

INSTRUMENTAÇÃO PARA ANÁLISE DA VELOCIDADE DE CÉLULAS VERMELHAS NA MICROCIRCULAÇÃO DE PEQUENOS ANIMAIS

J.A.Mesquita Junior^{1,2,3}, E. Bouskela², E.Wanjberg³ e P.L. Melo^{1,2}

¹Laboratório de Instrumentação Biomédica – Inst. de Biologia e Faculdade de Engenharia - UERJ

²Laboratório de Pesquisas em Microcirculação – Instituto de Biologia - UERJ

³Coordenação de Física Aplicada – CBPF – Rio de Janeiro - Brasil

Fone: (0XX21) 2587-7773, Fax: (0XX21) 2587-7760

e-mail:plopes@uerj.br

Abstract: An optical velocimeter employing cross correlation has been developed in order to measure the Red Blood Cells (RBCs) velocity in the microcirculation of small animals. The magnified image of the microvessel under investigation is projected and aligned within of the two optical windows placed at a known distance. With the passage of RBCs, two time delayed signals are generated. The determination of this time delay is used to estimate RBCs velocity. The design of the instrument is described, as well as *in vitro* and *in vivo* results obtained with electrical models and small animals, respectively. These results confirmed the high scientific potential of the developed system.

Palavras-chave: Instrumentação Biomédica, Microcirculação, Velocidade de Fluxo Sangüíneo.

Introdução

A microcirculação compreende os vasos sangüíneos e linfáticos com diâmetro inferior a 100 μm [1]. Inúmeros fenômenos fundamentais para a sobrevivência dos organismos ocorrem ao nível da microcirculação, sendo que a medida de velocidade do fluxo sangüíneo na microcirculação é um fator importante para a determinação da oxigenação sangüínea e da concentração de hemoglobina. Estudos da velocidade de eritrócitos encontram diversas aplicações relacionadas à fisiologia da microcirculação [2] e a avaliação da eficiência de medicamentos.

O sangue é uma suspensão de células vermelhas sangüíneas (RBCs), células brancas (leucócitos) e plaquetas no plasma [3]. As RBCs são discos bicôncavos com cerca de 8 μm de diâmetro e 1 μm de espessura no centro [4]. Constituindo mais que 99% do particulado de matéria do sangue, as RBCs governam as propriedades do fluxo sangüíneo [3].

Os métodos de medidas de velocidade sangüínea na microcirculação se baseiam na observação de que na circulação capilar, as RBCs passam em fila única, com um espaçamento irregular de plasmas entre elas. Uma vez que estes padrões se mantêm constantes em distâncias curtas, eles podem ser empregados na determinação do tempo de trânsito em uma distância conhecida [4]. A análise destes padrões é usualmente

efetuada empregando dois sensores ópticos posicionados em janelas ópticas no centro da imagem do vaso separados por uma distância conhecida (Δx). A figura 1 esquematiza este método.

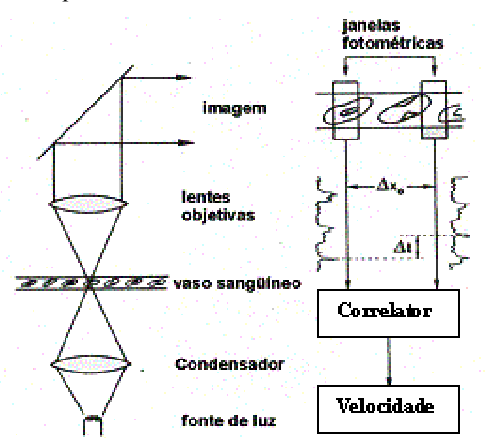


Figura 1: Esquema da instrumentação empregada na estimativa de velocidade do sangue pelo método da correlação temporal.

A intensidade luminosa recebida pelos sensores ópticos é modulada pela passagem das RBCs resultando em sinais semelhantes, porém apresentando um atraso no tempo inversamente proporcional à velocidade do fluxo sangüíneo. O tempo de trânsito das RBCs entre os dois pontos onde estão posicionados os sensores (Δt) é obtido por meio da estimativa do máximo valor apresentado pela correlação cruzada entre os sinais [5].

