/s, 245 µm/s, 280 µm/s e 315 µm/s) permite determinar a elasticidade da célula [12].

Resultados e discussão

A Figura 3 mostra o painel de controle do sistema de medição automática da elasticidade das hemácias.

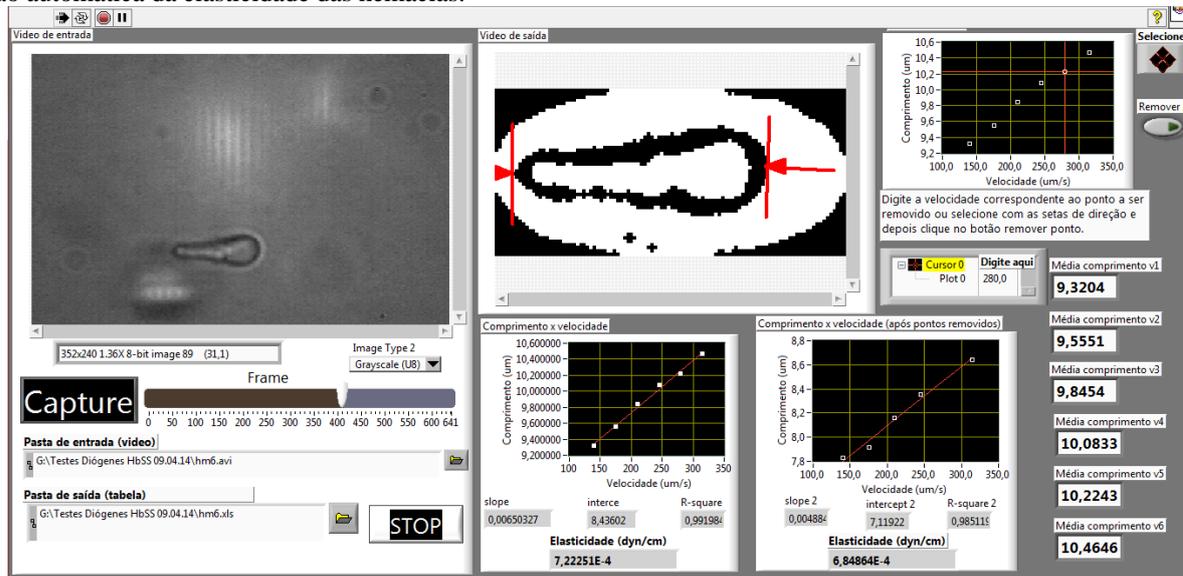


Figura 3: Painel de controle do sistema de medição automática de elasticidade de hemácias.

A partir do programa foi possível gravar todas as imagens (vídeos) e informações obtidas da análise automática.

Na Figura 3, pode-se identificar a imagem capturada pelo sistema, com a indicação do instante de captura, do

arquivo de armazenamento. Também é apresentada ao usuário, a imagem da célula após o processo de segmentação. A Figura 4 mostra as imagens resultantes de cada etapa do processo de segmentação.

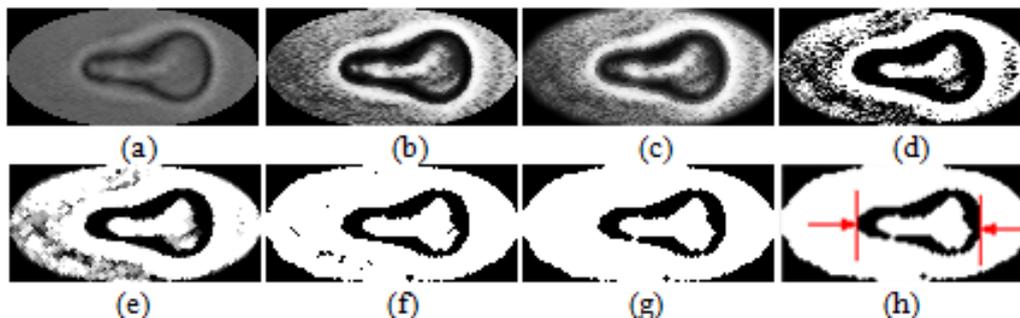


Figura 4: Etapas do processo de segmentação. (a) imagem original, (b) equalização de histograma, (c) filtragem espacial, (d) convolução, (e) dilatação, (f) limiarização, (g) erosão, (h) célula segmentada e rastreada.

O painel de controle também apresenta graficamente os valores determinados para o comprimento da célula para as diferentes velocidades de arraste, V . O valor para o comprimento é estabelecido pela média dos dez maiores comprimentos de cada velocidade. As médias dos comprimentos, em micrômetros, estão mostradas no canto inferior direito da Figura 3.

