

DESARROLLO BIOINFORMÁTICO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UN CHIP ÓPTICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EN LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA

Ciunne, Melina

*Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura UNR
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: agregación eritrocitaria, análisis computacional, patologías vasculares

INTRODUCCIÓN

Las técnicas tradicionales para la evaluación de la agregación de glóbulos rojos por métodos ópticos requieren de una muestra de sangre de gran volumen, y los parámetros que brindan varían significativamente de un método a otro. Asimismo, el instrumental utilizado suele ser costoso y de gran tamaño, por lo cual no es transportable, y, a su vez, de difícil manejo, por lo que requiere conocimientos informáticos y de procesamiento por parte del usuario. A causa de esto, este tipo de determinaciones hemorreológicas no suele llevarse a cabo en el ámbito hospitalario, a pesar de que brindan información importante e influyente sobre la salud humana: la presencia de alteraciones en la agregación y en la sedimentación eritrocitaria puede ocasionar obstrucciones de los microcapilares, lo que significa la existencia de patologías vasculares, como ser la hipertensión arterial y la diabetes, como mencionan varios autores (Foresto y col., 2005; Mazarevica y col., 2002). En el año 2015, el Lic. en Física Martín Toderi, dentro del grupo de Óptica Aplicada a la Biología del IFIR (CONICET-UNR), y del Área Física de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farm. (UNR), comenzó a estudiar la agregación eritrocitaria mediante un prototipo de agregómetro de chip óptico por transmisión de luz. Este dispositivo permite evaluar la cinética de agregación de glóbulos rojos humanos mediante técnicas ópticas, utilizando una muestra de sangre de 15 microlitros, como se ve en Toderi y col. (2017).

OBJETIVOS

Objetivo General

Como objetivo general se buscó resolver las problemáticas planteadas en la sección anterior, es decir:

- Construir un dispositivo transportable, de costo moderado, y que necesite una muestra de sangre de poco volumen para poder realizar los análisis pertinentes.
- Desarrollar un software amigable, de fácil manejo, que en conjunto con el dispositivo permitan la obtención y el análisis de las bioseñales, la modelización fisicomatemática de la agregación eritrocitaria, y el cálculo no fluctuante de parámetros relacionados con sus variables (carga eléctrica superficial eritrocitaria, contenido de proteínas plasmáticas, etc.) establecidos (Shin y col., 2009; Baskurt y col., 1998; Uyuklu y col., 2011; Haderman y col., 2001).

De este modo, el dispositivo brindará información precisa para el diagnóstico de alteraciones de la agregación eritrocitaria y la detección de obstrucciones microcirculatorias, por lo que presentará una inmediata aplicación en Clínica Médica.

Proyecto: Desarrollo Bioinformático para la Optimización de un Chip Óptico para la Caracterización de Alteraciones en la Agregación Eritrocitaria.

Director del proyecto: Dra. Riquelme, Bibiana Doris.

Director del becario/tesista: Dra. Riquelme, Bibiana Doris; **Co-director:** Ing. Gentile, Aldo.

Objetivos Específicos

Sobre la base del agregómetro ya existente se busca:

- Realizar distintos análisis para disminuir costos, manteniendo su funcionalidad.
- Hacer un nuevo diseño con el fin de potenciar su portabilidad, que sea más simple, y de manejo fácil y seguro.

Es necesario tener en cuenta que deberá ser posible utilizarlo en el ámbito hospitalario y en laboratorios bioquímicos.

Como innovación, mediante técnicas bioinformáticas, llevar a cabo el desarrollo de un programa que:

- Analice las bioseñales obtenidas por el agregómetro.
- Efectúe cálculos específicos para caracterizar la cinética de agregación eritrocitaria.
- Obtenga parámetros, de manera rápida, que sean capaces de indicar alteraciones de las distintas variables involucradas en el fenómeno.
- Posea una interfaz gráfica amigable y de utilización sencilla e intuitiva.

Al mismo tiempo, englobando ambos frentes:

- Diseñar y ejecutar las experiencias biológicas necesarias para la validación del hardware y software del equipo mediante mediciones en muestras con glóbulos rojos humanos normales y con distintas alteraciones *in vitro*.