A maioria dos sistemas atualmente empregados na avaliação da velocidade de fluxo na microcirculação empregam técnicas baseadas em sistemas analógicos [5]. Brånemark e Jonsson [6] desenvolveram um método de mancha voadora que utiliza técnicas de vídeo. Munro [7], desenvolveu um método óptico baseado em prisma rotativo. Estes métodos dependem da habilidade do pesquisador e são limitados em condições onde somente uma única célula pode ser seguida no campo de visualização [8].

Wayland and Johnson [8] desenvolveram o método de dupla fenda, que permite gravações contínuas da velocidade e não depende da habilidade do pesquisador.

No entanto, este método depende da gravação em fita magnética e da utilização de computadores analógicos.

Neste contexto, este trabalho descreve o projeto e a análise do desempenho de um instrumento capaz de medir a velocidade de RBCs na microcirculação de pequenos animais.

Materiais e Métodos

Descrição do Correlator - O projeto do correlator foi baseado no trabalho de Stott [9] e reportado por Beck [10]. O projeto levou em consideração os parâmetros do sistema, tais como: distância entre os sensores ($L=10\ \mu\text{m}$), o que corresponde aproximadamente ao diâmetro de uma RBC; velocidade mínima ($V_{\min}=0,2\ \text{mm/s}$) e máxima ($V_{\max}=50\ \text{mm/s}$); erro no pior caso: 2% [10]. As velocidades mínimas e máximas foram fornecidas por profissionais da área biomédica envolvidos com estudos na área de microcirculação. A partir de (V_{\min}), (V_{\max}) e de (L), foram determinados os atrasos mínimo (τ_{\min}) e máximo (τ_{\max}), utilizando a relação $v=\Delta x/\Delta t$, correspondendo a $\tau_{\min} = 200\ \mu\text{s}$ e $\tau_{max} = 50\ \text{ms}$. A partir do erro no pior caso para detecção do pico, foi determinado o número mínimo de pontos (n_{\min}), o que correspondeu a $n_{\min} = 25$ pontos. Da relação entre as velocidades mínima e máxima, determinou-se a faixa do instrumento ($R_g=250$). O número máximo de pontos está relacionado com a faixa e n_{\min} , através da relação $R=n_{\max}/n_{\min}$, onde $n_{\max} = 6250$ pontos. Da relação $V_{\max}=L/n_{\min}\delta t$, determinou-se a resolução temporal do instrumento, correspondendo a $\delta t = 8\ \mu\text{s}$, resultando numa frequência de amostragem igual a 125 kHz. O diagrama em blocos dos sub-sistemas do correlator está descrito na Figura 2.

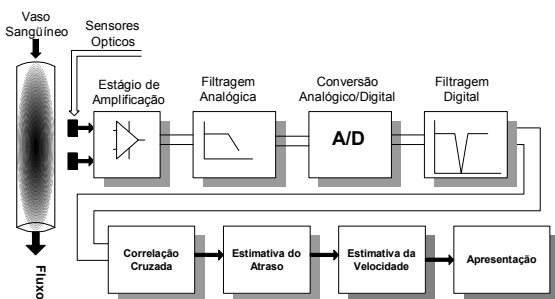


Figura 2: Diagrama em blocos do instrumento.

O aparato contendo os sensores ópticos é acoplado ao microscópio (Leica Microsystems, 020-518.500 DM/LS) e as janelas ópticas são alinhadas no centro do leito do vaso sob interesse, que corresponde ao ponto de maior velocidade [11]. Os sinais oriundos da passagem das RBCs são captados pelos fotodetectores e amplificados por amplificadores de ultra-baixo ruído e alta velocidade (AD OP-27). Em seguida, os sinais são entregues a um segundo estágio de amplificação, construído em torno do CI TL082, elevando os sinais fotométricos a um nível adequado para sua digitalização e processamento. Em seguida, os sinais são adaptados a um filtro analógico cuja banda-passante foi

dimensionada de modo a garantir que o instrumento tenha resposta dinâmica suficiente para medir as componentes de velocidade variantes no tempo, minimizando o erro médio quadrático [12], ($f_c=10\ \text{kHz}$, 5ª ordem Butterworth). Após esta etapa, os sinais são acoplados a uma placa de aquisição de dados (National Instruments) PCI 6024, 16 canais e 12 bits. Esta placa está conectada em um computador Pentium IV, 2,4 GHz, 256 MB de RAM, com gravador de CD, monitor de 17", entre outros periféricos.

