UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

TESE DE DOUTORADO

APLICAÇÃO DA PINÇA ÓPTICA PARA O ESTUDO DA DEFORMABILIDADE DAS HEMÁCIAS

MARCELO MENDES BRANDÃO

ORIENTADORA:

PROFA. DRA SARA T.O. SAAD

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

CO-ORIENTADOR

PROF. DR. CARLOS LENZ CESAR

INSTITUTO DE FÍSICA – DEPARTAMENTO DE ELETRÔNICA QUÂNTICA

CAMPINAS, 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

APLICAÇÃO DA PINÇA ÓPTICA PARA O ESTUDO DA DEFORMABILIDADE DAS HEMÁCIAS

Tese de doutorado apresentada ao departamento de Clínica Médica pelo aluno Marcelo Mendes Brandão. Orientadora Profa. Dra. Sara Terezinha Ollala Saad (Faculdade de Ciências Médicas) e Co-orientador Prof. Dr. Carlos Lenz César (Instituto de Física)

CAMPINAS, 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientadora: Prof(a).Dr(a). Sara T.O Saad

Membros:

1. **Profa Dra Sara Terezinha Olalla Saad**
2. **Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini**
3. **Prof. Dr. Luis Carlos Barbosa**
4. **Prof. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro**
5. **Prof. Dr. Herch Moyses Nussenzveig**

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/05/2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ao meu Pai, que mesmo longe sei

que estava torcendo por mim

Agradecimentos

À minha esposa Karina pelo imenso amor, pela força nas horas de baixa e pela amizade.

À Sarita e ao Lenz pelo apoio, confiança, paciência e incentivo. Principalmente por me orientarem na tese;

À Dra. Malú por todo auxílio na realização dos experimentos, escrita dos trabalhos científicos e pela amizade ;

À Adriana pela montagem da Pinça;

A todo o pessoal do laboratório de Hematologia, coleta e fracionamento pela atenção e pela imensa gentileza;

À minha família pelo apoio, ajuda e compreensão;

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Sempre é preciso ter paciência, persistência e resistir

Sumário

1 - Lista de tabelas ____ *IX*

2 - Lista de figuras ____ *X*

3 - Lista de abreviaturas ____ *XIII*

4 - Resumo ____ *XIV*

5 - Summary ____ *XV*

6 - Introdução ____ *16*

6.1 - As Hemácias e membrana celular. ____ **16**

6.2 - Características mecânicas das hemácias ____ **17**

7 - Medida da Deformabilidade de Hemácias com a Pinça Óptica ____ *21*

7.1 - Princípio de funcionamento da pinça óptica ____ **23**

7.2 - Modelos para medida das propriedades mecânicas da Hemácia. ____ **24**

7.2.1 - Modelo Hidrodinâmico ____ 24

7.2.2 - Modelo para a força elástica ____ 27

7.2.3 - Modelo do Equilíbrio das forças elástica e hidrodinâmica ____ 30

7.3 - Validação Experimental do Modelo Utilizado para medida das propriedades mecânicas da Hemácia. ____ **30**

7.4 - Grandeza medida pela pinça óptica ____ **33**

8 - Objetivos do trabalho. ____ *36*

9 - Metodologia do Procedimento de Medida ____ *37*

9.1 - Montagem do aparato da pinça óptica ____ **37**

9.2 - Dano térmico causado pelo laser ____ **39**

9.3 - Medida da viscosidade do plasma ____ **40**

9.4 - Software de controle do experimento. ____ **41**

9.5 - Preparação do Laser e aquisição dos dados. ____ **44**

9.6 - Captura das imagens ____ **46**

9.7 - Planilhas de Cálculos 48

10 - Metodologia para o estudo da deformabilidade *49*

10.1 - Casuística 49

10.2 - Análise estatística dos dados 53

11 - Resultados *54*

11.1 - Potencia do laser utilizada 54

11.2 - Automatização do método de medida 54

11.3 - Uniformidade das medidas 54

11.4 - Experimentos com portadores de Esferocitose Hereditária (EsH) 56

11.5 - Morfologia dos esferócitos 57

11.6 - Estudos da deformabilidade da EsH com Pinça Óptica 57

11.7 - Experimento com pacientes em crise falcêmica 61

11.8 - Propriedades mecânicas de células de portadores de anemia ferropriva 62

11.9 - Trabalhos publicados e submetidos 64

11.9.1 - Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: Application to the study of drug response in sickle cell disease. 64

11.9.1.1 - Summary 64

11.9.1.2 - Introduction 65

11.9.1.3 - Methods 66

11.9.1.4 - Results 68

11.9.1.5 - Discussion 69

11.9.2 - Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers. 74

11.9.2.1 - Abstract 74

11.9.2.2 - Introduction 75

11.9.2.3 - Material and Methods 76

11.9.2.4 - Results 77

11.9.2.5 - Discussion 78

11.9.3 - Elastic properties of stored red blood cell units from donors with sickle cell trait 80

12 - Discussão *83*

13 - Conclusões ____ *92*

14 - Referências ____ *93*

15 - Anexos ____ *102*

15.1 - Lista de fabricantes ____ **102**

1 - Lista de tabelas

Tabela 1 - *Fatores mecânicos celulares que afetam a circulação das células vermelhas do sangue.* ____ *21*

Tabela 2 - *Casuística apresentada neste projeto.* ____ *50*

Tabela 3 - *Relação tipo de hemoglobina celular e potência do laser.* ____ *54*

Tabela 4 - *Elasticidade celular medida manualmente e medida automática.* ____ *55*

Tabela 5 - *Dados da elasticidade de todos os indivíduos controles estudados.* ____ *55*

Tabela 6 - *Elasticidade de hemácias obtidas em diferentes amostras de 2 indivíduos controles.* *56*

Tabela 7 - *Dados hematológicos dos indivíduos analisados.* ____ *58*

Tabela 8 - *Quadro comparativo entre as médias, medianas e variação (mínimo e máximo) da elasticidade nos grupos controle e portadores de esferocitose hereditária.* ____ *58*

Tabela 9 - *Quadro comparativo das elasticidades entre as diferentes mutações.* ____ *59*

Tabela 10 - *Quadro comparativo da Elasticidade média de esferócitos usando como modelo para o cálculo uma esfera e um paralelepípedo.* ____ *60*

Tabela 11 - *Dados da deformabilidade celular dos pacientes homozigotos para anemia falciforme em crise falcêmica.* ____ *62*

Tabela 12 - *Dados hematológicos dos indivíduos com anemia ferropriva utilizados neste experimento.* *63*

Tabela 13 - *Haematological data of patients with Sickle Cell Anaemia.* ____ *71*

Tabela 14 - *Red cell overall elasticity measured by optical tweezers in normal controls, sickle cell anaemia patients (HbSS), sickle cell anaemia patients taking hydroxyurea (HbSS/HU), and sickle cell trait subjects (HbAS).* ____ *72*

Tabela 15 - *Elasticity (dyn/cm) of irradiated and control RBC cells stored for 1, 14, 21 and 28 days. The elasticity (μ) has been studied measuring the deformation of each cell dragged at six different and constant velocities (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s).* ____ *79*

Tabela 16 - *Elasticity (dyn/cm) of AS and control RBC cells stored for 1, 14 and 21 days. The elasticity (μ) has been studied measuring the deformation of each cell dragged at six different and constant velocities (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s).* 81

2 - Lista de figuras

figura 1 - *Esquema mostrando a composição protéica e lipídica da membrana. Adptado de (Voet and Voet, 1995)* 17

figura 2 - *Ilustração esquemática dos modelos de deformação das regiões de superfície: A – dilatação da área (ou condensação), B – extensão sem a dilatação da área e C – dobra ou alteração da curvatura. T = tensão isotrópica, T_S = arrasto da superfície (equivalente a tensão uniaxial) e M = torque. Adaptado de (Evans, 1989).* 20

figura 3 - *Esquema da transferência de momentum do fóton na pinça óptica em uma esfera com índice de refração $n_1 \neq n_2$.* 23

figura 4 - *Esquema mostrando uma hemácia contida dentro de paralelepípedos.* 24

figura 5 - *Modelo geométrico da hemácia na câmara de Neubauer, assumindo a forma da hemácia como de um paralelepípedo. Z_1 e Z_2 representam, respectivamente, distância da hemácia ao fundo da lâmina e ao topo da lamínula na câmara de Neubauer. L, W e δ indicam o comprimento, a largura e a espessura da hemácia e V é a velocidade de arraste.* 25

figura 6 - *Gradiente de velocidades em um escoamento de Couette.* 26

figura 7 - *Desenvolvimento da camada limite* 27

figura 8 - *Exemplo de molas em paralelo com constantes elásticas K_1 e K_2.* 28

figura 9 - *Esquema de molas em série com constantes elásticas K_1 e K_2.* 29

figura 10 - *Deformação da hemácia em função da velocidade (Huruta et al., 1998).* 31

figura 11 - *Coeficiente angular da deformação da hemácia em função da profundidade Z.* 32

figura 12 - *Deformação da hemácia em função do tempo segundo* $L = L_o e^{-\frac{t}{\tau}}$ 33

figura 13 - *Folhas de papel, dobrada e não dobrada, submetidas a uma tração F. A deformação no comprimento da folha dobrada será dada pela elasticidade aparente e é muito menor que a elasticidade intrínseca da folha de papel medida com a folha não dobrada.* 34

figura 14 - *Modelo da ação da histerese* 35

figura 15 - *Foto da pipeta aspirando uma hemácia. Nota-se que todo conteúdo intracelular está do lado de fora da pipeta.* 35

figura 16 - *Laser de ND:YAG e aparato da pinça óptica.* 37
figura 17 - *Microscópio utilizado na pinça óptica com as objetivas, câmera CCD para gravação e controlador de movimento eletrônico* 38
figura 18 - *Esquema de montagem da pinça óptica de feixe simples, cortesia Revista Pesquisa FAPESP.* 38
figura 19 - *Lentes de correção dos planos focais.* 39
figura 20 - *Gráfico da absorção de luz em relação ao comprimento de onda.* 40
figura 21 - *Esquema do Viscosímetro de Ostwald* 41
figura 22 - *Tela de programação do novo sistema de controle da pinça óptica* 42
figura 23 - *a)Tela de configuração das corridas que compreendem os experimentos; b) Tela de controle e acompanhamento dos experimentos e sistema de feedback.* 43
figura 24 - *Tela de envio de comandos para o microcontrolador* 44
figura 25 - *Gráfico representando o comportamento anormal das células quando a corrida é aplicada em movimentos alternados. (Velocidade μm/s x Comprimento μm)* 45
figura 26 - *Esquema de uma velocidade do experimento. O quadro 1 indica a área de aceleração, 2 = local onde as células atingem o elongamento máximo (melhor local para aquisição das imagens para análise), 3 desaceleração e 4 pausa entre velocidades. A seta indica o sentido do movimento.* 46
figura 27 - *Image Pro-plus com o sistema de medida automática das variáveis celulares.* 47
figura 28 - *Planilhas de cálculos. A – Tabela de importação dos dados; B – Tabela de cálculos e resultados* 48
figura 29 - *Tabela de Resumo dos resultados.* 48
figura 30 - *Coleta da amostra de bolsa de doação através do "sterile collector".* 51
figura 31 - *Sangue diluído em plasma AB Humano.* 52
figura 32 - *Esquema do hemocitômetro manual (Câmara de Neubauer).* 52
figura 33 - *Morfologia dos esferócitos* 57
figura 34 - *A. Célula pinçada no início da análise. B. Célula com aumento da potenciado laser, morfologia alterada.* 60
figura 35 *Gráfico com a distribuição da elasticidade das células com anemia ferropriva.* 63
figura 36 - *Distribution of red cell elasticity in all subjects analyzed. A) Box plot, the black line represents the median and single lines over the boxes indicate the out liners. B) Histogram excluding the out line cells.* 73

figura 37 - *Box-and-whisker plot comparing the distribution of elasticity (dyn/cm) of fifty RBC from five split units. Each unit was divided into non-irradiated (control-C) and irradiated (I) RBC and stored for 1, 14, 21 and 28 days. The plot shows a box defined by the lower and upper quartiles and the elasticity median marked by a subdivision of the box.* 79

figura 38 - *Box-and-whisker plot comparing the distribution of elasticity (dyn/cm) of 175 RBCs from AS units and 175 cells from control units (AA), during storage period on days 1, 14 and 21. The plot shows a box defined by the lower and upper quartiles and the elasticity median marked by a subdivision of the box.* 82

figura 39 - *Modelo representativo: as barras diagonais vermelhas representam a membrana celular, as duas linhas verdes perpendiculares o interior celular.* 84

figura 40 - *Representação do equilíbrio onde* $f_1 = f_2 = \mu_{membrana}$. 85

figura 41 - *Representação de uma porção da membrana, onde* $f1 = f2 = \mu_{membrana}$. 85

figura 42 - *Modelo da distensão celular causado pela aplicação da força* f_1, *M = sentido do movimento.* 86

figura 43 - *Gráfico representando a velocidade da corrida (força aplicada) vs comprimento celular. A região 1 indica a área onde são feitas as análises deste projeto, sem atingir o* μ *da membrana e o k máximo. A região 2 indica que estes valores já foram ultrapassados.* 87

