

ANÁLISIS DE LA DEFORMABILIDAD DE CÉLULAS ADHERIDAS POR MEDIO DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

ANALYSIS OF THE DEFORMABILITY OF ADHERED CELLS BY MEANS OF DIGITAL IMAGE PROCESSING

V.Danieli^{♥*}, B. D. Riquelme^{♥*} and M. D'Arrigo^{*}

♥Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional De Rosario
Suipacha 531- (2000) - Rosario - Argentina

♣Grupo de Optica Aplicada a la Biología - Instituto de Física de Rosario (CONICET - UNR)
Bv. 27 de Febrero 210 Bis - (2000)- Rosario - Argentina
email: bibiana_riquelme@yahoo.com.ar

El objetivo de este trabajo fue obtener parámetros de deformabilidad celular, utilizando la técnica de la cámara de flujo y el procesamiento digital de imágenes. Para ello, se estudió la deformación de glóbulos rojos humanos en diferentes estados de adhesión y bajo el efecto de una tensión de corte aplicada mediante un flujo controlado. Como modelo experimental se utilizaron aglutinados de dos células (dobletes) de grupo sanguíneo A, inducidos por anticuerpos monoclonales específicos anti-A. Estudiando la relación entre la tensión y la deformabilidad, se caracterizó el comportamiento viscoelástico de la membrana del glóbulo rojo en diferentes situaciones de adhesión. Esto es de importancia para comprender el comportamiento de la sangre en circulación y brinda nuevos parámetros que podrían dar información relevante sobre algunas patologías hematológicas relacionadas con alteraciones en las propiedades de adhesión celular.

Palabras Claves: adhesión eritrocitaria, aglutinación eritrocitaria, deformabilidad eritrocitaria, procesamiento de imágenes

The aim of this work was to obtain cellular deformability parameters, using the flow chamber technique and the digital image processing. In order to do this, we study the deformation of erythrocytes, in different adhesion states, under the effect of a given shear stress by means of a controlled flow. As experimental model, agglutinates of two erythrocytes group A (doublet) linked by specific monoclonal antibody anti-A were used. Studying the relationship between stress and deformability, it was possible to characterize the viscoelastic behavior of the erythrocyte membrane in different adhesion situations. This could be useful important to understand blood behavior in circulation and can provide new parameters and relevant information about some hematological pathologies related with alterations in cellular adhesion properties.

Keywords: erythrocyte adhesion, erythrocyte agglutination, erythrocyte deformation, image processing

I. INTRODUCCIÓN

La deformabilidad es una propiedad que le permite al glóbulo rojo (GR) cambiar de forma cuando está bajo la influencia de tensiones externas. Dicha propiedad es crucial para que la célula pueda atravesar microcapilares y adoptar formas hidrodinámicas en circulación. El modelo más simple que describe a la membrana del GR sugiere una combinación de una componente elástica (citoesqueleto, red de proteínas retráctiles) y una componente fluido-viscosa (la bicapa lipídica), con fuertes interacciones entre ellas. Todo esto le confiere al GR sus características esencialmente viscoelásticas⁽¹⁾.

Con pequeños valores de tensiones externas aplicadas en cortos intervalos de tiempo, el comportamiento reológico viscoelástico permite deformaciones reversibles en el GR, con disipación viscosa interna. Además, el proceso de deformación ocurre sin variación de área superficial ni de volumen celular. Estas dos condiciones establecen límites estrictos en los tipos de deformaciones que pueden sufrir estas células⁽²⁾. Finalmente, durante la deformación

reversible, en el eritrocito sólo ocurren cambios en su forma geométrica⁽³⁾.

Durante el flujo sanguíneo, el eritrocito adopta una forma hidrodinámica en la dirección del flujo, y su forma cambia de discoidal a elipsoidal cuando los valores de tensiones aplicadas aumentan. Esta forma hidrodinámica elipsoidal posee menor resistencia a la microcirculación⁽⁴⁾.