O programa foi implementado em linguagem de programação G, ambiente LabVIEW™, versão 5.1. O painel frontal do instrumento é apresentado na Figura 3.

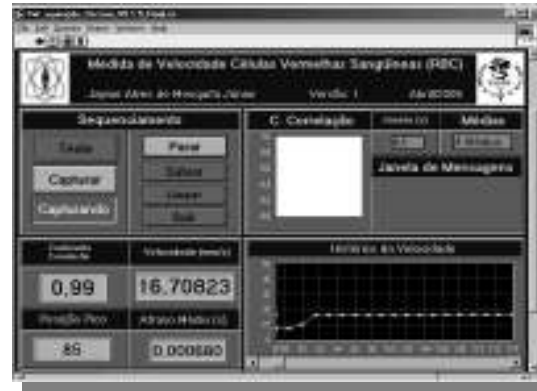


Figura 3: Painel frontal do instrumento.

O sistema de iluminação do microscópio é composto por uma lâmpada AC. Deste modo, a etapa de processamento inclui inicialmente uma rotina de filtragem digital para eliminação dos sinais espúrios oriundos da iluminação do microscópio (Filtros *notch*, 8ª ordem nas frequências de 60 Hz, 120 Hz e 240 Hz). Em seguida, os sinais são entregues à rotina que perfaz a estimativa da correlação cruzada. Os dados são aceitos se o coeficiente de correlação é maior que 0,7 [13]. A estimativa do atraso temporal (Δt) é obtida multiplicando a diferença entre o índice da amostra relativa ao máximo e o número de amostras adquiridas pelo intervalo de amostragem. Uma rotina perfaz a estimativa da velocidade utilizando a relação $\Delta v=\Delta x/\Delta t$.

Testes em modelos elétricos (*in vitro*) – O desempenho dos subsistemas dedicados a correlação foi avaliada por meio da análise de sinais com atrasos conhecidos. Para este fim, foi implementado um gerador de onda quadrada estável, baseado em cristal, utilizando filtragem passa-baixas de 1ª ordem. Foram implementadas quatro linhas de retardo analógicas com atrasos de 250 μs , 15 ms, 30 ms e 50 ms, correspondentes à faixa de τ_{\min} e τ_{\max} que serão encontradas em aplicações práticas. As calibrações dos atrasos foram obtidas utilizando um osciloscópio digital (Tektronics, TDS220).

Calibração - A calibração foi efetuada empregando um microscópio (descrito anteriormente), uma bomba de perfusão (Harvard Apparatus, 55-2222), uma seringa de 10 ml, um cateter para pequenos animais com diâmetro

igual a 0,5 mm e uma suspensão de pó de grafite em óleo de silicone. O sistema óptico foi adaptado ao microscópio e alinhado no centro do leito do cateter através do circuito fechado de TV. Utilizando a equação da continuidade [14], a bomba foi ajustada de modo a produzir no cateter velocidades entre aproximadamente 1 e 40 $\mu\text{l/s}$. A figura 4 apresenta a curva de calibração do instrumento.

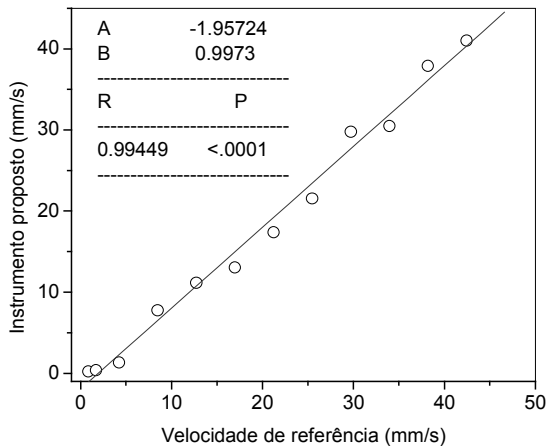


Figura 4. Curva de calibração do instrumento.

A correlação entre os valores de velocidade obtidos no sistema de referência (V_{ref}) e no elaborado no presente projeto (V_p) foi muito próxima de 1 ($R=0,994$), sendo que os erros descritos pela reta obtida pelo método dos mínimos quadrados ($V_p = -1,957 + 0,997V_{ref}$) foram posteriormente corrigidos.