3 - Lista de abreviaturas

γ-rad	Células irradiadas com radiação gama
CPD	Solução de Glicose, Fosfato e Citrato
CPDA	Solução de Adenina, Glicose, Fosfato e Citrato
Dyn/cm	Dina por centímetro, unidade de força utilizada para expressar a elasticidade celular. Quando maior esta unidade, mais rígida é a célula.
EsH	Esferocitose hereditária
HbAS	Heterozigoto para hemoglobina S (portador de traço falciforme)
HbF	Hemoglobina fetal
HbSS	Homozigoto para hemoglobina S
HbSS/HU	Homozigoto para hemoglobina S em tratamento com hidroxiureia
HU	Hidroxiureia
MCH	Hemoglobina Celular Média (Mean Cell Haemoglobin)
MCV	Volume Celular Médio (Mean Cell Volume)
ND:YAG	*Neodimio Yttrium Alluminum Garnet*
RBC	Células vermelhas do sangue (Red Blood Cell)
SAG-manitol	Solução de Glicose monoidratada, Adenina, Cloreto de sódio e manitol

4 - Resumo

Lasers têm sido uma ferramenta cada vez mais utilizada na área da Biologia Celular e Medicina para medidas, diagnóstico e manipulação. Dentre essas utilizações destaca-se o trabalho pioneiro de A. Ashkin e colaboradores em 1986 que demonstraram o uso de uma técnica baseada na transferência de momentum dos fótons para capturar partículas dielétricas. Logo a seguir eles utilizaram essa técnica para capturar e manipular partículas biológicas com tamanhos variando de décimos a centenas de micra, demonstrando, desta forma, que este sistema funciona como uma "pinça óptica" para realizar manipulações intra e extracelulares sem causar prejuízo algum ao organismo vivo. Neste trabalho, a pinça óptica foi empregada para a análise do comportamento mecânico de hemácias normais, portadoras de hemoglobina S (homozigotos e heterozigotos) no estado normal e em crise falcêmica, esferocitose hereditária e anemia ferropriva. Foi ainda estudada a ação da hidroxiureia na reologia dos eritrócitos, da irradiação gama e da heterozigose para hemoglobina S em células estocadas em bolsas de doação de sangue. As análises foram feitas com um feixe de laser fortemente focado por uma objetiva de x100 de um microscópio, acoplado a um sistema de vídeo utilizado para gravar as imagens e posteriormente envia-las para análise em um computador. Pelo menos 20 células de cada participante foi pinçada pelo laser e arrastada contra plasma humano AB + com viscosidade conhecida em 6 velocidades constantes variando de 150 μm/s a 250μm/s (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s). A análise da deformação celular em razão da velocidade nos permitiu ter uma visão da elasticidade celular. A pinça óptica apresenta uma vantagem em relação as técnicas comumente utilizadas para aferir a deformabilidade celular, a análise das células é individual, levando em consideração a interação do citoplasma e da membrana. Os resultados sugerem que alterações na membrana da hemácia ou da hemoglobina causam um distúrbio no comportamento mecânico normal dos eritrócitos,. tornando-os mais rígidos, algumas vezes ultrapassando a capacidade de medida da metodologia. Com a pinça foi possível caracterizar a ação da HU no comportamento mecânico das células HbSS. A metodologia de pinça óptica pode ser muito útil para se verificar o efeito de outras drogas na deformabilidade de hemácias normais ou em pacientes com alterações da hemoglobina ou da membrana celular e também, estudar o efeito de diferentes conservantes para estocagem de hemácias.

5 - Summary

The deformability of erythrocytes is a critical determinant of blood flow in microcirculation. By capturing red blood cells with optical tweezers and dragging them through a viscous fluid we were able to measure their overall elasticity. Laser optical tweezers, based on photon momentum transfer, have been used successfully in a variety of biological applications. This technique is capable of measuring the whole red blood cell elasticity and viscosity. The optical trap was performed with a Nd:YAG laser strongly focused in a microscope connected to a CCD camera. A computer captured the images, where they were quantitatively and qualitatively analyzed. The elasticity measurement was obtained by dragging the RBC with the optical tweezers through the plasma fluid with a known viscosity. It should be pointed out that the laser does not exert any pressure or photo-damage on the cell. The analysis of the cell deformation vs velocity allowed us to obtain cell elasticity expressed in dyn/cm. The model we used to extract the values for the membrane elasticity and viscosity assumed that the cell is a parallelepiped with length L_0, width W and negligible thickness which is located at distance Z_1 from the bottom of the Neubauer chamber and Z_2 from the cover slip. We assumed that the elastic response to an applied force is given by $F=\mu(W/L_0)\Delta L$, where F is the force, μ is the elasticity and ΔL is the cell length deformation. We assumed a drag force F given by $F=\eta(WL_0/Z_{eq})V$, where η is the plasma viscosity, $(1/Z_{eq})= (1/Z_1)+ (1/Z_2)$ and V is the drag velocity. The equilibrium occurs when one force cancels the other. Therefore the elongation ΔL as a function of drag velocity is given by $\Delta L= [\eta L_0 /(\mu Z_{eq})] V$, which can be used to extract a value for μ provided by the plasm viscosity η, length L_0 and Z_{eq} which are easily measured. We measured, and compared, the red blood cell deformability from normal controls (HbAA), patients with: homozygous (HbSS) and heterozygous (HbAS) sickle hemoglobin, HbSS subjects on sickling crisis, hereditary spherocytosis and with iron deficiency anemia. We also studied the action of hydroxyurea on rheologic behavior of HbSS cells, the gamma irradiation and the heterozygosis for sickle hemoglobin on cells storage on blood donation bags. Our results showed that the red blood cell deformability was significantly lower in HbS subjects (HbSS and HbAS), except for HbSS/HU cells, whose deformability was similar to the normal controls. Our data showed that the laser optical tweezers technique is able to detect differences in HbS red blood cells from subjects taking hydroxyurea, as well as to differentiate red blood cells from normal controls and HbAS, indicating that this is a very sensitive method and can be applied for detection of drug-response in sickle cell disease. The sensitivity of the laser optical tweezers method showed that there is no significant change in elasticity over time up to 14 days of storage, regardless of whether the unit was irradiated or not. However, beyond 21 days of storage, irradiated units demonstrate decreased elasticity. RBCs elasticity from AS units stored for 1, 14 and 21 days presented significantly lower elasticity when compared to HbAA cells stored for the same period. Mostly of RBcs from HbAS units stored for 28 and 35 days, Hereditary spherocytosis cells and sickle crisis cells were very rigid or escaped from the optical trap. So these cells did not stay in the trap when the velocities were increased. Hence, the accuracy of elasticity measurement was impaired.

6 - Introdução

6.1 - As Hemácias e membrana celular.

As células vermelhas do sangue são um compartimento líquido envolto por uma membrana o qual contém uma solução de hemoglobina usada para a entrega de oxigênio e retirada do gás carbônico dos tecidos do organismo. Em humanos saudáveis, sua forma característica é um discóide bicôncavo com circunferência média de 8 a 10 μm e têm um ciclo de vida de, em média, 120 dias. Neste período, a hemácia percorre os vasos sangüíneos por aproximadamente 500.000 vezes totalizando uma distância de cerca de 250 km. É impressionante que, durante este período, a membrana do eritrócito mantenha sua integridade estrutural, mesmo sendo submetida a ciclos contínuos de significativa deformação causados pela pressão sanguínea e a necessidade de transpor vasos com calibres, às vezes, menores que seu diâmetro, podendo se alongar até 230% da sua dimensão original (Shohet and Mohandas, 1988). Tais fenômenos, só são possíveis se o glóbulo vermelho mantiver a integridade de suas principais propriedades: durabilidade e deformabilidade celular.

A membrana das células vermelhas do sangue é um composto trilamelar com uma camada bilipídica superficial suportada por uma cadeia de proteínas rígidas (figura 1).

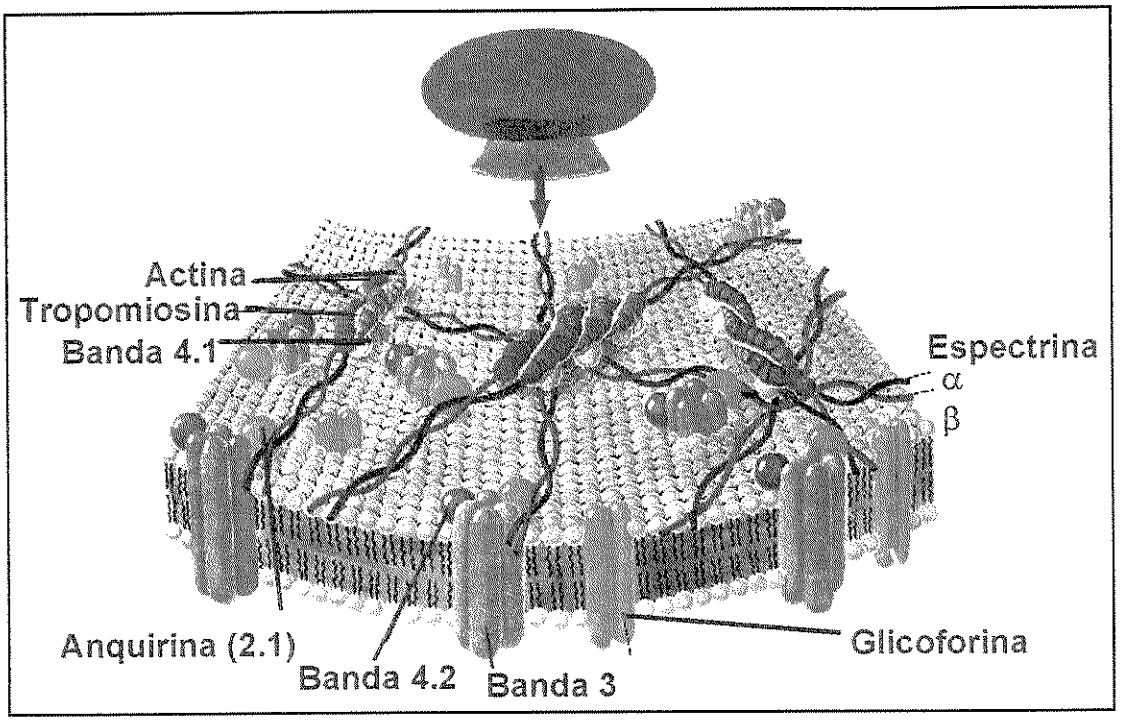


figura 1 - *Esquema mostrando a composição protéica e lipídica da membrana. Adptado de (Voet and Voet, 1995)*

6.2 - Características mecânicas das hemácias

Por ser o maior constituinte do sangue, a deformabilidade das células vermelhas influencia significativamente as características fluidas do sangue, especialmente na microcirculação. A perda ou diminuição da capacidade de deformação destas células leva à sua retirada prematura da circulação e, conseqüentemente, à diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos .

Os eritrócitos possuem uma propriedade viscoelástica única, na qual se comportam, às vezes, como um sólido e outras como líquido (Sleep et al., 1999). A transição do movimento como um corpo rígido para o comportamento de um corpo líquido é determinado pela rigidez dinâmica da célula, a qual depende de fatores constituintes tanto da membrana como do citoplasma. Exceto em estados de extrema desidratação ou em situações patológicas, como a desoxigenação de células falcêmicas, a solução de hemoglobina encontrada no citoplasma dos eritrócitos se comporta como um líquido Newtoniano ideal, onde a viscosidade é constante numa determinada temperatura, seu

comportamento mecânico se caracteriza por correlacionar linearmente a força aplicada com a velocidade de deformação, e sua viscosidade depende da sua concentração e qualidade (Evans, 1989).

A deformabilidade celular é regulada primeiramente por 3 propriedades celulares: a viscosidade interna; a razão área de superfície por volume e as propriedades viscoelásticas da membrana (Mohandas et al., 1980).

Os termos "rigidez celular" e "deformabilidade celular" são representações descritivas das respostas da célula a forças externas aplicadas. Estes termos dependem de vários fatores extrínsecos e intrínsecos. Fatores extrínsecos são aqueles relacionados às características arquitetônicas da célula, tais como a razão área de superfície – volume e contorno da membrana (liso ou crenado). Por outro lado fatores intrínsecos são as propriedades elásticas e viscosas dos constituintes da membrana celular e do citoplasma. A importância relativa de fatores extrínsecos na deformabilidade celular também depende das propriedades intrínsecas dos materiais constituintes (Johnson, 1989; Pearson, 2001).

O estudo da deformabilidade das células vermelhas do sangue requer que se separe cuidadosamente a propriedade intrínseca dos materiais constituintes das características geométricas e estruturais das células. Esta consideração é especialmente importante quando se quer relacionar o comportamento mecânico anormal ao estado patofisiológico da célula (Evans, 1989).

Devido ao tamanho reduzido das células vermelhas, as medidas das forças de deformação e a definição precisa da geometria celular é difícil e trabalhosa. Existem diversos métodos para se testar a deformabilidade celular: aspiração em micropipetas (Evans and La Celle, 1975; Havell et al., 1978; Smith et al., 1981; Stokke et al., 1986; Nash et al., 1988), filtração (Ballas et al., 1976; Adewuyi and Awarun, 1990; Reinhart, 1992; Berezina et al., 2001), ectacitometria (Bessis et al., 1980; Johnson, 1989; Kuypers et al., 1990), reoscópia (Groner et al., 1980; Sutera et al., 1985; Dobbe et al., 2002), Extensão por campos elétricos de alta freqüência (Kozlov and Markin, 2000) e outros (Evans, 1989). Entretanto, cada técnica é baseada em um critério particular da deformação celular e pode estar envolvido em apenas um aspecto do comportamento mecânico celular (Mohandas et al., 1980). Destes exemplos, a aspiração por micropipetas é o de mais fácil análise para elucidar as propriedades mecânicas intrínsecas dos constituintes da membrana celular, e providenciar meios de diferenciar fatores puramente oriundos da membrana, de fatores extrínsecos como a razão área volume (Evans and La Celle, 1975). As outras técnicas de

medição envolvem complicadas cinemáticas da deformação celular bem como o resultado é uma mistura de propriedades reológicas. Entretanto, estes métodos são muito úteis para uma avaliação qualitativa da deformabilidade dinâmica do eritrócito, o qual é importante para estudos clínicos(Mohandas and Evans, 2000; Stokke et al., 2000).

Experimentos mecânicos em células individuais, como na pinça óptica, oferecem vantagens distintas sobre o estudo de *"pools"* celulares, as forças que causam a deformação das células podem ser diretamente controladas e analisadas. Entretanto, são encontradas duas dificuldades significativas quando se desenha um experimento para análise individual das células: devido ao tamanho das células a difração óptica da luz limita a acuidade da medida da geometria celular e da deformação; devido à membrana ser uma estrutura fina suportada por uma matriz de citoesqueleto (figura 1), as forças requeridas para deformar a célula, ou mesmo lesionar a membrana, são muito baixas, da ordem de 10^{-6} dyn ou 10^{-9}g, assim métodos de amplificação e controles precisos computadorizados são necessários para medida em laboratório (Evans, 1989).

A membrana celular é, conceitualmente, vista como um mosaico de pequenos elementos retangulares, não distinguíveis quando comparados ao conjunto de sua superfície. A deformação global do envelope celular pode ser reduzida a deformações locais destes pequenos elementos "imaginários". Dentro deste conceito, toda deformação pode ser reduzida a três modos independentes de ação: dilatação ou condensação da área de cada elemento; simples extensão de cada elemento com sua área permanecendo constante e a dobra ou curvatura do elemento sem alterar suas proporções retangulares (figura 2)(Evans, 1989).

As propriedades mecânicas da membrana celular podem ser utilizadas para modificar um grande número de funções celulares, como por exemplo, transporte de íons e pequenas moléculas. Mais ainda, alguns processos de transporte (endocitose, exocitose e outros eventos de fusão de membrana) envolvem deformações grandes e locais na membrana. Realmente, diversos fenômenos celulares são acompanhados por mudanças morfológicas nas células e podem ser afetados pela deformabilidade intrínseca da membrana e de sua tensão (Dai and Sheetz 1998).

Devido a situações onde a reologia das células vermelhas está alterada levando a patologias como, isquemia por mau funcionamento da microcirculação e à anemia por retirada prematura das células no sistema reticuloendotelial, o estudo das propriedades mecânicas das hemácias tem sido objeto de diversos estudos clínicos(Nash, 1991). A

tabela 1 apresenta um resumo das alterações e características dos eritrócitos que comandam sua habilidade de se deformar.

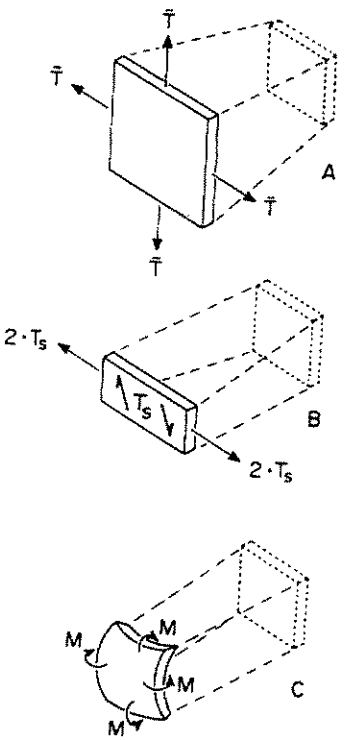


figura 2 - *Ilustração esquemática dos modelos de deformação das regiões de superfície: A – dilatação da área (ou condensação), B – extensão sem a dilatação da área e C – dobra ou alteração da curvatura. T = tensão isotrópica, T_S = arrasto da superfície (equivalente a tensão uniaxial) e M = torque. Adaptado de (Evans, 1989).*

O que ainda não está muito claro, dentro de todos estes trabalhos, é o grau de anormalidade mecânica tolerado antes que os problemas clínicos aconteçam.

Recentemente desenvolveu-se a técnica de pinças ópticas, na qual um feixe de luz de um laser pode ser utilizado para capturar partículas em seu foco e modificá-las mecanicamente. Isso abre a possibilidade de utilização dessa técnica para medidas das propriedades reológicas das hemácias e acompanhar suas modificações em processos clinicamente importantes.

Tabela 1 - *Fatores mecânicos celulares que afetam a circulação das células vermelhas do sangue.*

Fator	Determina
1) Geometria	
Razão área / Volume	*- Deformabilidade máxima:* *1. Diâmetro mínimo de um capilar por onde a célula pode passar* *2. A habilidade de passar através de poros de pequeno diâmetro* *3. Elongação máxima no fluxo sanguíneo.*
Tamanho e forma	*- Grau de deformação:* *1. Células maiores devem se deformar mais para transpor pequenos vasos* *2. Formas distorcidas devem se adaptar para transpor vasos ou as condições do fluxo*
2) Membrana	
Viscoelasticidade: 1. Força de arrasto, dobra e módulo elástico; 2. Viscosidade da superfície.	▪ Extensão da deformação ▪ Ritmo da deformação ▪ Resposta às deformações periódicas.
Fragilidade e estabilidade	▪ *Perda de área da membrana* ▪ *Alteração da forma*
3) Citoplasma	
Viscosidade / viscoelasticidade	▪ *Razão da deformação e resposta a deformações periódicas.*

Modificado de (Nash, 1991).

7 - Medida da Deformabilidade de Hemácias com a Pinça Óptica

Lasers têm sido uma ferramenta cada vez mais utilizada na área da Biologia Celular e Medicina para medidas, diagnóstico e manipulação. Dentre essas utilizações destaca-se

o trabalho pioneiro de A. Ashkin e colaboradores em 1986 que demonstraram o uso de uma técnica baseada na transferência de momentum dos fótons para capturar partículas dielétricas (Ashkin et al., 1987). Logo a seguir eles utilizaram essa técnica para capturar e manipular partículas biológicas com tamanhos variando de décimos a centenas de microns, demonstrando, desta forma, que este sistema funciona como uma "pinça óptica" para realizar manipulações intra e extracelulares sem causar prejuízo algum ao organismo vivo (Ashkin and Dziedzic, 1987; Ashkin, 1991).

Desde então essa técnica tem sido usada para uma grande variedade de fins na biologia molecular/celular e áreas correlacionadas, em basicamente, duas vertentes: 1. manipulação direta de microorganismos e organelas celulares e 2. medidas de propriedades mecânicas de membranas. Como uma ferramenta de manipulação ela foi utilizada para inserir DNA's dentro de diferentes tipos de células, para conectar DNA ao silício na tentativa de construção de uma interface biomecânica e para fertilizações in vitro (Obruca et al., 1997; Buer et al., 1998). Como ferramenta de medida ela foi utilizada para medir propriedades mecânicas de hemácias (Huruta et al., 1998; Sleep et al., 1999), para medir e comparar deslocamentos celulares e forças de miosinas cardíacas (Sugiura et al., 1998), para caracterização de motores biológicos moleculares (Thomas and Thornhill, 1998) e rigidez flexural de microtúbulos (Felgner et al., 1996), para medir o comprimento de uma molécula de DNA (Sakata-Sogawa et al., 1998) e motilidade de espermatozóides humanos (Konig et al., 1996). Também foi utilizada para detectar concentrações da ordem de femtomolar de antígenos (Helmerson et al., 1997) e permitiu a observação da ausência de travamento do movimento de rotação reversa de flagelos motores de bactérias (Berry and Berg, 1997).