Las interacciones entre las células sanguíneas y entre éstas y las células del endotelio vascular ocurren tanto en condiciones normales como patológicas. Por ejemplo, la adhesión entre eritrocitos es crucial para que los mismos atraviesen los microcapilares. Existen interacciones anormales entre los eritrocitos y las células del endotelio encontradas en anemias, diabetes mellitus, vasculopatías hipertensión y malaria. El estudio de la deformabilidad eritrocitaria en diferentes condiciones de adhesión es de gran importancia, ya que ayudaría a comprender el comportamiento de la sangre en circulación y podría brindar más información con respecto a algunas patologías hematológicas⁽⁴⁾.

Existen varias técnicas que permiten medir parámetros de deformabilidad eritrocitaria. Los resultados son muy difíciles de comparar, debido a que cada técnica posee una diferente manipulación de las células, las tensiones son aplicadas de diferente manera y poseen magnitudes variables ⁽⁵⁾.

Hochmuth y col. ⁽⁶⁾ midieron deformaciones bajo un flujo controlado. Aplicaron tensiones de corte a GR inmovilizados dentro de un microcanal rectangular y midieron las elongaciones debido al flujo por microfotografía.

En un trabajo anterior ⁽⁷⁾, se utilizó esta técnica con los objetivos de obtener valores cuantitativos de la energía de disociación antígeno-anticuerpo y de dar los primeros pasos en el estudio de la deformabilidad celular. El presente trabajo es una continuación de este último, profundizando el estudio de la deformabilidad eritrocitaria con el fin de obtener parámetros que describan el comportamiento viscoelástico de la membrana eritrocitaria.

Como modelo experimental se utilizaron aglutinados de dos glóbulos rojos humanos de grupo sanguíneo A (doblete) unidos por un anticuerpo monoclonal específico anti-A. A los mismos se les aplicó una tensión de corte bajo un régimen de flujo laminar dentro de una cámara de flujo. Se registraron las imágenes microscópicas obtenidas durante las experiencias y luego se realizó el procesamiento digital de las mismas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto el material biológico como el equipamiento utilizado en estas experiencias están ampliamente descritos en el trabajo anterior ⁽⁶⁾, dándose a continuación una breve descripción del método.

Preparación de las suspensiones eritrocitarias

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2500g durante cinco minutos, luego de lo cual se descartó el plasma y la capa leuco-plaquetaria. Luego, los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato salino isotónico (PBS) (pH 7.4, 295 mOsm/kg) y finalmente resuspendidos en PBS con 0,25 % de albúmina sérica humana (HSA) a una concentración final de aproximadamente $5 \cdot 10^6$ células/ml, la cual

asegura una sedimentación en monocapa de las células sobre la base de la cámara de adhesión ⁽⁸⁾. Dicha suspensión fue incubada durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-A (título: 1/64). Este anticuerpo fue previamente diluido 1/4000 para obtener aglutinados eritrocitarios que en su mayoría estuvieran compuestos por dos células (dobletes).

Procedimiento experimental

Inicialmente, la suspensión eritrocitaria fue inyectada dentro de la cámara, la cual es posteriormente ubicada sobre la platina de un microscopio óptico invertido. Las células sedimentaron y se adhirieron a la base de vidrio, quedando así inmovilizadas. Se seleccionó un doblete del campo visual y se registró su primera imagen en condiciones estáticas. Luego este doblete fue sometido a valores crecientes de tensiones de corte de un flujo laminar controlado, el cual se obtuvo mediante la perfusión de PBS-HSA dentro de la cámara utilizando una bomba de infusión. El procedimiento se repitió para tres dobletes de cada muestra.

La tensión de corte (σ) fue definida como ⁽⁹⁾:

$$\sigma = \frac{6\eta_0 \cdot Q}{h^2 \cdot a} \quad (1)$$

donde h y a son la altura y el ancho del microcanal respectivamente, Q es el caudal y η_0 es la viscosidad del medio de suspensión.