Em alguns casos o aparecimento de regiões escuras na imagem e fora da célula que não pertencem a borda, faz com que o comprimento seja maior que o comprimento da célula esticada. Esses pontos são removidos automaticamente ou pelo usuário do sistema (gráfico inferior da direita-Figura 3).

A partir do gráfico do comprimento em função da velocidade, utilizando a equação (1), o sistema determina a elasticidade da célula.

Os resultados obtidos pelo sistema foram avaliados comparando-os com os valores de elasticidade medidos por dois especialistas na análise. Verificou-se também uma significativa redução do tempo para a determinação da elasticidade de hemácias. O sistema identifica em tempo real o comprimento da célula e indica o valor da elasticidade imediatamente após a captura dos vídeos. A determinação da elasticidade por um profissional treinado dura 1 hora e baseia-se na avaliação de apenas 6 imagens. No sistema automático, os valores para elasticidade são obtidos pela análise de uma quantidade

muito maior (10x) de imagens, o que pode garantir maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Também na avaliação do sistema, foram determinadas as elasticidades de hemácias de doadores saudáveis (controle) e de pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS). A Tabela 1 mostra a média das elasticidades obtidas pelo sistema e pelo método convencional para dez células de cada paciente. Para pacientes controle a média da elasticidade foi de $4,9 \times 10^{-4}$ dina/cm e para pacientes portadores de anemia falciforme a média foi de $7,4 \times 10^{-4}$ dina/cm, tais resultados estão de acordo com resultados obtidos anteriormente [9].

Tabela 1: Médias da elasticidade para doadores controle e portadores de anemia falciforme obtidas pelo sistema e pelo método convencional [9].

	Elasticidade dina/cm $\times 10^{-4}$	
	Média (programa)	Média (convencional)
Controle	$4,9 \pm 0,4 \times 10^{-4}$	$4,5 \pm 0,4 \times 10^{-4}$
HbSS	$7,4 \pm 1,1 \times 10^{-4}$	$6,5 \pm 0,6 \times 10^{-4}$

A partir dos resultados da tabela 1 é possível notar que os resultados obtidos pelo sistema estão de acordo com os resultados obtidos pelo método convencional.

Conclusão

Este trabalho apresenta um sistema óptico capaz de avaliar automaticamente a elasticidade de hemácias. Explorando técnicas de processamento de imagens, o sistema óptico avalia em tempo real as características morfológicas da célula aprisionada. A associação com técnicas de processamento automático de imagens faz da pinça óptica uma ferramenta ainda mais poderosa para avaliar a elasticidade de hemácias. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o sistema desenvolvido é capaz de medir a elasticidade de hemácias e detectar diferenças entre as células de doadores normais e portadores de anemia falciforme.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e à FACEPE pelo financiamento. Os autores são membros do INCT-Fotônica.

Referências

[1] Waugh R, Evans EA. Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophysical Journal*. 1979; 26(1): 115-131.
 [2] Evans EA, La Celle PL. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Blood*. 1975; 45(1): 29-43.
 [3] Jandl JH, Simmons RL, et al. Red cell filtration and the pathogenesis of certain hemolytic anemias. *Blood*. 1961;18(2): 133-148.

[4] Puig-de-Morales-Marinkovic M, Turner KT, et al. Viscoelasticity of the human red blood cell. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293(2): 597-605.
 [5] Brandão MM, Barja-Castro ML, Fontes A, César CL, Costa FF, Saad STO. Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clin. Hemorheol. and Microcirc.* 2009; 43: 217-221.
 [6] Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optic. Lett.* 1968; 11: 288-290.
 [7] Silva DCN, Jovino C N, Silva, CAL, Fernandes H P, Filho MM, Lucena SC, Costa AMDN, Cesar CL, Castro MLB, Santos BS, Fontes A. Optical Tweezers as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells. *Plos One*. 2012; 7:1-6.
 [8] Hoffbrand AV, Moss PAH. *Fundamentos de Hematologia*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
 [9] Brandão MM, Fontes A, Barjas-Castro ML, Barbosa, LC, Costa FF, Cesar CL, Saad STO. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European Journal of Haematology* 2003; 70:207-211.
 [10] Grover SC, Skirtach AG, Gauthier RC, Grover CP. Automated single-cell sorting system based on optical trapping. *Journal of Biomedical Optics*. 2001; 6(1):14-22.
 [11] Silva MGMM, Rodrigues, MAB, Araujo RE. Sistema de aquisição e processamento de imagens de ovitrampas para o combate a dengue. *Rev. Bras. Eng. Bioméd.* 2012; 28(4):364-374.
 [12] Fontes A, Barjas Castro ML, Brandão MM, Fernandes HP, Thomaz AA, Huruta RR, Pozzo LY, Barbosa LC, Costa FF, Saad STO, Cesar C L. Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. *Journal of Optics*. 2011; 13: 1-8.