O trabalho de Sleep *et al* (Sleep et al., 1999) utilizou um sistema de pinça óptica diferente do que foi utilizado por Huruta *et al* (Huruta et al., 1998) e do apresentado neste trabalho. Eles utilizaram uma pinça dupla onde cada feixe capturava uma esfera de látex acoplada em extremidades opostas de hemácias livres do conteúdo de hemoglobinar (*Ghosts*) para analisar a resposta da membrana à forças aplicadas. O objetivo destes era correlacionar as características estruturais do citoesqueleto da membrana celular com anomalias hereditárias. Entretanto, o fato deste estudo ter avaliado apenas a membrana isolada da hemácia, isto é, sem o conteúdo citoplasmático, impede uma real avaliação das características mecânicas da hemácia

7.1 - Princípio de funcionamento da pinça óptica

Uma pinça óptica a laser consiste de um feixe de laser fortemente focado. A forma mais intuitiva de entender o princípio de operação da "armadilha óptica" é examinar dois raios, um de cada lado, do feixe de laser cônico que se encontrarão no foco. Para comprimentos de ondas muito menores do que as partículas aprisionadas, a captura pode ser entendida a partir da óptica geométrica. Esta "armadilha óptica" acontece devido à transferência de momentum (quantidade de movimento) do fóton para a partícula capturada.

Pode-se imaginar o fóton como uma partícula que ao ter sua trajetória desviada obriga o objeto que a desviou a sofrer um recuo na direção de F, como mostra a figura 3 a. Os raios a e b da figura 3 b se encontrariam no foco f se não houvesse a esfera. O desvio desses raios produz os recuos na direção F_a e F_b, e a combinação dos dois leva ao recuo na direção F em (b). Note que o recuo F tende a obrigar o centro da esfera a coincidir com o foco do laser f. Desta forma um feixe de laser focalizado cria uma armadilha que mantém o centro das partículas no foco do laser.

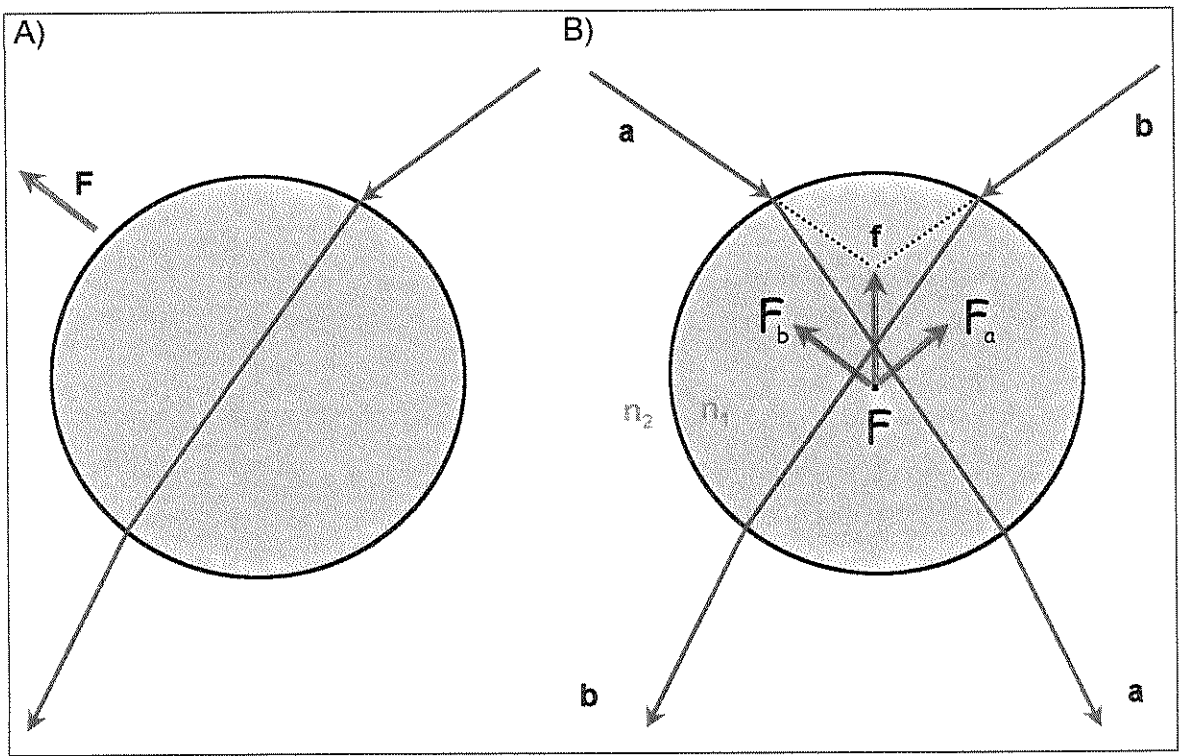


figura 3 - *Esquema da transferência de momentum do fóton na pinça óptica em uma esfera com índice de refração* $n_1 \neq n_2$.

7.2 -Modelos para medida das propriedades mecânicas da Hemácia.

7.2.1 - Modelo Hidrodinâmico

O modelo hidrodinâmico utilizado para as análises assume que, a hemácia na forma bicôncava característica, pode ser aproximada a um paralelepípedo de comprimento L, largura W e espessura δ desprezível (figura 5). Pelo teorema da dissipação de energia, para escoamentos no regime de baixos números de Reynolds, a força de arraste é sempre maior na superfície que engloba outra. A figura 4 mostra um esquema de visão lateral de uma forma bicôncava que está contida em um paralelepípedo de espessura δ_{max} e que contém um paralelepípedo de espessura δ_{min}. Pelo teorema da dissipação a força hidrodinâmica na forma bicôncava será menor do que a força no paralelepípedo de espessura δ_{max} e maior do que a força no paralelepípedo de espessura δ_{min}. Como a força varia continuamente existirá um paralelepípedo com espessura $\delta_{equivalente}$ no qual a força hidrodinâmica será igual à força na forma bicôncava. Desde que $\delta_{min} < \delta_{equivalente} < \delta_{max} << L << d$, sendo d a profundidade da câmara de Neubauer (100 μm), a espessura da hemácia pode ser desprezada e a aproximação da mesma por um paralelepípedo se justifica.

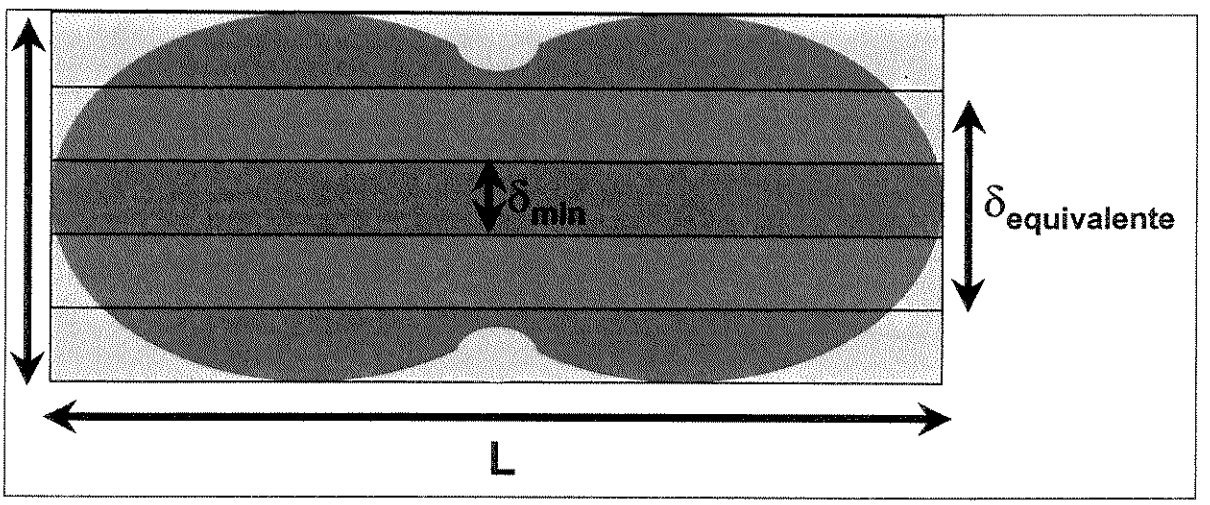


figura 4 - *Esquema mostrando uma hemácia contida dentro de paralelepípedos.*

As análises são feitas com a hemácia localizada a uma profundidade Z_1 do fundo de uma câmara de Neubauer (cuja profundidade total é de 100 μm) e Z_2 da lamínula. Com a pinça essa hemácia é arrastada contra um fluido (plasma humano AB +) com viscosidade conhecida (η) com uma velocidade constante V, conforme mostra a figura 5 .

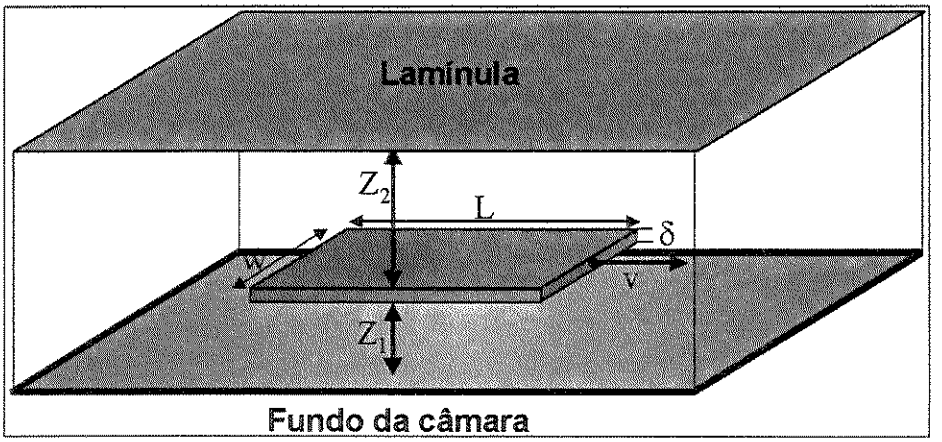


figura 5 - *Modelo geométrico da hemácia na câmara de Neubauer, assumindo a forma da hemácia como de um paralelepípedo. Z_1 e Z_2 representam, respectivamente, distância da hemácia ao fundo da lâmina e ao topo da lamínula na câmara de Neubauer. L, W e δ indicam o comprimento, a largura e a espessura da hemácia e V é a velocidade de arraste.*

Para o cálculo da força hidrodinâmica consideramos um escoamento de Couette e não um escoamento de Stokes devido ao universo a ser estudado apresentar dimensões pequenas. O escoamento de Couette relata o fluxo de um fluido entre duas superfícies causadas pelo movimento de um em relação ao outro. O líquido é ,literalmente, arrastado pela superfície movel. Para superfícies planas paralelas o perfil resultante da velocidade é linear, variando de zero na parede estacionária à velocidade da superfície móvel, assim neste caso existe um gradiente linear de velocidade entre duas placas conforme mostra a figura 6 sendo a força de arraste dada pela expressão:

$$F_{hidro} = \eta \frac{WL}{Z} U \quad ,$$

onde η é a viscosidade do fluido e U a velocidade de arraste.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

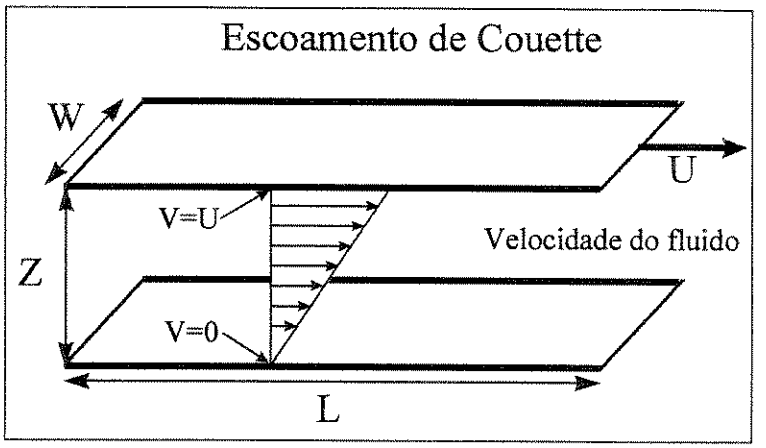


figura 6 - *Gradiente de velocidades em um escoamento de Couette.*

Se, a distância entre as placas se torna muito grande essa expressão perde a validade. Nesse caso o gradiente de velocidade deixa de ser linear e se desenvolve uma camada limite após a qual a velocidade do fluido não muda mais. A distância característica δ dessa camada limite depende da dimensão da placa ao longo da direção da velocidade conforme mostra figura 7 e sua expressão é dada por,

$$\delta = 5\sqrt{\upsilon . x / U} \quad ,$$

onde $\nu = \frac{\eta}{\rho}$ = 0,01 cm^2/s (ρ = densidade da água) e U a velocidade do fluido longe da placa.

