

MÉTODO AUTOMÁTICO PARA A MEDIÇÃO DA ESPESSURA CAMADA DE PLASMA EM MICROCANALIS COM BIFURCAÇÕES

D. Bento[†], D. Cidre[†], J. Lima[†], R. Dias^{††} e R. Lima^{††}

[†] Polytechnic Institute of Bragança, ESTiG/IPB, Campus de Santa Apolónia,
Apartado 1134, 5301-857 Bragança, Portugal
e-mail: davidbento@ipb.pt

^{††} Polytechnic Institute of Bragança, ESTiG/IPB, Campus de Santa Apolónia,
Apartado 1134, 5301-857 Bragança, Portugal
CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Palavras-chave: Camada de plasma, Bifurcação, Método Automático

Resumo. *Ao longo dos anos, a espessura da camada de plasma tem sido determinada com o auxílio de métodos manuais. Apesar destes métodos serem bastante fiáveis, estes são morosos e podem introduzir erros do utilizador nos dados. No presente trabalho, foi desenvolvido um método automático de processamento de imagem para a determinação da espessura camada de plasma de uma forma automática.*

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, estudos *in vitro* do escoamento de sangue em microcanais têm sido extensivamente realizados a fim de se obter uma compreensão mais detalhada da reologia do sangue em microcanais [1,2]. O efeito Fahraeus-Lindqvist é uma das razões físicas para explicar a tendência dos Glóbulos Vermelhos (GVs) em migrar em direção ao centro do microcanais, resultando na formação de uma camada plasma nas regiões adjacentes à parede dos canais [3]. Estudos recentes demonstram que a formação da camada livre de células é afetada pela geometria dos microcanais [4-7], condições fisiológicas do fluido de trabalho - como hematócrito (Htc) [8,9].

Na maioria dos trabalhos anteriores de análise da camada de plasma, os dados apresentados foram obtidos manualmente. Os métodos manuais podem ser altamente fiáveis mas são relativamente demorados e podem introduzir erros do utilizador nos dados. Assim, é fundamental o desenvolvimento de métodos de análise de imagens capazes de obter esses dados automaticamente [10].

Neste estudo, a componente experimental foi realizada utilizando um sistema de microscopia constituído por um microscópio invertido e por uma câmara de alta velocidade. Foram utilizadas técnicas de análise de imagem para medir diversas trajetórias dos GV's adjacentes

camada de plasma num microcanal com bifurcações e confluências. Neste estudo é comparado um método manual com um método automático desenvolvido em Matlab.

2. MÉTODO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foi utilizado um sistema de microscopia que consiste num microscópio invertido (IX71; Olympus) combinado com uma câmara de alta velocidade (*i-SPEED LT*). O microcanal foi colocado sobre a platina do microscópio invertido e o caudal foi mantido constante com o auxílio de uma bomba de seringa (PHD ULTRA). As imagens foram obtidas com uma resolução de 800×600 pixels e com uma velocidade de 100 imagens/s.

O fluido em estudo neste trabalho foi Dextrano 40 (Dx 40; Otsuka Medicine), contendo 10% ($\pm 2\%$) de hematócrito, isto é, a percentagem de GVs na solução de Dextrano. O sangue foi obtido a partir de uma ovelha saudável e foi adicionada heparina para impedir a coagulação.

3. ANÁLISE DE IMAGEM

3.1. Método manual

Para obter os resultados de uma forma manual, é utilizada o plugin MtrackJ do *software* de análise de imagem Image J, NIH. Através deste programa foi possível identificar os GVs que escoam perto da parede do canal. Usando o plugin MTrackJ é possível selecionar o centroide dos GVs de uma forma automática.