Esta s es aplicada paralelamente a la superficie de contacto entre ambas células del doblete, observándose que la célula superior del mismo se desprendía progresivamente y que ambas células se deformaban, adquiriendo una forma hidrodinámica elipsoidal (ver Figura 1).

Se registraron imágenes microscópicas de cada doblete en estudio a valores crecientes de s . Luego estas imágenes fueron digitalmente procesadas, midiéndose las dimensiones geométricas que adoptaron las células durante los procesos de deformación y de disociación de la unión antígeno-anticuerpo ⁽¹⁰⁾.

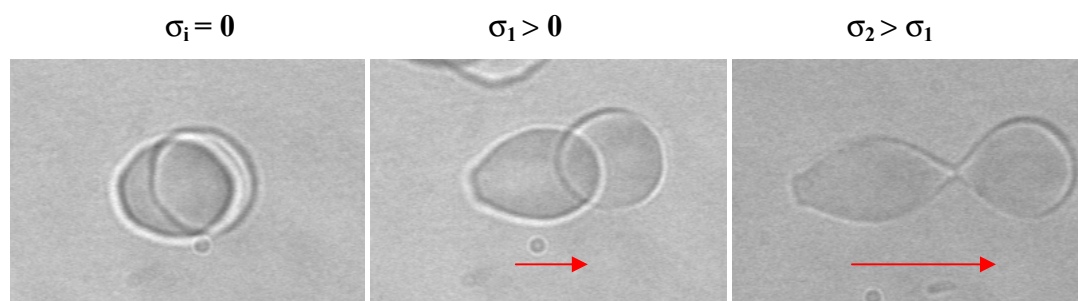


Figura 1. Imágenes microscópicas secuenciales de un doblete, registradas a valores crecientes de las tensiones de corte aplicada.

Análisis de parámetros de deformabilidad eritrocitaria

Para simplificar se asumió que una célula deformada siempre toma la forma de elipsoide de revolución y, vista desde arriba en el microscopio, de elipse.

Teniendo en cuenta que el proceso de deformación ocurre bajo restricciones de volumen celular y área superficial constantes, la forma celular puede ser descrita por un parámetro que refleje la relación entre los ejes mayor y menor de la elipse. El índice de deformabilidad eritrocitaria (*IDE*) se definió como:

$$IDE = \frac{L - l}{L + l} \quad (2)$$

donde L y l son las longitudes de los ejes mayor y menor respectivamente. Es de esperar que a mayor σ aplicada, mayor sea la diferencia entre los valores de L y l y, en consecuencia, mayor su *IDE*. Además, para la célula en reposo, sin deformar, los valores de L y l son similares y la imagen de la célula tiende a ser circular, por lo que su *IDE* se aproxima a 0.

Se delimitaron las imágenes obtenidas de ambas células con el programa *IPlab*, con el cual se aproximaron las mismas a una elipse y se midieron L y l (ver Figura 2). Este procedimiento se realizó tres veces por imagen. Luego se calcularon los correspondientes valores de *IDE* y se realizó un promedio de los mismos, expresándose como la media \pm la desviación Standard. Finalmente se obtuvieron para ambas células del doblete (superior e inferior) valores de *IDE* para cada valor de σ aplicada, se confeccionaron tablas y se graficó *IDE* vs. σ para cada célula analizada.

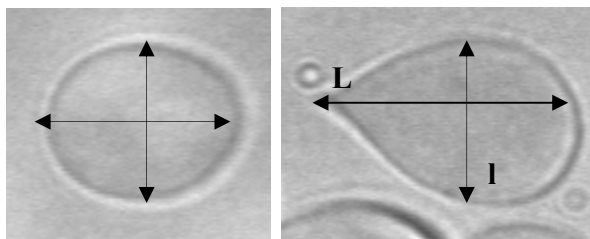


Figura 2. Imágenes microscópicas registradas de un glóbulo rojo: a) en reposo ($\sigma_i = 0$); b) bajo la influencia de σ_n .