Com essa expressão podemos estimar a espessura da camada limite no nosso caso. Para x = L $\approx$ 10 μm e U $\approx$100 μm/s obtemos $\delta \approx$ 1500 μm que é da ordem de 15 vezes maior do que os 100 μm da profundidade da câmara de Neubauer. Se a distância até as paredes é muito menor do que essa camada limite o escoamento de Couette é uma boa aproximação, caso contrário deve-se utilizar um cálculo muito mais complicado para um escoamento de Stokes entre duas paredes.

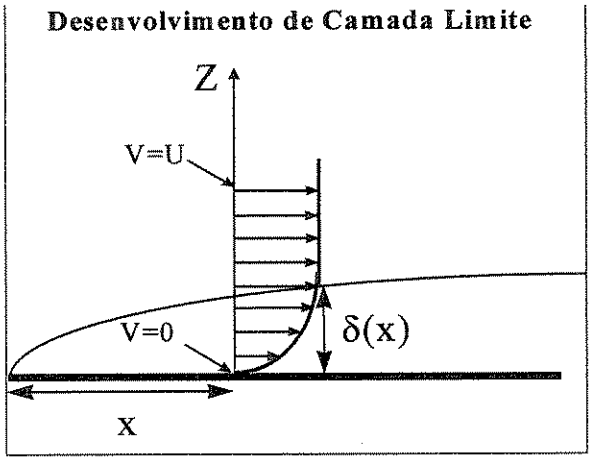


figura 7 - *Desenvolvimento da camada limite*

Considerando a validade do escoamento de Couette, existem quatro superfícies envolvidas: duas da hemácia, uma da lâmina e outra da lamínula. Neste caso a força total nas duas superfícies da hemácia será dada por:

$$F = \eta \; WL\left(\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2}\right) U = \eta \; \frac{WL}{Z_{eq}} U \quad ,$$

onde $\frac{1}{Z_{eq}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2}$.

7.2.2 - ***Modelo para a força elástica***

A célula deforma-se sobre a ação da força hidrodinâmica criando uma força elástica igual e em direção oposta ao movimento. No limite de pequenas deformações a força elástica é proporcional à deformação F = k ΔL, no entanto essa constante da mola depende da geometria e tamanho da hemácia. Para obter um parâmetro intrínseco da hemácia, independente de seu tamanho, observamos o comportamento de molas em paralelo e em série.

Nas molas em paralelo da figura 8 as deformações ΔX são idênticas enquanto a força é aditiva, i.e.:

$$F = K_1 \Delta X_1 + K_2 \Delta X_2 ,$$

como $\Delta X_1 = \Delta X_2 ,$

então $F = (K_1 + K_2)\Delta X_1 \Rightarrow K_{eq} = K_1 + K_2 .$

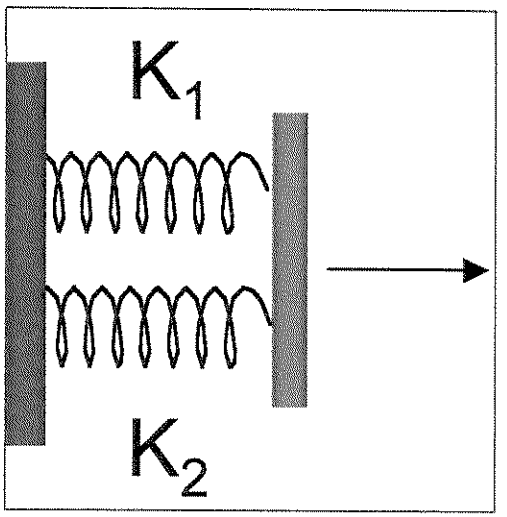


figura 8 - *Exemplo de molas em paralelo com constantes elásticas K_1 e K_2.*

Já para as duas molas em série (figura 9), é a força, ou tração, que é igual nas duas molas enquanto a deformação é aditiva. Neste caso:

$$\Delta X_1 = \frac{F}{k_1} \qquad e \qquad \Delta X_2 = \frac{F}{k_2}$$

levando a $\Delta X = \Delta X_1 + \Delta X_2 = \frac{F}{k_1} + \frac{F}{k_2} = (\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2})\, F$, do qual extraímos a expressão para o k_{eq}: $\frac{1}{k_{eq}} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}$. No caso de $k_1 = k_2 = k$ então $k_{eq} = k/2$.

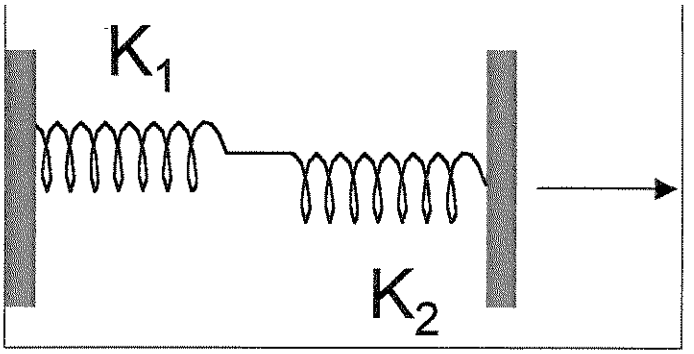


figura 9 - *Esquema de molas em série com constantes elásticas K_1 e K_2.*

Dessa forma percebemos que duas hemácias idênticas, uma ao lado da outra equivalendo a uma hemácia com o dobro da largura, ou uma embaixo da outra, correspondendo à uma hemácia com o dobro da espessura δ, teriam um k duas vezes maior que o de uma das hemácias, ou seja, o k_{eq} deve ser diretamente proporcional à largura x espessura da hemácia. Já duas hemácias em série equivalendo a uma hemácia com o dobro do comprimento teriam um k_{eq} que é metade do k de uma delas, logo o K_{eq} deve ser inversamente proporcional ao comprimento da hemácia. Esse fato pode, então, ser expresso da seguinte forma:

$$\mathcal{F}_{elástica} = \kappa \frac{\mathcal{W}\,\delta}{\mathcal{L}} \Delta\mathcal{L} = \mu \frac{\mathcal{W}}{\mathcal{L}} \Delta\mathcal{L},$$

onde $\mu = \kappa\delta$, supondo δ é constante, é o parâmetro intrínseco que se quer determinar. Esse parâmetro é a elasticidade de uma camada de espessura constante homogênea sujeita à tração, mas vamos denominá-lo por elasticidade aparente por que ele não é idêntico à elasticidade da membrana da hemácia conforme será discutido adiante. Para o propósito de medir as propriedades mecânicas da célula, trata-se de um parâmetro intrínseco das hemácias que pode ser medido e associado à várias condições da mesma.

A medida da pinça óptica é quantitativa, logo, qualquer constante multiplicada infere uma alteração na grandeza numérica, e não no resultado comparativo.

7.2.3 - Modelo do Equilíbrio das forças elástica e hidrodinâmica

No equilíbrio as forças elásticas e hidrodinâmicas são iguais, logo vale a relação:

$$\mu \frac{W}{L} \Delta L = \eta \frac{WL}{Z_{eq}} U$$

portanto:

$$\Delta L = \frac{\eta L^2}{\mu Z_{eq}} U$$ que pode ser re-expresso como:

$$L = L_0 + \frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} U$$

Este modelo, então, prediz que o comprimento da hemácia será proporcional à velocidade do fluído, e que a inclinação da reta L vs U, depende da viscosidade do fluido η, do comprimento da hemácia ao quadrado, da elasticidade aparente e da altura Z equivalente em relação ao fundo da lâmina dada por $\frac{1}{Zeq} = \frac{1}{Z} + \frac{1}{(d-Z)}$, onde d é a profundidade da lâmina. Medindo a inclinação dessa reta, conhecendo a viscosidade, o comprimento da hemácia e o Z_{eq} podemos obter o valor de μ . O comprimento L_o é medido diretamente através da imagem obtida na câmera do microscópio. Para a obtenção do Z_{eq} é necessário se focalizar o fundo da lâmina e depois subir o foco graduado em microns até a altura desejada, todo este processo controlado por computador. Já a viscosidade do plasma é medida com viscosímetros calibrados.

7.3 - Validação Experimental do Modelo Utilizado para medida das propriedades mecânicas da Hemácia.

O primeiro teste para validação do modelo é o comportamento linear do comprimento da hemácia em função da velocidade de arraste. Estudos prévios realizados

por Huruta et al (1998) analisando mais de 3000 células normais demonstraram a alta reprodutibilidade do método. A figura 10 mostra o comportamento linear encontrado pelo modelo. Apesar de importante esse é um teste pobre para validação definitiva do modelo por dois motivos: (1) toda função com primeira derivada contínua pode ser aproximada por uma reta para um intervalo pequeno de seu argumento e (2) o comportamento linear é uma aproximação até mesmo no contexto do modelo utilizado, pois L em uma dada velocidade foi aproximado por L_o.

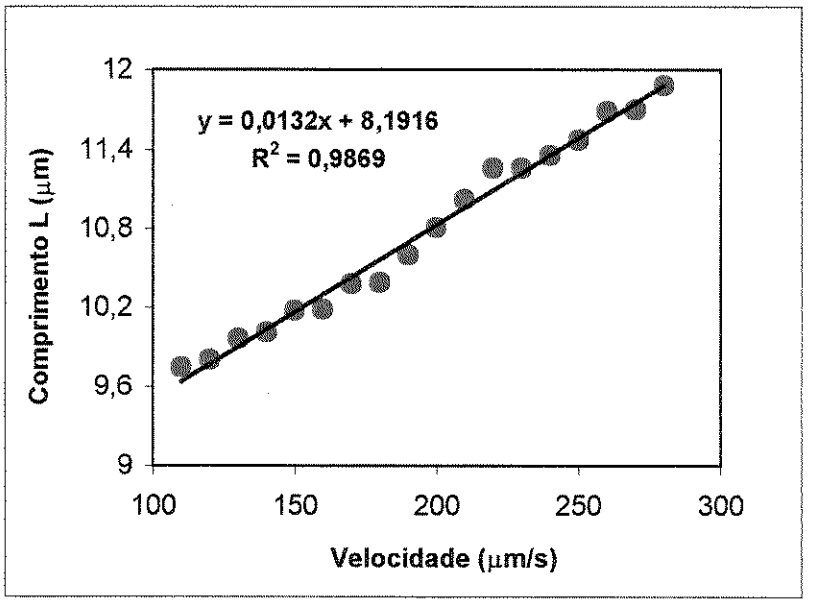


figura 10 - *Deformação da hemácia em função da velocidade (Huruta et al., 1998).*

Um teste de validade muito mais restringente é o comportamento da inclinação da reta em função da altura equivalente (Z_{eq}). A função $\frac{1}{Zeq} = \frac{1}{Z} + \frac{1}{(d - Z)}$ tem um comportamento assimptótico estranho, divergindo para infinito quando Z tende a zero e Z tende a d = 100 μm. Nesses casos a hemácia estaria colada no fundo da lâmina ou da lamínula. A figura 11 mostra o comportamento da inclinação da reta em função da profundidade Z junto com o ajuste da expressão para Z_{eq} prevista no modelo. A boa concordância entre os resultados experimentais e a expressão para Z_{eq} é o principal teste de validade do modelo utilizado.

