

ESTUDIO DEL PROCESO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA MEDIANTE LA TÉCNICA DE BIOSPECKLE

STUDY OF THE BLOOD COAGULATION PROCESS BY MEANS OF THE BIOSPECKLE TECHNIQUE

G. Detarsio^{*1}, M. Raviola¹, L. Tendela^{2,3}, A. Pratti¹, B. D. Riquelme^{1,2} y G. Galizzi^{2,3}

¹Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 535 – (2000) Rosario – Argentina

² Instituto de Física de Rosario – CONICET-UNR
Bv. 27 de febrero 210 bis – (2000) Rosario – Argentina

³Facultad de Cs. Exactas, Ingeniería y Agrimensura – Universidad Nacional de Rosario
Pellegrini 250 – (2000) Rosario – Argentina

Recibido: 06/05/2024 ; Aceptado: 30/10/2024

En este trabajo se utilizó un enfoque experimental para evaluar la utilidad de la técnica de biospeckle en el estudio del proceso de coagulación sanguínea. Se analizaron los tiempos de tromboplastina parcial con activador en plasma normal, plasma con deficiencia de Factor VIII y la mezcla de ambos. Los resultados muestran una correlación entre los cambios en los patrones de speckle y la formación de la malla de fibrina en las muestras normal y patológica. En consecuencia, la técnica de biospeckle puede ser una herramienta útil para evaluar la hemostasia y los cambios que se generan en la polimerización de la fibrina frente a deficiencias o interferencias.

Palabras Clave: biospeckle, coagulación sanguínea, THSP, coeficiente de correlación, procesamiento de señales.

In this work, an experimental approach was used to evaluate the usefulness of the biospeckle technique in the study of the blood coagulation process. Partial thromboplastin times with activator were analyzed in normal plasma, Factor VIII-deficient plasma, and a mixture of both. The results show a correlation between changes in speckle patterns and fibrin mesh formation in normal and pathological samples. Consequently, the biospeckle technique can be a useful tool to evaluate hemostasis and the changes generated in fibrin polymerization in the face of deficiencies or interferences.

Keywords: biospeckle, blood coagulation, THSP, correlation coefficient, signal processing.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2024.35.4.84>



ISSN - 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

Cuando una superficie ópticamente heterogénea se ilumina con un haz de luz láser, la luz dispersada forma un patrón de manchas claras y oscuras distribuidas de manera aleatoria. Tal distribución, que también se observa cuando la luz coherente se propaga a través de un medio que presenta variaciones aleatorias en su índice de refracción, se conoce como patrón de speckle. Cuando el medio que provoca la dispersión presenta variaciones en su estructura microscópica, el patrón de speckle generado varía con el tiempo. En particular, cuando el medio dispersor es de naturaleza biológica, el patrón de speckle se denomina biospeckle. La técnica basada en el estudio de la evolución temporal del biospeckle se denomina BSL y permite analizar el comportamiento dinámico de la muestra y caracterizar los parámetros que intervienen en el proceso biológico subyacente [1-3].

La sangre humana está constituida por elementos formes (leucocitos, eritrocitos y plaquetas) y plasma que, además de agua, contiene sales y un gran número de biomoléculas [4]. En condiciones normales circula por los vasos sanguíneos en estado líquido, pero ante una lesión forma un tapón sólido para sellar la herida y evitar el sangrado. En

este proceso, que recibe el nombre de coagulación, están involucradas proteínas plasmáticas llamadas *factores de la coagulación*. El primero de estos factores en ser reconocido fue el *fibrinógeno*. Las proteínas que circulan en el plasma en forma inactiva son capaces de activarse por un mecanismo muy eficiente conocido con el nombre de *mecanismo de cascada*. Como resultado final de este proceso la *Protrombina* es transformada en su forma activa, la *Trombina*. Finalmente, el *fibrinógeno* se transforma por acción de la *trombina* en *fibrina* insoluble, la cual polimeriza y genera la red proteica que consolida la estructura del coágulo [4].