Testes *in vivo* - Foram avaliadas as velocidades em 10 artérias, 10 veias, 10 arteríolas e 10 vênulas na microcirculação de hamsters normais, com massa corporal em torno de 130 g. Os animais foram induzidos à anestesia com pentobarbital sódico e mantidos anestesiados com α -cloralose. Durante a preparação e o experimento os animais tiveram a temperatura corporal mantida em 36,5 °C com manta aquecedora controlada por termistor [15] e a traquéia foi canulada para garantir a respiração espontânea. A bolsa da bochecha foi preparada conforme técnica de Duling [16] e adaptada por Svensjö [17] e após foi transferida para o microscópio. O tecido foi transluminado e a imagem do vaso sob interesse foi alinhada no plano focal do microscópio através de uma objetiva com magnificação de 10X (.22) e monitorada pelo circuito fechado de televisão. A Figura 5 mostra o aparato utilizado.

Resultados e discussão

Testes *in vitro* - A análise dos erros nos estágios de correlação são apresentados na Tabela 1. Os erros foram menores que 1%, sendo adequados à aplicação visada.

Teste *in vivo* - A figura 6 apresenta os resultados destes experimentos (média \pm desvio-padrão), mostrando uma queda significativa da velocidade com o tipo de vaso estudado (ANOVA, $p < 0,0001$). Este fenômeno é

coerente com as progressivas quedas de pressão nos vasos analisados [18], assim como com o aumento da resistência ao fluxo devido à redução de área de seção transversal que ocorre nos vasos sanguíneos [19].



Figura 5: Aparato utilizado nos ensaios *in vivo*.

Tabela 1 - Resultados da avaliação de modelos elétricos.

Atrasos	Correlator (s)	Erro (%)
250 μs	0,000248	0,8
15 ms	0,015012	0,079
30 ms	0,030038	0,12
49 ms	0,048775	0,46

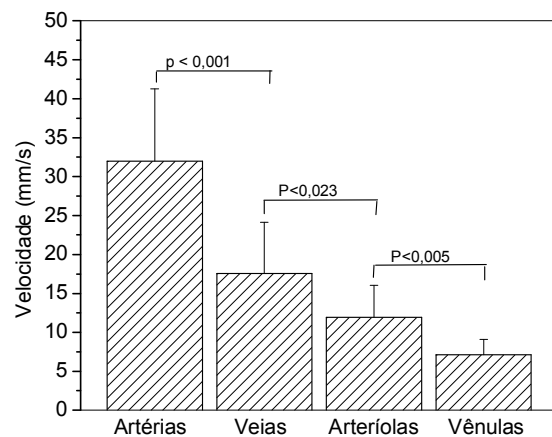


Figura 6. Velocidades obtidas nos testes *in vivo*.

Estudos realizados em hamsters por Slechta e Fulton [20] mostraram velocidades em arteríolas entre 0,9-12,9 mm/s e em vênulas entre 0,4-6,6 mm/s. Os resultados do presente trabalho mostraram uma queda significativa de velocidade entre os vasos citados ($p < 0,005$) e são consistentes com os reportados pelos autores citados. Valores de velocidades semelhantes em arteríolas e vênulas foram também reportados por Sato [21].

A Figura 6 mostra que foram avaliadas velocidades em torno de 5 a 45 mm/s com o sistema proposto. Anand *et al.* ressaltam que velocidades até 20 mm/s são suficientes para muitas medidas microvasculares [22]. No entanto, os resultados descritos na Figura 6 sugerem que, em hamsters, a faixa citada é suficiente apenas para

medidas de velocidades de RBCs em arteríolas e vênulas.

Conclusão

Foi construído um novo sistema de medida de velocidade de RBCs na microcirculação, contribuindo, desse modo, para o aprimoramento dos estudos nesta importante parte do sistema cardio-vascular.

Estudos *in vitro* mostraram um desempenho adequado dos sub-sistemas de correlação.

Em avaliações *in vivo*, o instrumento apresentou resultados satisfatórios, mostrando ser capaz de medir adequadamente uma larga faixa de velocidades em microvasos transluminados.