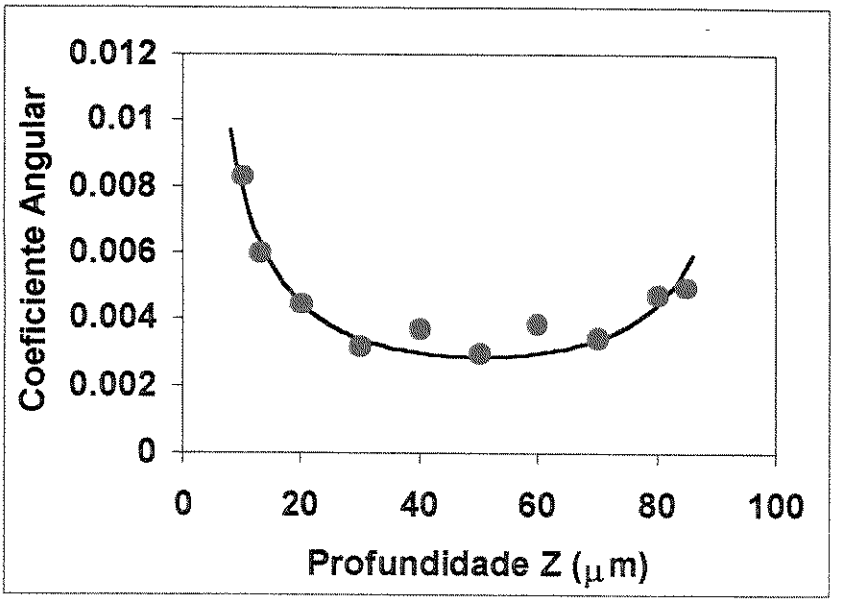


figura 11 - *Coeficiente angular da deformação da hemácia em função da profundidade Z.*

O modelo acima se aplica ao caso estacionário, no qual a somatória das forças que atuam na célula é nula. Porém tanto nos estágios iniciais, antes de completar-se a deformação, quanto nos finais, antes de retornar completamente à morfologia inicial, tem-se uma situação dinâmica onde não existe equilíbrio de forças. No caso em que a membrana está se movendo junto com o citoplasma tem-se que considerar a viscosidade interna da membrana e do plasma sangüíneo. Esta situação já foi estudada, mostrando que ela é equivalente ao movimento de um sistema massa-mola superamortecido, no qual em lugar de oscilar, a mola retorna à situação de equilíbrio segundo uma exponencial decrescente do tempo da forma (figura 12):

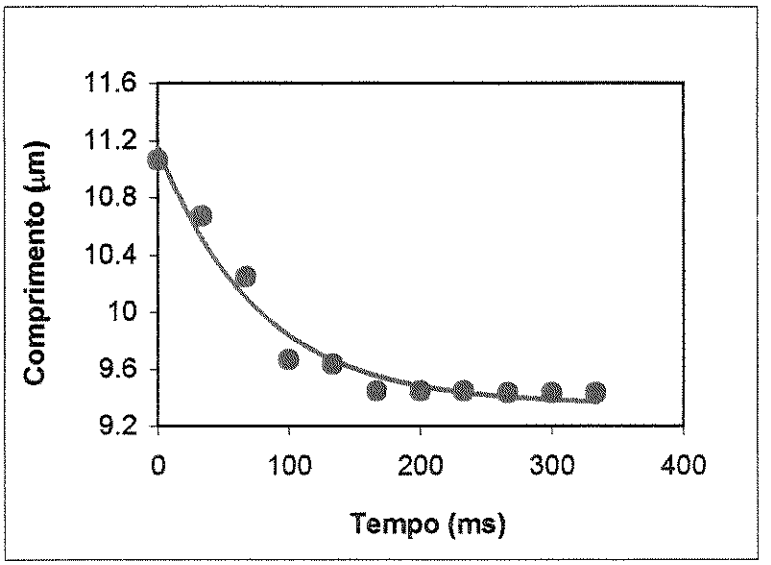


figura 12 - *Deformação da hemácia em função do tempo segundo* $L = L_o e^{-\frac{t}{\tau}}$

O tempo de retorno $\tau = \frac{\eta_{membrana}}{\mu}$, onde $\eta_{membrana}$ é a viscosidade interna da membrana e μ a sua elasticidade. Hochmuth *et al* mostraram que as viscosidades do citoplasma e do plasma são desprezíveis comparadas com a viscoelasticidade da membrana para efeitos rápidos, na escala de centenas de milisegundos. Esse tempo de retorno τ é uma propriedade intrínseca da membrana, totalmente independente de sua geometria. Conclui-se então que podemos obter $\eta_{membrana}$ e μ separadamente (Hochmuth et al., 1979). Medindo-se a deformação em função da velocidade obtemos a elasticidade μ e medindo-se o tempo de retorno τ obtemos a razão viscosidade/elasticidade (η/μ) da membrana. Vale ressaltar que ambas as medidas são realizadas em uma mesma hemácia.

A padronização do método, conforme exposto acima, assumindo o modelo de uma hemácia na forma de um paralelepípedo, permitiu a obtenção de resultados surpreendentemente bons.

7.4 - Grandeza medida pela pinça óptica

A grandeza medida com essa técnica pode ser denominada "elasticidade aparente" ou "elasticidade total" da hemácia em lugar de elasticidade da membrana da hemácia que

é uma grandeza bem definida. Isso porque esta técnica analisa a estrutura da hemácia como um todo e não apenas a elasticidade intrínseca de sua membrana. Um exemplo que mostra a diferença entre os dois casos pode ser visualizado através da figura 13 (a) e (b). Considere duas folhas de papel idênticas, uma dobrada e outra não, cujo comprimento em função da força F aplicada é observado de cima, de onde se percebe apenas sua projeção vertical. A deformação do papel dobrado será muito maior do que a do papel não dobrado, embora os dois sejam feitos do mesmo material. A elasticidade intrínseca do papel seria medida no papel não dobrado enquanto no dobrado se mede uma elasticidade aparente, muito menor do que a intrínseca. Note no caso do papel dobrado que o comprimento medido é uma projeção vertical do comprimento total do papel. Pode existir uma variação de comprimento aparente sem qualquer variação do comprimento, ou área, real do papel, apenas através de rotações ao longo das dobras. Só depois de esticar completamente a folha atingiríamos a situação em que a deformação da folha dependeria apenas da elasticidade real do papel.

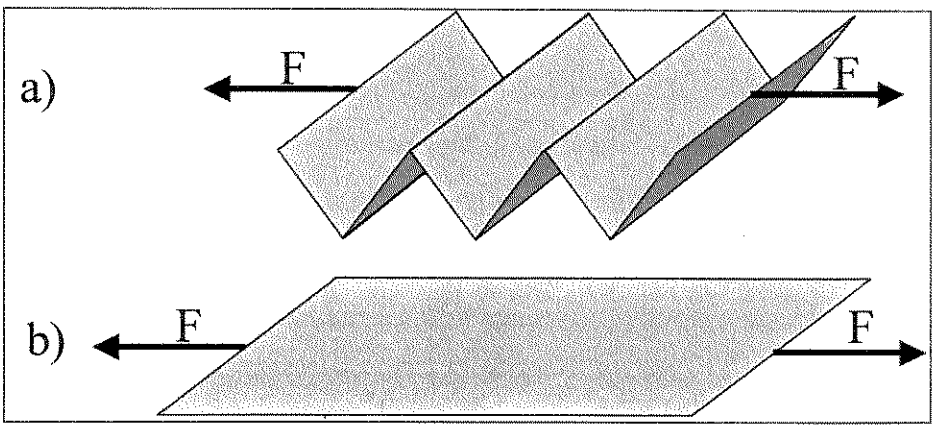


figura 13 - *Folhas de papel, dobrada e não dobrada, submetidas a uma tração F. A deformação no comprimento da folha dobrada será dada pela elasticidade aparente e é muito menor que a elasticidade intrínseca da folha de papel medida com a folha não dobrada.*

O modelo da folha dobrada também permite discutir efeitos de histerese na medida da elongação. Suponha que algumas proteínas simbolizadas pelas molas na figura 14 mantenham a folha dobrada. Ao esticá-la quebram-se algumas dessas ligações. Nesse caso a hemácia não retornaria à mesma situação inicial após o desaparecimento da tração que a deformou. Teríamos atingido o limite plástico da hemácia.

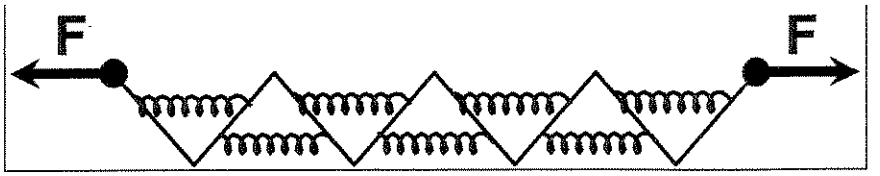


figura 14 - *Modelo da ação da histerese*

A elasticidade intrínseca pode ser medida usando o método da pipeta (Evans and La Celle, 1975). Nesse método suga-se a membrana da hemácia através de um capilar com raio interno dado com uma diferença de pressão conhecida. Observando a elongação da hemácia em função da diferença de pressão pode-se calcular sua elasticidade (figura 15).

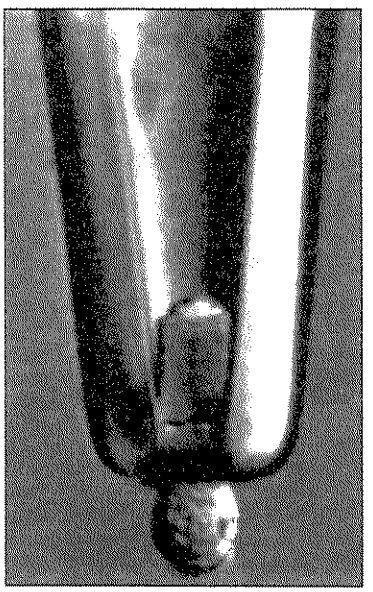


figura 15 - *Foto da pipeta aspirando uma hemácia. Nota-se que todo conteúdo intracelular está do lado de fora da pipeta.*

Entretanto, na corrente sanguínea, é a elasticidade aparente da hemácia o fator principal que possibilita a mesma transpor vasos com dimensões menores do que seu diâmetro. Além disso, a elasticidade aparente é muito mais sensível à influência de fatores externos, como pressão osmótica ou presença de drogas, do que a elasticidade de sua membrana. No limite de tracionamento da hemácia, correspondendo à situação em que a folha dobrada se desdobrou completamente, as duas medidas de elasticidade devem coincidir. Isso sugere que a técnica de medida com pinça óptica é mais adequada para

caracterizar patologias das hemácias. Outra vantagem dessa técnica, além de sua sensibilidade, é sua individualidade, medindo hemácia por hemácia. Considere um indivíduo com distúrbio hereditário ou adquirido que altere as propriedades das hemácias. É esperado que a maioria de suas hemácias apresentem comportamento normal ou muito próximo deste, uma vez que as mais alteradas tendem a ser destruídas. Isso tende a trazer os valores médios dessas propriedades para dentro da faixa de normalidade diminuindo a sensibilidade de técnicas capazes apenas de observar grandezas estatísticas como tamanho médio ou fração de hemácias destruídas após passagem por parede porosa. A característica da doença pode ser a presença de hemácias completamente fora da região de normalidade que deixaria de ser percebida pelas técnicas não individuais. Por outro lado, as medidas individualizadas devem ser feitas em grande número de hemácias para diminuir a probabilidade de erro amostral. No início desse trabalho, quase todo o procedimento de medida era manual, lento e que só permitia a obtenção de um número razoável de dados através de trabalho intensivo. Percebendo a importância da velocidade de aquisição de dados para análise estatística, decidimos devotar grande esforço na automatização do procedimento, para o qual trabalhamos com o software LabView, ideal para a interface hardware/software. Foi fundamental, portanto, para os resultados dessa tese, o trabalho desenvolvido na automatização do procedimento de medidas.