Existen diferentes patologías en las cuales la formación del coágulo se ve alterada a causa de alguna deficiencia en los Factores de la Coagulación. Esto produce una enfermedad hemorrágica de las cuales la más estudiada es la Hemofilia. Según sea su característica puede clasificarse en Hemofilia A (deficiencia en la síntesis del factor FVIII) o Hemofilia B (deficiencia en la síntesis del factor FIX) [5].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la técnica BSL para evidenciar los cambios de índice de refracción que ocurren en el plasma humano normal durante el proceso de formación de la malla de fibrina, y las posibles modificaciones de dicho fenómeno óptico cuando se utilizan plasmas de pacientes con Hemofilia A. Además, eva-

* galizzi@ifir-conicet.gov.ar

luar por BSL si dichas alteraciones pueden ser corregidas al aportar FVIII al plasma deficiente mezclando, en partes iguales, plasma deficiente con plasma normal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En esta primera etapa se utilizó la técnica BSL para evaluar el proceso de coagulación en muestras de plasma recolectadas cumpliendo los requerimientos de la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR (Resol. 523/2017). Se procesaron un pool de plasma normal proveniente de 10 donadores sanos con una edad comprendida entre 18 y 45 años (PN), plasma de un paciente con hemofilia A (PD) y la mezcla de ambos (PM). Las muestras se obtuvieron por punción venosa y la sangre se recogió en tubos con citrato de sodio (3,2%) en relación de 1 parte de anticoagulante y 9 partes de sangre (1:9). Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500g y se separó el plasma sobrenadante. Para activar la formación del coágulo se realizó la prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial con Activador (TTPA) que consiste en agregar al plasma, un reactivo activador de la coagulación y cloruro de calcio 0.025M. En una cubeta de poliestireno de fondo redondo, alineada con el sistema de medición, se pipetearon, 100 ul de plasma y 100 ul de reactivo de TTPA (Actin FSL de Siemens). Luego de dos minutos de incubación, se agregaron 100 ul de cloruro de calcio y se activa la adquisición de imágenes.

Dispositivo experimental

La Fig. 1 muestra un esquema del dispositivo experimental utilizado. La luz proveniente de un láser de HeNe (longitud de onda 633 nm, potencia 60 mW) ilumina la muestra (M). La intensidad de la luz dispersada que atraviesa la muestra es registrada con un sistema basado en una cámara de vídeo tipo CCD, la cual se programó para adquirir 25 imágenes por segundo. Este sistema digitaliza las imágenes adquiridas por la cámara en 256 niveles de gris con una resolución de 256×256 píxeles y permite almacenarlas en una computadora personal (PC). Es necesario resaltar que la cámara no posee un sistema de lentes formador de imágenes. En consecuencia, el patrón de speckle adquirido se denomina speckle objetivo, pues depende únicamente de las características globales de la totalidad de la muestra y de la posición del plano de observación respecto a la misma. Por lo tanto, cada punto del detector recibe la contribución de todos los puntos iluminados de la muestra.

Cada muestra fue analizada durante 200 segundos, es decir, se adquirieron 5000 imágenes. Para evitar interferencias de vibraciones mecánicas externas, el sistema experimental se montó sobre una mesa óptica anti vibratoria. Los experimentos se realizaron en una habitación con temperatura controlada de 24°C.

Análisis de datos

Las imágenes adquiridas para cada muestra se agruparon en una matriz I de 256×256×5000 elementos, donde las dos primeras dimensiones representan las coordenadas espaciales de un dado píxel y la tercera dimensión corresponde al número de imagen adquirida dentro de la secuencia corres-

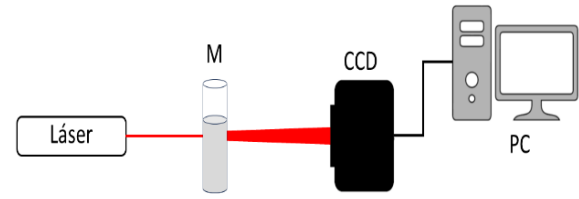


FIG. 1: Esquema del dispositivo experimental indicando el láser, la muestra analizada (M), la cámara (CCD) y la computadora personal (PC).

pondiente, o de manera equivalente, al momento de adquisición de esa imagen.