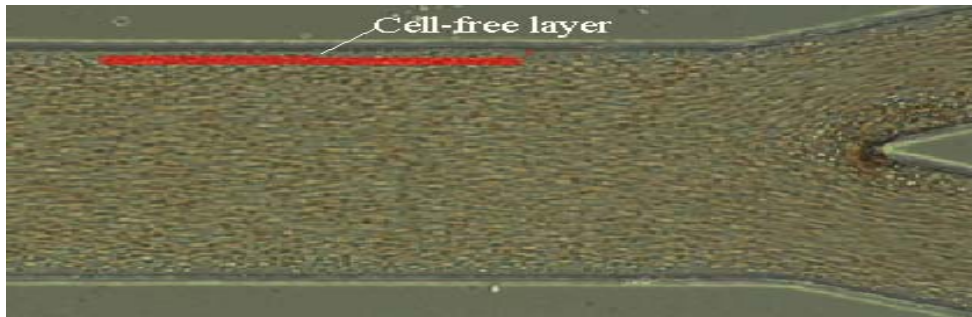


Figura 1: Método manual para a obtenção da camada de plasma

Após obter a posição x e y da posição do centroide dos GVs, os dados foram exportados para identificar a distância a que os GVs estavam da parede do canal, e assim determinar a espessura da camada de plasma existente nessa região.

3.2. Método automático

Sequências de imagens foram processadas usando técnicas de processamento de imagem em Matlab. Inicialmente, obtêm-se uma imagem que representa o somatório das diferenças de *frames*. Isto é, calcula-se a diferença de *frames* consecutivos e são somadas essas diferenças.

A imagem resultante é binarizada, obtendo-se uma imagem em que a preto se encontra a região de maior intensidade de GVs no canal e a branco a parte restante das imagens iniciais (Figura 2).

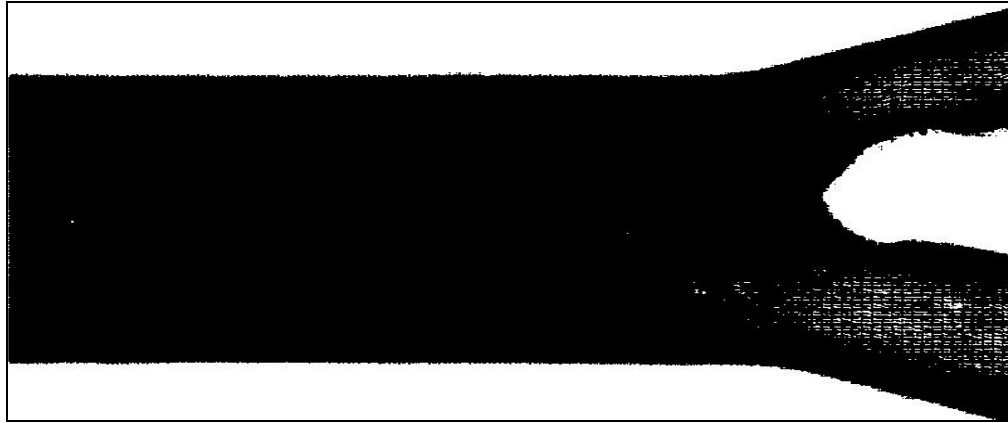


Figura 2: Resultado do primeiro passo do Método Automático

Num segundo passo, voltam-se a analisar todos os *frames*, obtendo-se uma imagem que representa a soma da multiplicação dos *frames*, em que a região branca representa o canal e a cor preta representa as partes restantes da imagem. Multiplicando esta imagem com a imagem obtida no passo anterior, obtém-se, como resultado final, uma imagem (Figura 3) em que a branco fica apenas a região da camada de plasma, que se pode medir de uma forma automática, e a preto as restantes regiões da imagem.



Figura 3: Resultado Final do Método Automático

Na Figura 3 é possível observar que junto ao vértice da bifurcação existe uma região a branco. Nesta região observa-se um fenómeno de aglomeração/estagnação dos GVs. No passo um (Figura 2) o método identifica com cor preta os GVs em escoamento. Uma vez que na região do vértice da bifurcação os GVs apresentam uma velocidade praticamente

nula (aglomeração/estagnação) então eles surgem a branco embora não se verifique a formação de camada de plasma nessa região.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram retirados na parede superior da entrada e da saída do microcanal representado na Figura 4. O caudal de fluido em estudo foi 500 nl/min e o fluido usado continha 10% de hematócrito.