8 - Objetivos do trabalho.

Em vista do exposto, é objetivo principal deste trabalho verificar a aplicação da técnica de pinça óptica para o estudo das propriedades mecânicas das hemácias.

Outros objetivos deste trabalho:

1. Aperfeiçoar e adaptar a técnica de medida das propriedades mecânicas celulares, por pinça óptica, através da produção de novos softwares de análise e controle, tornando assim esta medida possível de realização em laboratório, em menor tempo e com maior acuidade dos resultados;
2. Analisar as propriedades mecânicas de células vermelhas anormais;
3. Verificar a aplicação da pinça óptica para o estudo de populações de hemácias estocadas para doação de sangue e submetidas a diferentes condições.

9 - Metodologia do Procedimento de Medida

9.1 -Montagem do aparato da pinça óptica

A pinça óptica consiste em um feixe de laser Nd:YAG, *Neodimium Yttrium Alluminum Garnet,* (λ = 1064) (figura 16) fortemente focalizado sobre o material de estudo através de uma objetiva de 100x (abertura numérica 1.25) de um microscópio com sistema de captura de imagens acoplado (figura 17) e um sistema eletrônico de controle tanto do movimento como do foco (figura 18).

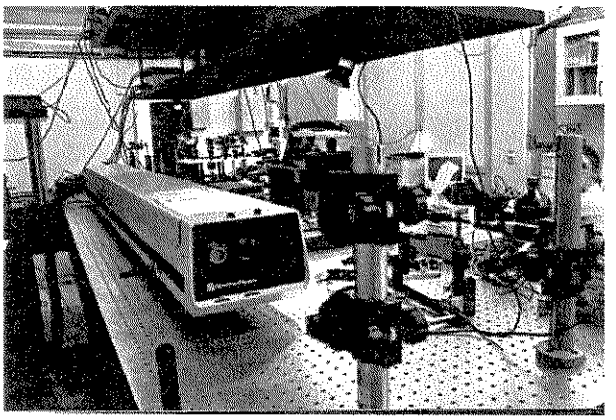


figura 16 - *Laser de ND:YAG e aparato da pinça óptica.*

Um aparato de lentes e espelhos guiam o feixe do laser da fonte até a entrada no microscópio, possibilitando a medição da potência do laser e correção do plano focal do laser.

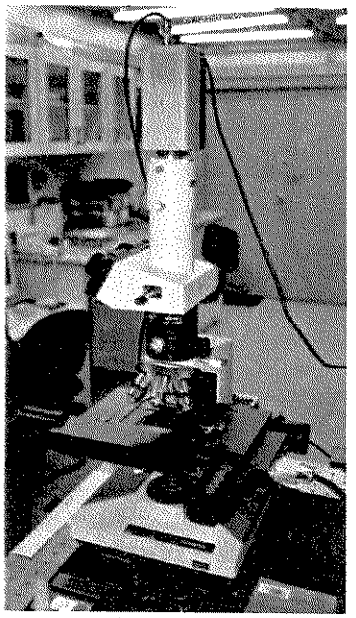


figura 17 - *Microscópio utilizado na pinça óptica com as objetivas, câmera CCD para gravação e controlador de movimento eletrônico*

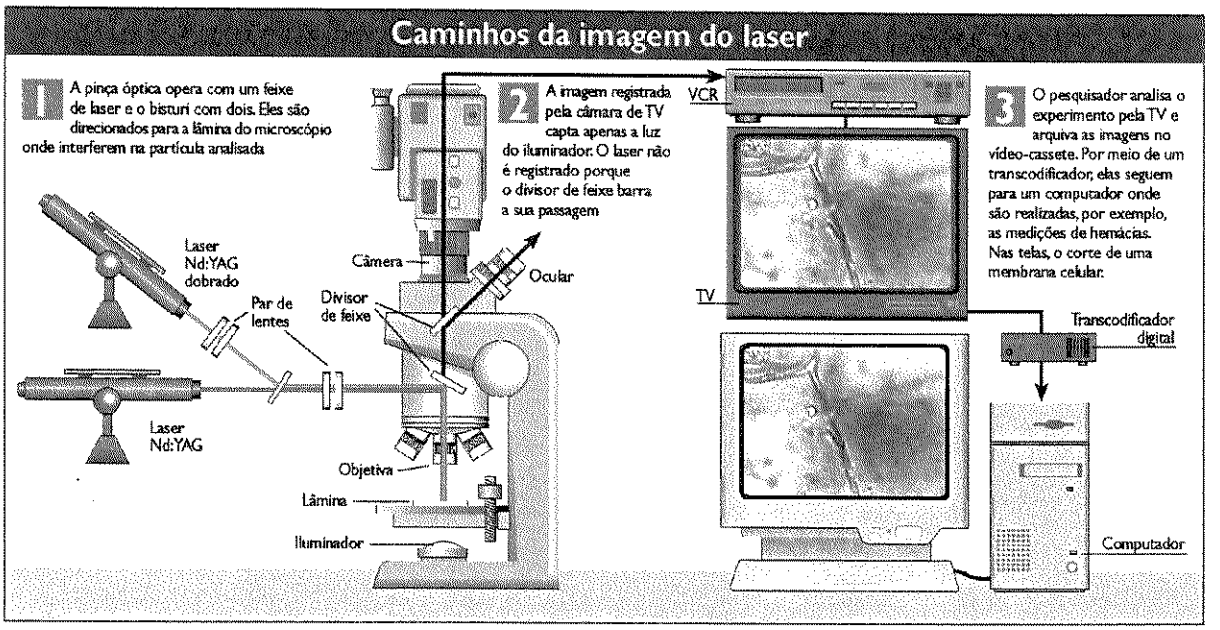


figura 18 - *Esquema de montagem da pinça óptica de feixe simples, cortesia Revista Pesquisa FAPESP.*

Para ajuste do plano focal do laser e óptico, este feixe deve passar por um conjunto de duas lentes que funcionam como um telescópio (figura 19). Sem estas, o foco do laser não iria coincidir com o foco óptico, impossibilitando assim a visualização da captura. As imagens da captura são, primeiramente adquiridas por um sistema VHS de imagem e

posteriormente são digitalizadas para análise. O movimento da câmera de Neubauer é feito através de um sistema eletrônico de translação controlado por um software desenvolvido especificamente para este fim.

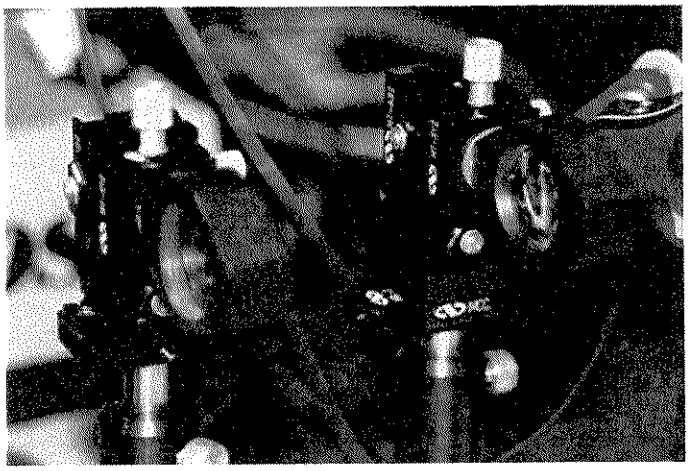


figura 19 - *Lentes de correção dos planos focais.*

9.2 -Dano térmico causado pelo laser

Para os trabalhos iniciais com a pinça óptica foram utilizados um laser de argônio que emitia um feixe no espectro visível (λ = 514 nm). Devido ao alto coeficiente de absorção da radiação no comprimento de onda visível, este causava danos e morte aos indivíduos analisados (Ashkin and Dziedzic, 1987). Para se contornar este problema utiliza-se um laser de ND:YAG, operando na faixa do infravermelho. Como a maioria das substâncias que compõe o ser vivo são transparentes a este comprimento de onda, a absorção nessa região do espectro de luz é pequena não causando grandes danos ou alterações significativas às estruturas celulares analisadas (figura 20), ainda mais, a potência utilizada na armadilha óptica é muito baixa da ordem de 85 –100 mW. Mesmo com essa potência diminuta é possível geral uma força da ordem de piconewtons, considerável na escala microscópica.

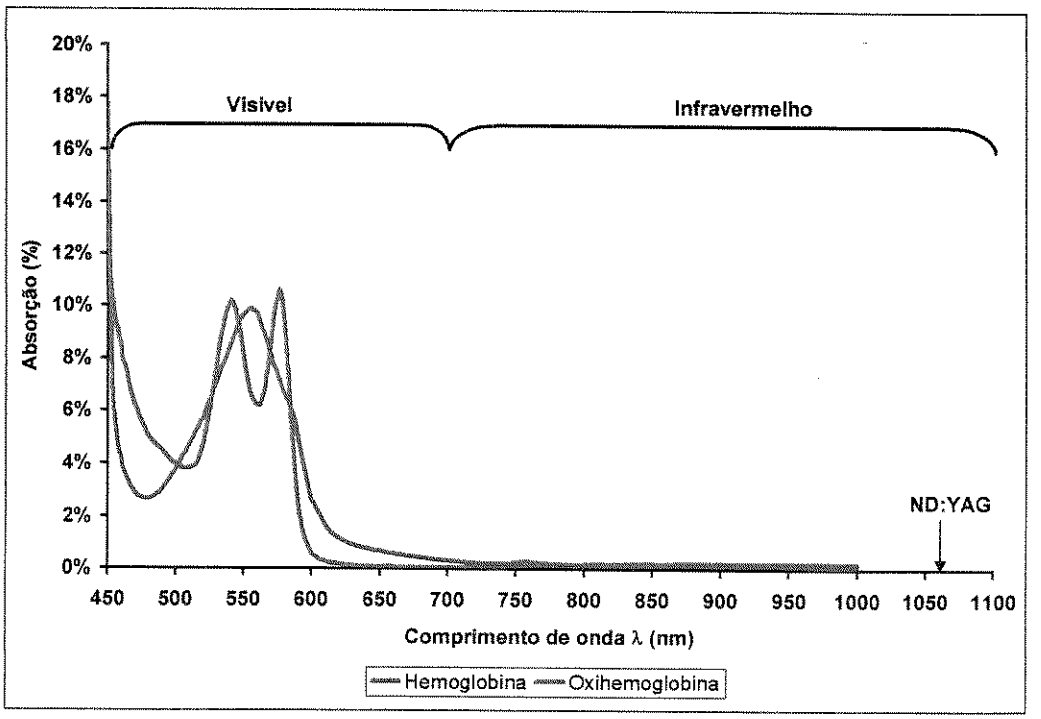


figura 20 - *Gráfico da absorção de luz em relação ao comprimento de onda.*

9.3 -Medida da viscosidade do plasma

Para determinarmos a viscosidade do plasma foi utilizado o viscosímetro de Ostwald a seguinte relação:

$$\frac{\eta}{\rho} = Bt$$

onde t é o tempo requerido para o líquido percorrer a distância de a até b (figura 21), p é a densidade do liquido, *B* é uma constante do viscosímetro que deve ser determinada através da calibração feita com um liquido conhecido (água ou álcool) , e η é a viscosidade.

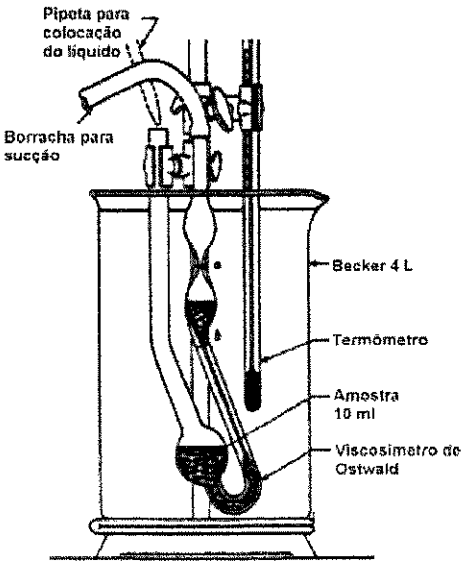


figura 21 - *Esquema do Viscosímetro de Ostwald*

9.4 -Software de controle do experimento.