Para el análisis de la coagulación mediante BSL se emplearon los siguientes parámetros: intensidad media I_M , historia temporal del patrón de speckle (THSP), y actividad relativa A_R . La intensidad media $I_M(k)$ se define como 1:

$$I_M(k) = \langle I(k) \rangle \quad (1)$$

donde $I(k)$ es la matriz compuesta por los niveles de gris de los píxeles correspondientes a la imagen k y $\langle \cdot \rangle$ denota el operador valor medio, es decir, el promedio aritmético de los elementos de la matriz $I(k)$. El valor de I_M puede relacionarse con la mayor o menor transparencia de la muestra, es decir, mientras mayor es el valor de I_M más transparente es la muestra.

La historia temporal del patrón de speckle (THSP) es una matriz que muestra la variación temporal de la intensidad de un grupo de píxeles a lo largo del experimento [1, 6]. Cada fila de la THSP es la intensidad de un píxel determinado y cada columna es el momento en que fue registrada esa intensidad. De esta manera, la mayor actividad en un píxel corresponde a líneas horizontales cortas, mientras que la actividad baja corresponde a líneas horizontales largas. En este trabajo, los puntos que constituyen la THSP fueron seleccionados aleatoriamente en base a una distribución gaussiana bidimensional alrededor del píxel central de las imágenes de BSL.

La actividad relativa $A_R(k, k_0)$ entre las imágenes k y k_0 está definida como:

$$A_R(k, k_0) = 1 - CC(k, k_0) \quad (2)$$

donde $CC(k, k_0)$ es el coeficiente de correlación definido como [7]:

$$CC(k, k_0) = \frac{\langle (I(k)I(k_0)) \rangle - \langle I(k) \rangle \langle I(k_0) \rangle}{\sqrt{(\langle I^2(k) \rangle - \langle I(k) \rangle^2)(\langle I^2(k_0) \rangle - \langle I(k_0) \rangle^2)}} \quad (3)$$

$A_R(k, k_0)$ evalúa la actividad comparando la imagen k con una imagen k_0 considerada como referencia. En nuestro caso $k_0 = k - 25$, es decir, se calculó A_R entre la imagen k y la imagen adquirida un segundo antes. La disminución de la actividad de la muestra se traduce en un valor pequeño de A_R .

III. RESULTADOS

La Fig. 2 muestra la evolución temporal de I_M para la muestra normal (PN), patológica (PD) y la mezcla de ambas

(PM). Para el caso de las muestras PN y PM, puede verse que I_M disminuye a partir de los 110 s aproximadamente, siendo esta disminución más pronunciada para el caso de PN. Por otra parte, en el caso de PD la disminución de I_M se observa a partir de los 150 s aproximadamente. El decremento de I_M está asociado al momento de formación de la malla de fibrina y al tiempo de coagulación.

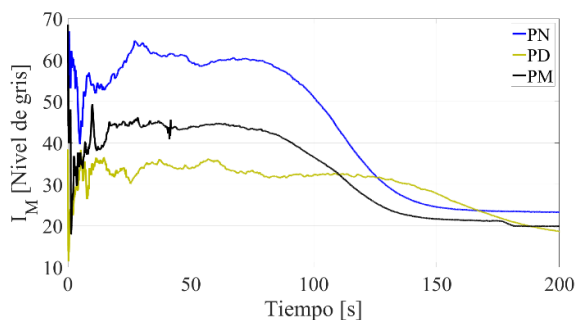


FIG. 2: Intensidad media I_M correspondiente a las muestras PN (azul), PD (amarillo) y PM (negro).

La Fig. 3 muestra la THSP correspondiente a PN (a), PD (b) y PM (c). Puede observarse que las muestras PN y PM disminuyen su actividad a partir de los 110 s aproximadamente, ya que después de dicho tiempo se observan líneas horizontales largas. Por otro lado, en el caso de PD este fenómeno se observa a partir de los 150 s aproximadamente.

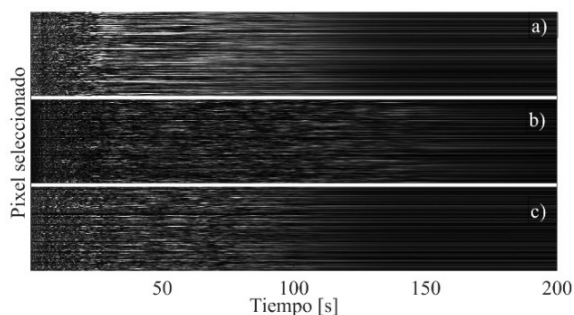


FIG. 3: THSP correspondiente a (a) PN, (b) PD y (c) PM.