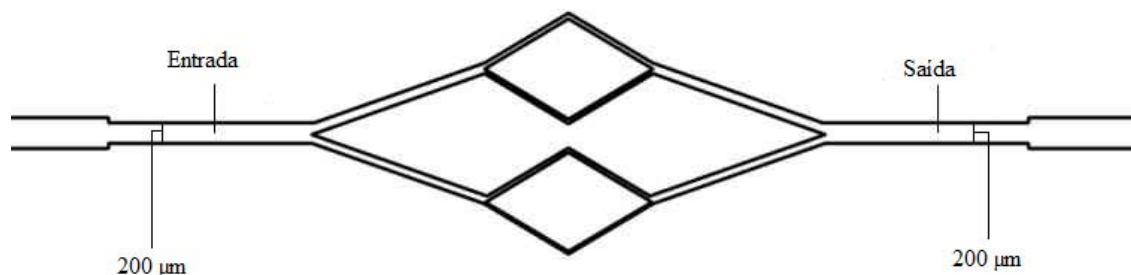


Figura 4: Geometria utilizada no estudo e a representação onde foram retirados os resultados

Na Tabela 1, estão presentes os resultados da espessura da camada de plasma obtidos pelos diferentes métodos.

	Automático (μm)	Manual (μm)
Entrada	11.3191	11.7096
Saída	9.9923	10.7721

Tabela 1. Comparação, da espessura da camada de plasma, entre o método manual e o método automático

Através dos resultados obtidos, é possível observar que o método automático apresenta resultados muito semelhantes aos resultados obtidos pelo método manual. Observa-se, também, que a espessura da camada de plasma é aproximadamente constante da entrada para a saída do microcanal.

5. CONCLUSÕES

Dada a semelhança dos resultados, no presente trabalho foi possível concluir que o método automático apresentado é uma alternativa viável ao método manual. O método automático desenvolvido é menos moroso e mais reprodutível que o manual dado que, no último caso, evita a introdução de erros por parte do utilizador.

6. TRABALHOS FUTUROS

Em estudos desta natureza, a qualidade de imagem é essencial para a obtenção de resultados fiáveis. Assim, em trabalhos futuros, iremos aumentar a qualidade de imagens, o número de imagens/segundo e a resolução da objetiva. Iremos também estudar o comportamento da camada de plasma nas regiões mais complexas da geometria, situadas entre a entrada e saída. A influência de diferentes hematócitos e velocidades de escoamento na espessura da camada de plasma será também explorada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pelos seguintes projetos de investigação: PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-ENB/116929/2010, financiados pela FCT, QREN and COMPETE

REFERÊNCIAS

- [1] A. A. Pries, D. Neuhaus, P. Gaetgens, “Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit”, *Am J Physiol* 263, H1770-H1778, 1992.
- [2] H. Goldsmith, G. Cokelet, P. Gaetgens, “Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology” *Am. J. Physiol.*, 257, H1005-H10015, 1989.
- [3] C. Caro, T. Pedley, R. Schroter, W. Seed, *The mechanics of the circulation*, Oxford University Press, 1978.
- [4] D. Pinho, *Determination and characterization of red blood cells trajectories: a semi-automatic method*, Master in Biomedical Technology, Polytechnic Institute of Bragança, Portugal, 2011 (in portuguese).
- [5] R. Lima, S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, et al, “In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system”, *Biomedical Microdevices*, 10,2, 153-167, 2008.
- [6] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, et al, “Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: role of hematocrit and geometry”, *Journal of Biomechanics* 41, 2188-2197, 2008.
- [7] V. Leble, R. Lima, R. P. Dias, C. S. Fernandes, T. Ishikawa, Y. Imai, T. Yamaguchi, “Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation” *Biomicrofluidics* 5, 044120, 2011.
- [8] H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, et al., “Red blood cells motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel”, *Journal of Biomechanics* 42, 838-843, 2009.
- [9] V. Garcia, R. Dias, R. Lima, *In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries*, Applied Biological Engineering – Principles and Practice, Ganesh R. Naik (ed.), InTech, 17, 394-416, 2012.
- [10] D. Pinho, R. Lima, A. I. Pereira, F. Gayubo, “Automatic tracking of labeled red blood cells in microchannels”, *Int. J. Numer. Meth. Biomed. Engng.*, DOI: 10.1002/cnm., 2012.