Agradecimentos

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação pelo auxílio na realização dos experimentos. Ao Laboratório de Sistemas de Medidas (CBPF) e ao CNPq e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Bouskela, E. (1999) "Vasomotricidade e Endotélio: Alguma Relação? Observação na Microcirculação da Bolsa da Bochecha de Hamster". Tese apresentada à Universidade do Estado do Rio de Janeiro em concurso para Professor Titular em Fisiologia Cardiovascular.
- [2] Fleming, B. P. Klitzman, B. and Johnson, W. O. (1985) "Measurement of Erythrocyte velocity by use of a periodic differential detector". *Am Physiol Soc*, H899-H905.
- [3] Pal, R. (2003) "Rheology of Concentrated Suspensions of Deformable Elastic Particles such as Human Erythrocytes". *J Biomec*, v. 36, pp.981-989.
- [4] Slaaf, D., Tangelder, G.J. e Reneman, R. (1993) "Physics of the Microcirculation", capítulo 19, *in* "The physics of heart and circulation" ed. Strackee, J. e Westerhof, N. Institute of Physics, Bristol, USA.
- [5] Intaglietta, M. and Tompkins, W.R. (1971) "System for the Measurement of Velocity of Microscopic Particles in Liquids". *IEEE Trans. Biom. Eng.*, no. 18(5), pp 376-379.
- [6] Brånemark, P.I. and Jonsson, I. (1963) "Determination of the velocity of corpuscles in blood capillaries: A flying spot device". *Biorheology*, v.1, pp. 143-146.
- [7] Munro, P.A.G. (1966) "Methods for Measuring the Velocity of Moving Particles under the Microscope". *In: Advances in Optical and Electron Microscopy*, edited by R. Barer and V.E. Cosslett. New York: Academic, v. I, pp. 1-40.
- [8] Wayland, H. and Johnson, P.C. (1967) "Erythrocyte Velocity Measurement in Microvessels by a two-slit Photometric Method". *J. Appl. Physiol.* v.22 (2), pp. 333-337.
- [9] Stott, A.L. (1987), *PhD Thesis*, University of Manchester.
- [10] Beck, M.S., and Plaskowski, A. (1987) "Cross Correlation Flowmeters Their Design and Application". Editora Adam Hilger, Bristol, Inglaterra.
- [11] Sissom L. e Pitts, D.R. (1988) "Fenômenos de transporte". Editora Guanabara.
- [12] Bendat, J. S. and Piersol, A. G. (1980) "Random Data, Analysis and Measurement Procedures". 2d ed.. John Wiley and Sons.
- [13] Hudetz, A.G., Weigle, C.G.M., Fenoy, F.J. and Roman, R.J. (1992) "Use of Fluorescently Labeled Erythrocytes and Digital Cross-Correlation for the Measurement of Flow Velocity in the Cerebral Microcirculation". *Microv Res*, v.43, pp. 334-341.
- [14] Resnick, R. and Halliday, D. (1984) "Física 2". Editora Livros Técnicos e Científicos, 4ª Edição.
- [15] Araújo, M.P.M., Silva, C.C., Mesquita Júnior, J.A., Santos, J.G. e Melo, P.L. (2002) "Controlador de Temperatura para Ensaio Microcirculatórios em Pequenos Animais". *Anais do XVIII CBEB*, pp. 47-50, São José dos Campos - SP.
- [16] Duling, R. (1973) "The preparation and use of the hamster cheek pouch of studies of the microcirculation". *Microv Res* v.5, pp. 423-429.
- [17] Svensjö, E. (1978) "Bradylinin and Prostaglandin E₁, E₂ and F_{2α} - induced macromolecular leakage in the hamster cheek pouch". *Prostaglandins Med.* v.1, pp.397-410.
- [18] Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M. e Stanton, B.A. (2004) "Fisiologia". Editora Elsevier, 5ª edição.
- [19] Guyton, A.C. e Hall, J.E. (1996) "TextBook of Medical Physiology". W.B. Saunders Company, ninth edition.
- [20] Slechta, R.F., Fulton, G.P. "Blood Flow Rates in Small Vessels of the Hamster Cheek Pouch". *Proc Soc Exp Biol Med* 112:1076-8. *In* "The Golden Hamster its biology and use in medical research". Edited by Roger A. Hoffman, Paul F. Robinson and Hulda Magalhães.
- [21] Sato, M. and Ohshima, N. (1988) "Velocity Profiles of Blood Flow in Microvessels Measured by ten Channels' Dual-Sensor Method. *Biorheology*, 25; 279-288.
- [22] Anand, A. P., Shruti, A.J. and Roland, N.P. (1999) "Determination of Red Blood Cell Velocity by Video Shuttering and Image Analysis". *Annals of Biom Eng.* v. 27, pp. 313-325.