

DESENVOLVIMENTO DE UM DENSITÔMETRO DE CORES APLICANDO A TÉCNICA DA ELETROFORESE DE PROTEÍNAS UTILIZANDO PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS

João Gabriel Dareli Bellato (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anderson Reginaldo Sampaio
(Coorientador), Newller Marcelo Kimura
(Orientador), e-mail: newller@dfi.uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas / Departamento de
Física / Maringá, PR.

Área e sub-área:

10500006 – Física/10507000 – Física da Matéria Condensada.

Palavras-chave:

Processamento digital de imagens, Eletroforese.

Resumo:

O presente projeto tem como um dos objetivos principais a criação de um “software”, na linguagem “Delphi”, para o processamento de imagens digitais de bandas eletroforéticas analisando sua mobilidade e intensidade. Pretende-se ainda relacionar as medidas do deslocamento e de intensidade das bandas com resultados obtidos com outras técnicas tradicionais. Esperamos obter um método de análise que pode ser comparado às técnicas tradicionais, porém, com um custo financeiro e operacional bem menor.

Introdução

A eletroforese como uma técnica de uso laboratorial foi inicialmente aplicada em 1937 pelo bioquímico sueco Arne Tiselius em suas pesquisas de separação de proteínas, que o fez receber o Prêmio Nobel de química em 1948 [1,2].

Na realização da eletroforese é possível ter a separação das macros e micro moléculas de substâncias orgânicas, desde, DNA a proteínas, sendo essas de diversos tamanhos e cargas elétricas. Esse comportamento é possível, pois durante a eletroforese essas moléculas são submetidas a um campo elétrico que faz com que essas partículas corram para um dos extremos, dependendo da carga dessas moléculas, sendo que se a molécula estiver positivamente carregada irá caminhar para o extremo negativo. Essa habilidade de corrida das moléculas está em função do diferencial de potencial elétrico e a massa de tal molécula, onde serão formadas nas faixas, linhas de concentração das diversas moléculas que o material orgânico possui [1,2].

Em nossos estudos as moléculas serão de proteínas presentes no sangue chamado de proteínas séricas, que poderão de acordo com a variação de certas proteínas apresentarem anomalias no sangue do paciente, apresentando a oportunidade de um tratamento precoce. A análise das faixas são tradicionalmente realizadas pelo densitômetro, que mede a concentração das proteínas pela densidade de pigmentos coloridos aplicados nas faixas eletroforéticas, como consequência a pigmentação das faixas tende a destruí-las inabilitando o reuso delas. Com o nosso programa teremos como principal alvo a retirada do densitômetro e por consequência retirando a da coloração que possibilita o reuso das faixas. As faixas que obtemos para serem utilizadas durante o percorrer da programação e calibragem foram todas cedidas pelo LEPaCjunto com recomendações de livros e apostilas didáticas.

Materiais e Métodos

Materiais:

- Bandas obtidas pela eletroforese;
- Uma régua;
- Uma câmera digital com uma qualidade de imagem boa que arquiva em formato *PNG*;
- Para a utilização correta do programa será necessário um computador que esteja com os sistemas operacionais entre “*Windows*” *Vista* a “*Windows*” *10*.

Métodos:

Coloque a fita eletroforética rente a régua marcando o lado da aplicação como ponto inicial, certifique-se de ter uma iluminação constante em todas as partes da banda, utilizando a câmera digital tire uma foto de boa qualidade da banda e a régua. Com a foto retirada transmita o arquivo da foto para um computador e realize a conversão do formato *PNG* para *BMP*, com a imagem no formato aceito, o programa pode começar a análise da faixas eletroforéticas sendo que ele faz a análise de apenas uma linha que corre horizontalmente a imagem inteira, obtendo os valores da intensidade de cada cores que o “*pixel*” possui, que pelo padrão digital será em *RGB* (“*red*”, “*green*” e “*blue*”),esses valores variam entre o máximos de 255 que podemos igualar a cor branca e o mínimo de 0 que se iguala ao preto. Entre os testes realizados observamos que dentre as três cores os melhores resultados se deram com as cores verde (“*green*”) e azul (“*blue*”).

Resultados e Discussão

Usando a seguinte Figura 1 de faixa eletroforética após a migração das proteínas, podemos começar a fazer a análise através de nosso programa.

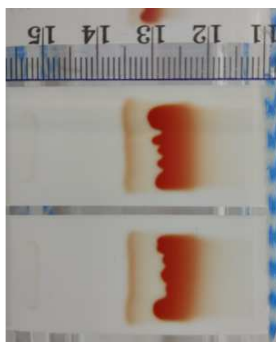


Figura 1 - Faixa eletroforética obtida no dia 10/8/2022.

Utilizando o programa, obtivemos o gráfico ilustrado na Figura 2 – (B) que mostra a intensidade por função dos pixels da imagem, de acordo com a literatura de estudo temos as proteínas séricas Hb A₁, Hb A₂ e a Hb Fetal em evidencia e sabendo que em nosso caso Hb A₂ e Hb Fetal tende a estarem muito próximas entre elas, onde acabam se sobrepondo um ao outro.