IV. RESULTADOS

Eritrocito inferior de un doblete

La Figura 3 muestra el resultado de experimental de *IDE* vs. σ de dos dobletes de una misma muestra sanguínea tomada como ejemplo, mientras que la Figura 4 muestra el promedio de estos datos junto con un ajuste lineal. En la TABLA 1 se presenta el análisis final de cuatro muestras sanguíneas.

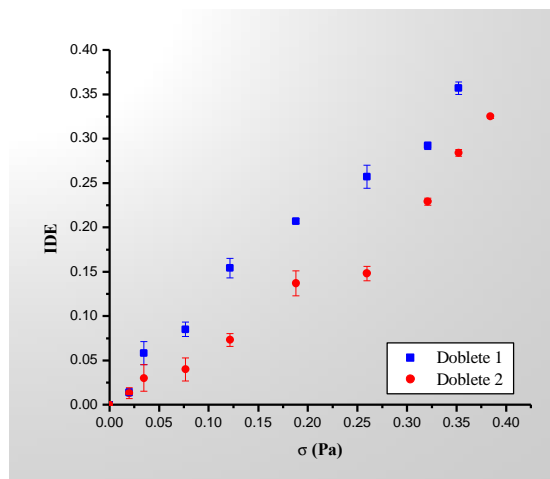


Figura 3: *IDE* de dos eritrocitos inferiores versus σ aplicada para una misma muestra.

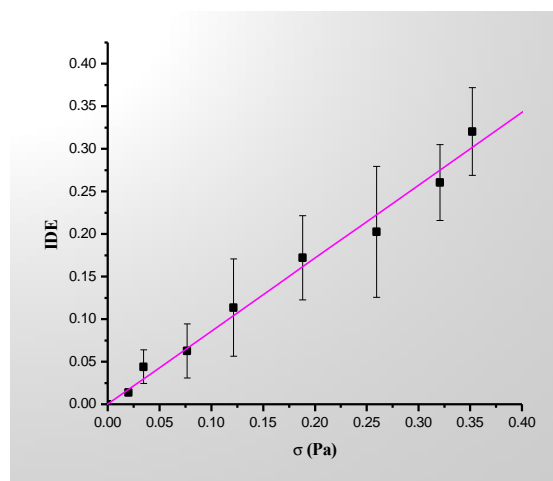


Figura 4: *IDE* promedio versus σ aplicada, incluyendo ajuste lineal

TABLA 1: PENDIENTES Y COEFICIENTES DE REGRESIÓN LINEAL PARA LOS ERITROCITOS INFERIORES EN CUATRO MUESTRAS SANGUÍNEAS

Muestra sanguínea	Pendiente	R
1	$0,75 \pm 0,03$	0,99
2	$0,59 \pm 0,02$	0,99
3	$0,73 \pm 0,02$	0,99
4	$0,86 \pm 0,02$	0,99

Eritrocitos inferior y superior de un doblete

En la Figura 5 se presenta la gráfica de *IDE* vs. σ para los eritrocitos superior e inferior de un doblete.

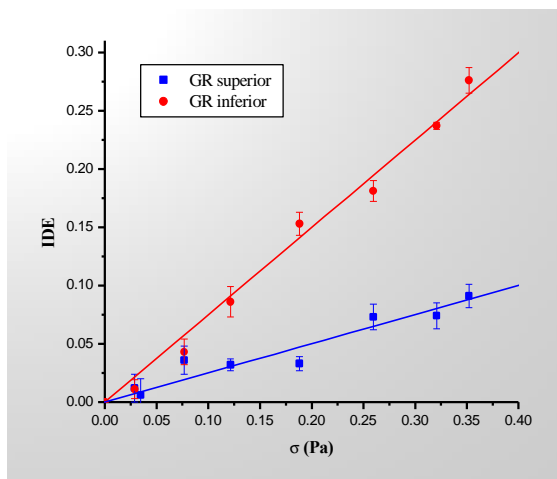


Figura 5: IDE de eritrocitos superior e inferior de un mismo doblete versus σ aplicada