En la Fig. 4 se observa la evolución temporal de A_R para las tres muestras. En los primeros 15 s, todas las muestras experimentan una gran actividad debido a la turbulencia ocasionada por la introducción del cloruro de calcio. Sin embargo, se observa que la muestra PN disminuye rápidamente su actividad relativa antes de los 50 s, y no muestra actividad luego de los 110 s aproximadamente. Las muestras PD y PM muestran una disminución de AR menos pronunciada. La muestra PM detiene su actividad a los 110 s aproximadamente, mientras que la muestra PD lo hace a partir de los 150 s aproximadamente.

Los resultados de los tres parámetros permiten diferenciar claramente el comportamiento de las muestras normal y patológica, observándose cómo este se acerca al normal cuando se mezcla en partes iguales el plasma deficiente con el plasma normal. Además, las gráficas analizadas de los parámetros propuestos brindan valores cuantitativos de los tiempos característicos de cada muestra.

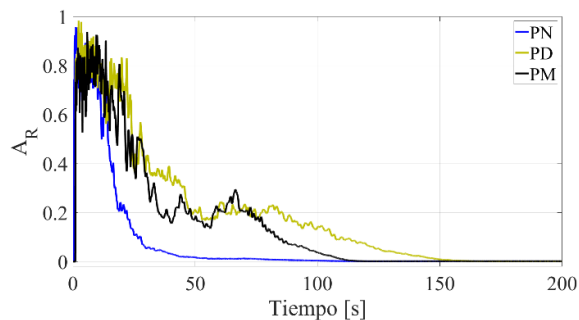


FIG. 4: Actividad relativa A_R correspondiente a las muestras PN (azul), PD (amarillo) y PM (negro).

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron los tiempos de tromboplastina parcial con activador en plasma normal, plasma con deficiencia de Factor VIII y la mezcla de ambos. Los resultados obtenidos en esta evaluación preliminar sugieren que la técnica BSL puede ser una herramienta útil para evaluar la hemostasia y los cambios que se generan en la polimerización de la fibrina frente a deficiencias o interferencias. Dichos resultados permitieron diferenciar claramente el comportamiento de las muestras normal y patológica.

REFERENCIAS

- [1] H. J. Rabal y R. A. B. J. (Eds). *Dynamic Laser Speckle and Applications* ISBN: 9781315219080 (CRC Press, 2009).
- [2] M. A. Toderi, B. D. Riquelme y G. E. Galizzi. Biospeckle laser as a tool to analyze erythrocyte aggregation. *Optical Engineering* **61**, 124101 (2022). <https://doi.org/10.1117/1.OE.61.12.124101>.
- [3] M. A. Toderi, B. D. Riquelme y G. E. Galizzi. An experimental approach to study the red blood cell dynamics in a capillary tube by biospeckle laser. *Optics and Lasers in Engineering* **127**, 105943- (2020).
- [4] K. Kaushansky, J. T. Prchal, L. J. Burns, M. A. Lichtman, M. Levi y D. C. Linch. en *Williams Hematology, 10e* (McGraw-Hill Education, New York, NY, 2021). accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1177843981.
- [5] A. Srivastava, E. Santagostino, A. Dougall, S. Kitchen, M. Sutherland, S. W. Pipe, M. Carcao, J. Mahlangu, M. V. Ragni, J. Windyga, A. Llinás, N. J. Goddard, R. Mohan, P. M. Poonnoose, B. M. Feldman, S. Z. Lewis, H. M. van den Berg, G. F. Pierce y the WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* **26**, 1-158 (2020). eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/hae.14046>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hae.14046>.
- [6] G. T. A. Oulamara y J. Duvernoy. Biological Activity Measurement on Botanical Specimen Surfaces Using a Temporal Decorrelation Effect of Laser Speckle. *Journal of Modern Optics* **36**, 165-179 (1989). eprint: <https://doi.org/10.1080/09500348914550221>. <https://doi.org/10.1080/09500348914550221>.
- [7] A. Federico, G. Kaufmann, G. Galizzi, H. Rabal, M. Trivi y R. Arizaga. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes. *Optics Communications* **260**, 493-499 (2006). ISSN: 0030-4018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401805012472>.