METODOLOGÍA

A fin de cumplir los objetivos planteados, el proyecto fue presentado en la convocatoria 2016 de las BIT, fue aceptado y obtuvo el segundo lugar en el orden de mérito, otorgándosele así el apoyo de esta beca, por parte de la Fundación Banco Santa Fe, a la estudiante de Lic. en Ciencias de la Computación Melina Florencia Ciunne. El trabajo aquí descrito fue efectuado en el marco de dicha beca.

Con respecto al software, se decidió realizar el procesamiento de las muestras en un ambiente de desarrollo de Python. Tras investigaciones de posibles metodologías por aplicar, se efectuó la escritura del código pertinente encargado de procesar las curvas obtenidas por el agregómetro, siendo estas, en primer lugar, ajustadas a una doble exponencial, es decir, a una función de la forma de la **Ecuación 1**.

$$f(t) = A + B \times e^{\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)} + C \times e^{\left(\frac{-t}{\tau_2}\right)} \quad (1)$$

Sobre la base de este ajuste, se calculan los parámetros que caracterizan matemáticamente la cinética de agregación eritrocitaria, como ser el M-index (grado de formación de agregados durante un tiempo t) y el Índice de Agregación (cantidad de agregación normalizada acumulada hasta un tiempo t). Los parámetros obtenidos, junto con información extra, como los datos normalizados y la curva de ajuste, son almacenados en el dispositivo donde se ejecuta el programa.

Además, se optó por hacer una aplicación web a modo de interfaz portátil para el usuario. Su desarrollo se efectuó utilizando las librerías Semantic UI y React, sobre el lenguaje de programación JavaScript, buscándose que sea una interfaz amigable, intuitiva y estética. Al terminar el procesamiento por parte del software, se muestran en pantalla los resultados obtenidos, y el operario de la salud es el encargado de sacar conclusiones.

Por último, se hizo la conexión entre ambas partes del sistema informático, y luego de realizar distintas experiencias del uso del software por distintas personas, se llevaron a cabo distintos cambios y ajustes del sistema, y se confeccionó así el resultado final del software producido. En la **Figura 1** se muestra la interfaz del software con un ejemplo de ajuste de una medición por una doble exponencial.

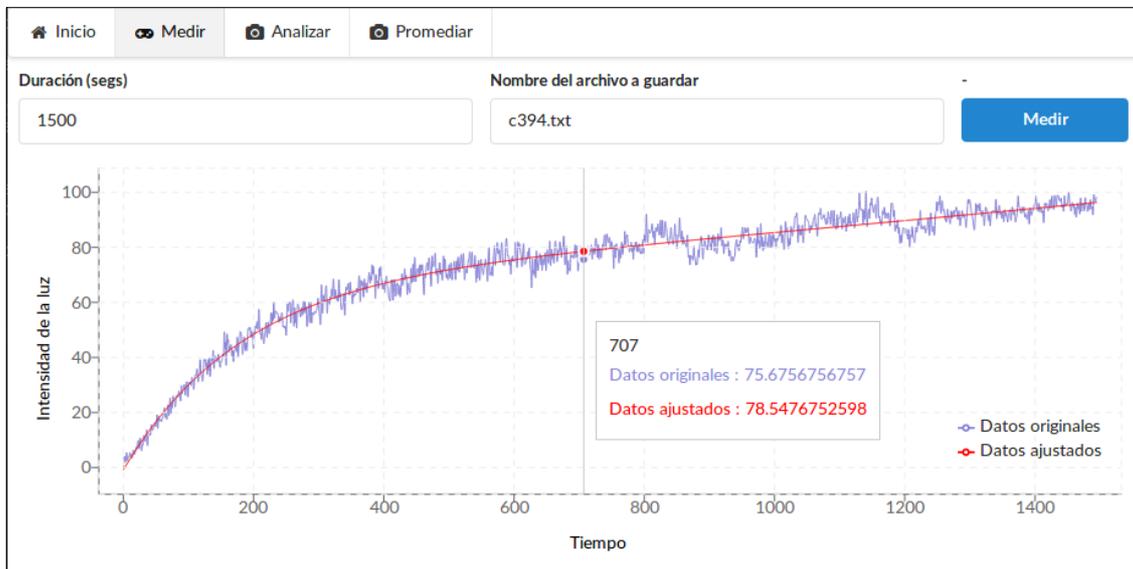


Figura 1: Interfaz de usuario del software desarrollado, mostrando un ejemplo de ajuste, por doble exponencial, de datos obtenidos en mediciones.