V. DISCUSIÓN

En este trabajo, se han utilizado los aglutinados de glóbulos rojos inducidos por anticuerpos monoclonales como modelo de interacción celular específica. Se utilizó la técnica de la cámara de flujo para producir la disociación celular mediante la aplicación de una tensión de corte σ de valores controlados. Esta σ se aplica de forma paralela a la interfase del doblete adherido a la base del canal, lo cual produce el desprendimiento progresivo de la célula superior del mismo y la deformación de ambas células.

En los resultados obtenidos, se observa claramente que las células sometidas a valores crecientes de σ presentan también valores crecientes de su IDE, obteniéndose una relación lineal entre IDE y σ ($R = 0.99$), cuya pendiente es característica de cada célula analizada (ver TABLA 1). Estas observaciones muestran que puede asumirse satisfactoriamente un comportamiento viscoelástico lineal de la membrana del glóbulo rojo en estas situaciones de deformación. Comparando las pendientes de IDE vs. σ para ambas células del doblete, se observó que en todos los dobletes estudiados, la célula inferior sufre una mayor deformación durante el proceso de disociación, lo que estaría relacionado con la fuerza de adhesión entre esta célula y la base de vidrio.

VI. CONCLUSIONES

En el análisis de imágenes digitalizadas obtenidas en la cámara de flujo, las determinaciones son realizadas directamente sobre el doblete (nivel microscópico), ya que es posible seleccionar la célula objeto de estudio y controlar adecuadamente las tensiones aplicadas.

Este método incorpora nuevas determinaciones de deformabilidad de células sometidas a tensiones de corte en un flujo estacionario. Permitiendo, mediante el análisis de la relación entre la tensión y la deformación en diferentes situaciones, la caracterización del comportamiento viscoelástico de la membrana eritrocitaria en situaciones de adhesión específica.

En las experiencias se observó un aumento de los valores de IDE con el aumento de la tensión de corte aplicada en una dependencia de tipo lineal, siendo su pendiente una característica de cada célula en la situación particular de adhesión. Posteriormente, estudiando la relación entre la tensión y la deformabilidad, fue posible caracterizar el comportamiento viscoelástico de la membrana eritrocitaria en diferentes situaciones de adhesión.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a una mejor comprensión del comportamiento de la sangre en circulación y brindan nuevos parámetros que darían información relevante para el estudio de patologías hematológicas relacionadas con alteraciones en las propiedades de adhesión celular.

Referencias

- 1- Chien, S., Sung, K., Skalak, R., Usami, S. and Tözeren, A. *Biophysical Journal*, 24, 463-487 (1978).
- 2- Waugh, R. and Hochmuth, R. *The Biomedical Engineering Handbook*, 35, 474-486 (1995).
- 3- Chasis, J.A., Schrier, S.L. *Blood*, 74 (7), 2562-2568 (1989).
- 4- Riquelme, B. "Reología compleja de biomembranas. Aplicación a eritrocitos humanos". Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario (1997).
- 5- Chien, S. *Blood Cells*, 3, 71 (1997).
- 6- Hochmuth, R. Mohandas, N. *Biophysics Journal*, 13, 747 (1973).
- 7- B. Riquelme, V. Danieli y M. D'Arrigo. *Anales Asociación Argentina de Física*, 16, 70-72 (2004).
- 8- Plá L. "Contribution a l'étude de l'affinité des anticorps monoclonaux par des méthodes d'optiques physique". Tesis Doctoral, Université Henri Poincaré, Nancy 1, Francia (2000).
- 9- Sung, L.A., Chien, S. et al. *Journal of Cell Biology*, 101, 652-659 (1985).
- 10- D'Arrigo Mabel. "Incidencia de la relación estructura - Función del sistema de grupo sanguíneo MN y del receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria." Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (2000).