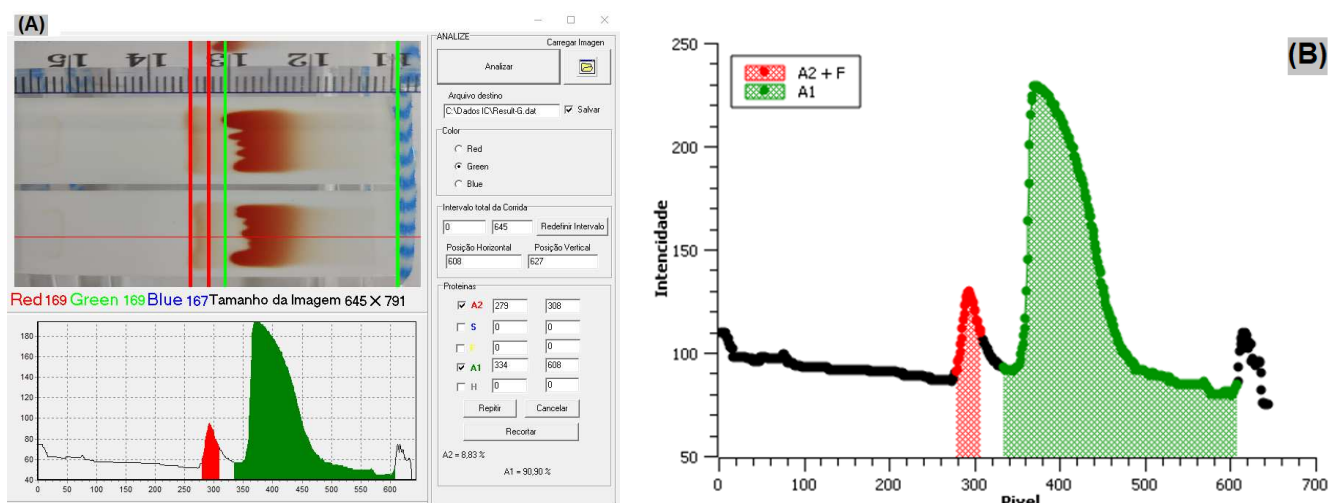


Figura 2– (A) Janela do programa após o termino da análise da cor verde e (B) gráfico de Intensidade × Pixel na cor verde.

Na Figura 2 - (A) temos a interface do programa, nesse momento já está no termino da análise, onde pode ser percebida a linha horizontal de coloração vermelha que seria a posição da realização da varredura da imagem já as linhas verticais de ambas as cores, marcam o intervalo das proteínas que serão identificadas. Ao aplicar a integral nos intervalos marcadas obtemos o valor da área abaixo das curvas, sendo que esses valores podem ser comparados com a porcentagem de cada proteínas do paciente.

Sabendo que nos métodos tradicionais teríamos o recorte das fitas, para posteriormente os pedaços serem diluídos em uma solução que segue a lei de *Lambert-Beer* e com isso serem colocados em um espectrofotômetro que nos

fornece dados para calcular a porcentagem das proteínas do paciente. Com ambos os resultados em mãos podemos fazer a comparação entre os resultados que podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores das porcentagens das proteínas Hb A₁ e A₂.

	Programa	Espectrofotometria
Hb A ₁	90,90 %	92,89 %
Hb A ₂ + Hb F	8,83 %	7,11 %

Como podemos observar a diferença foi pequena quando comparamos o percentual obtido pelo nosso método com o método tradicional, nesse sentido acreditamos, com o avanço dos estudos podemos melhorar ainda mais essa precisão. Observado uma diferença dos padrões citados na literatura, mas por não sermos profissionais qualificados na área médica não podemos com completa certeza ou sequer palpar sobre as possíveis doenças que o paciente possa ou não possuir.

Conclusões

Como mencionado anteriormente os valores dos percentuais foram obtidos uma margem de erro razoável, sabendo que esse programa ainda está em sua infância podemos, com o passar do tempo, melhorar esses erros e com isso conseguir resultados muito mais próximos com os que densitômetro oferece. Com isso acredito que o objetivo principal desse projeto tenha sido alcançado com resultados promissores. Sobre se esse programa irá trazer diminuição financeira não podemos afirmar no momento mas acreditamos que facilitará e muito a aplicação da eletroforese para coleta de exames laboratoriais.

Agradecimentos

Ao Orientador Professor Dr. Newller Marcelo Kimura, ao Coorientador Professor Dr. Anderson Reginaldo Sampaio, a Fundação Araucária e ao CNPq pelo apoio financeiro. Por fim, à Universidade Estadual de Maringá por proporcionar essa experiência e as pesquisadoras do LEPaC que nos forneceram todos os materiais de eletroforese e a literatura necessária para o presente estudo.

Referências

- [1] NAOUM, P.C. **Eletroforese:** Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas, DNA. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda, 2010.
- [2] NAOUM, P.C. **Eletroforeses:** Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas, DNA. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda, 2011.