A lo largo de todo el proyecto, se realizaron recolecciones y preparaciones de muestras de sangre de donadores sanos en el Área Química Analítica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR. Pasaron por un proceso de anticoagulación con EDTA y corrección a hematocrito del 40%, para luego ser almacenadas a 4°C hasta su utilización a fin de validar el sistema desarrollado, evaluando la sensibilidad de los parámetros calculados.

Se efectuaron alteraciones en la membrana de los glóbulos rojos de las muestras, así como variaciones en las condiciones de carga eléctrica superficial, con el fin de obtener muestras de donadores sanos en distintos estados:

- alteraciones mediante agentes anestésicos (Propofol, Vecuronio, Remifentanilo) en distintas concentraciones y combinaciones de ellos;
- alteraciones mediante extractos acuosos de *Bauhinia forficata*;
- alteraciones mediante glucosa y trigonelina;
- controles de sangre normal.

En cuanto al nuevo prototipo de agregómetro, se realizó un análisis de conveniencia de los componentes electrónicos por utilizar, y se buscó el menor costo consultando distintos presupuestos. Tras su compra, se efectuaron ensayos a fin de diseñar de la mejor manera el dispositivo, con la ayuda de los estudiantes de Ingeniería Electrónica Lucas Pérez y Leonardo Sánchez. Se obtuvo así un prototipo parcial del circuito electrónico, así como un primer bosquejo de lo que será el dispositivo funcional y final. Paralelamente, se hizo la puesta a punto de una primera construcción de soporte para una pantalla táctil acompañada de una Raspberry Pi, que en principio funcionará como servidor de la aplicación web, y se llevaron a cabo pruebas de funcionamiento y compatibilidad con el software desarrollado.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Las validaciones efectuadas sobre el software desarrollado nos muestran que la doble exponencial planteada para el ajuste de la curva (**Ecuación 1**), es la que modela más eficazmente la cinética de agregación eritrocitaria, en la cual dos etapas fueron bien diferenciadas, probablemente debido al solapamiento de los fenómenos de agregación y sedimentación.

Sobre la base de lo observado en los distintos experimentos llevados a cabo, queda demostrada la utilidad del dispositivo para detectar distintos grados de alteración en la agregación eritrocitaria, resultado que no solamente será de gran utilidad para realizar el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades vasculares, sino también para la evaluación de la hemocompatibilidad de químicos de interés farmacéutico usados en el tratamiento de la diabetes y la hipertensión arterial. Así, el desarrollo tecnológico ejecutado en este proyecto podrá ser utilizado en el ámbito hospitalario y de laboratorio bioquímico de manera rápida y sencilla.

Con motivo de llevar a cabo un primer ensayo experimental del comportamiento del circuito construido frente a muestras de sangre, se observó, mediante un osciloscopio digital, el fenómeno de agregación de glóbulos rojos en muestras de dadores sanos en pos de variaciones de tensión. Los resultados obtenidos no fueron lo suficientemente buenos para determinar de manera precisa los parámetros buscados, por lo que queda como tarea a futuro encontrar soluciones y realizar nuevas experiencias, así como terminar el diseño del soporte y carcasa protectora, generar su impresión 3D, y confeccionar la comunicación entre las distintas partes del prototipo y su unión.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Baskurt O.K., Meiselman H., Kayar E.**, 1998. Measurement of red blood cell aggregation in “a plate–plate” shearing system by analysis of light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc.*, 19(4), 307–314.
- Foresto P. y col.**, 2005. Evaluación de alteraciones hemorreológicas. *Medicina (B. Aires)*, 65, 121–125.
- Hardeman M., Dobbe J., Ince C.**, 2001. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc.*, 25(1), 1–11.
- Mazarevica G., Freivalds T., Jurka A.**, 2002. Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients. *J Biomed Opt.*, 7(2), 244–247.
- Shin S., Yang Y., Suh J.-S.**, 2009. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc.*, 41(3), 197–207.
- Toderi M.A., Castellini H.V., Riquelme B.D.**, 2017. Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip. *J Biomed Opt.*, 22(1), 17003.
- Uyuklu M. y col.**, 2011. Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance. *J Biomed Opt.*, 16(11), 117006.