O programa de controle dos experimentos da pinça óptica foi totalmente escrito em LABVIEW versão 6 (figura 22). O Labview é um sistema gráfico de programação tanto da interface como dos comandos de controle de equipamentos. Todo o experimento de corrida, bem como a configuração e sistemas de segurança do laser são gerenciados pelo aplicativo produzido para este projeto.

Com este novo aplicativo foi facilitada a realização dos experimentos, uma vez que não é necessário digitar linhas de comando para execução das funções do controlador de movimento e, ainda, pode se controlar diversos outros fatores durante a corrida do experimento tais como: aceleração inicial, sistema de aborto de corrida e gerenciamento de erros do controlador. Este último um fator importante para a manutenção do equipamento e diminuição da despesa com manutenção das câmaras de Neubauer e Objetivas do microscópio.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

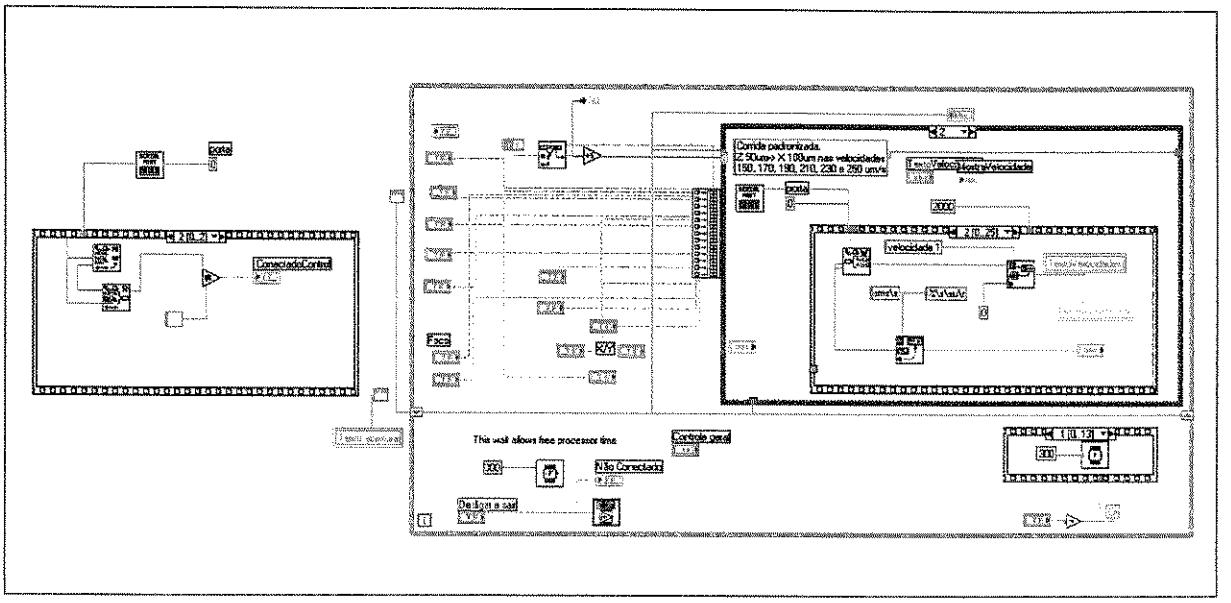


figura 22 - *Tela de programação do novo sistema de controle da pinça óptica*

Outras características foram implantadas nesta interface de controle dos experimentos:

- Escolha do tempo de parada entre as velocidades, facilitando a marcação para aquisição das imagens (figura 23 a);
- Programa de escolha aleatória das células;
- Configuração da aceleração das células no início de cada velocidade (figura 23 a);
- Aperfeiçoar o sistema de comunicação e configuração do microcontrolador (figura 24);
- Configurar individualmente cada velocidade, tornando assim possível a utilização do mesmo software para diferentes aplicações na pinça óptica (figura 23 a);
- Um *feedback* de informações do microcontrole. Todo comando enviado para o microcontrole gera uma resposta, assim podemos saber se todos os comandos estão sendo executados corretamente (figura 23 b)
- Um sistema de LOG onde todos os dados dos experimentos são gravados, sendo possível checar estes dados em caso de dúvida. São gravados: Nome do operador, Data e hora de cada corrida, padrões de configuração do microcontrole e resposta do *feedback*.

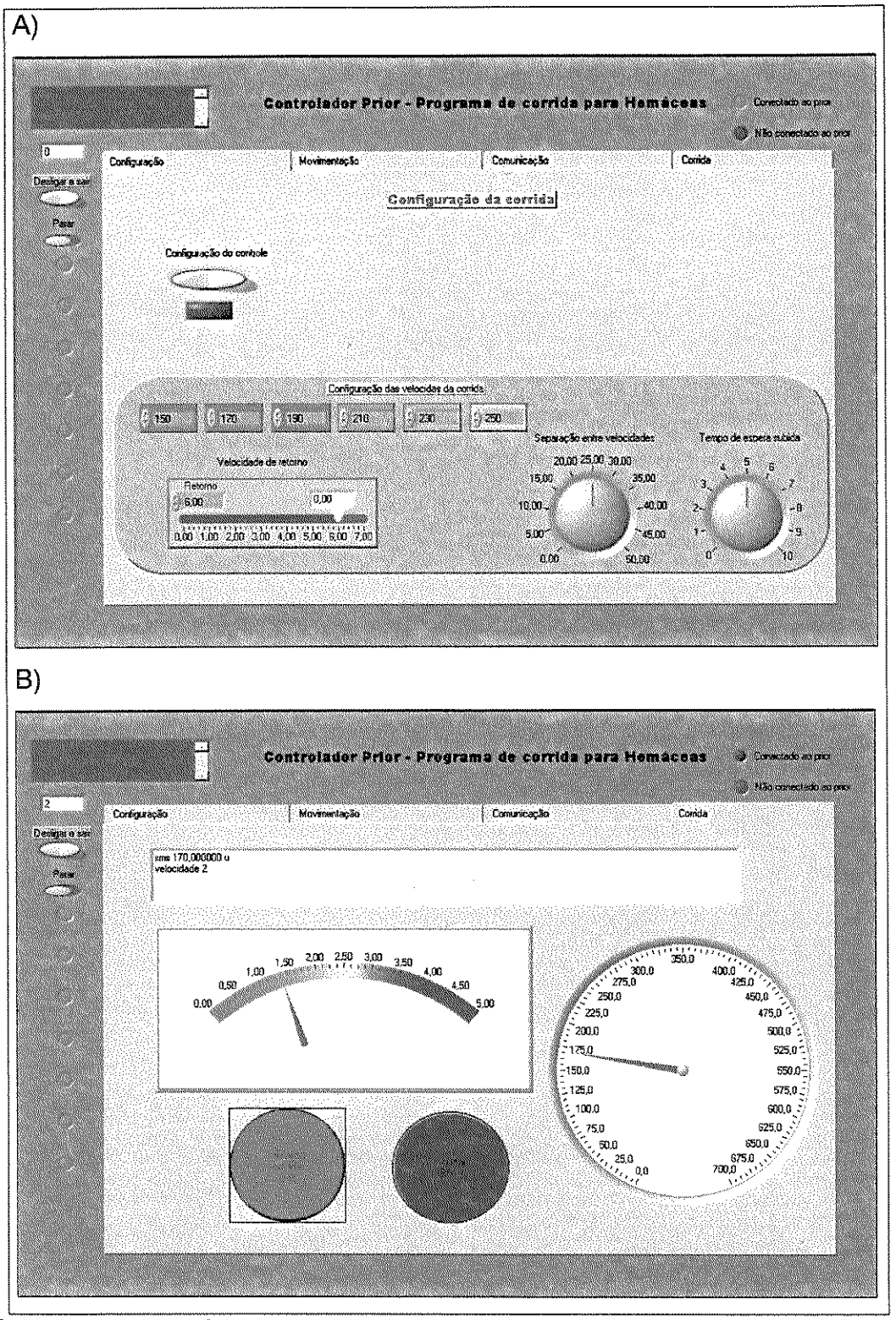


figura 23 - *a)Tela de configuração das corridas que compreendem os experimentos; b) Tela de controle e acompanhamento dos experimentos e sistema de feedback.*

UNICAMP

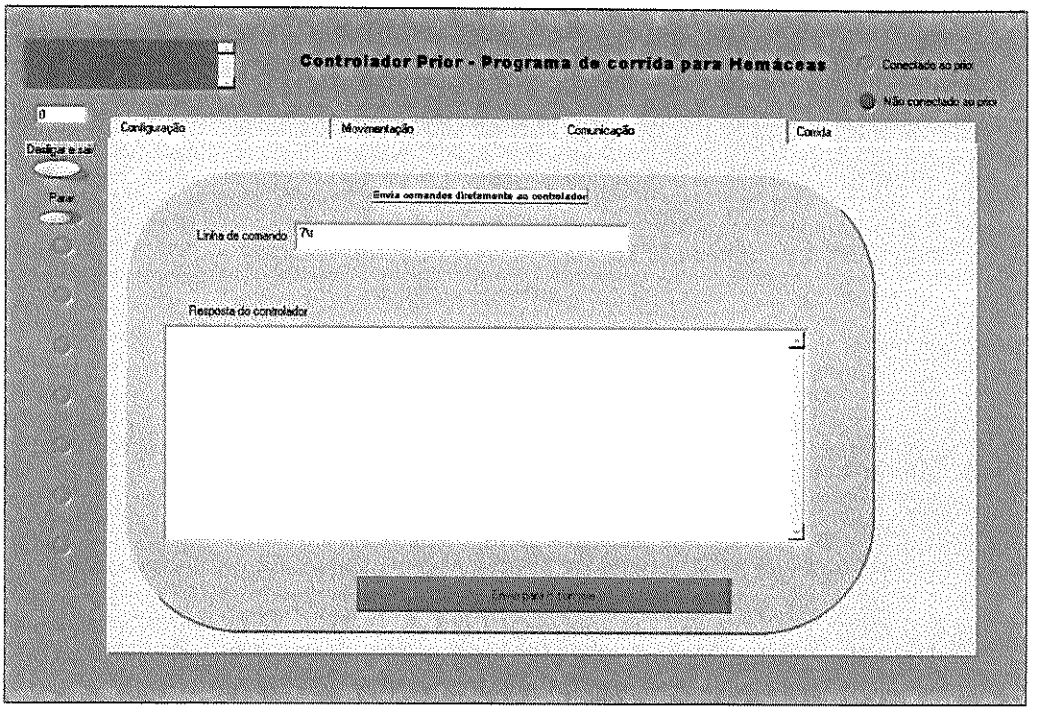


figura 24 - *Tela de envio de comandos para o microcontrolador*

9.5 -Preparação do Laser e aquisição dos dados.

Uma vez focalizado o fundo da câmara de Neubauer (figura 32) uma célula era escolhida aleatoriamente e pinçada pelo laser, neste momento é então iniciada a "Seqüência de análise e aquisição" comandada pelo software.

Nos primeiros experimentos a corrida da célula contra o plasma era realizada em movimentos de vai e vem, mas o comportamento celular variava em relação à direção tomada pelo controlador de velocidade. No experimento padronizado as velocidades são aplicadas apenas em uma direção, melhorando assim a aquisição dos dados e o comportamento do Gráfico. O gráfico abaixo (figura 25) ilustra o comportamento de uma mesma célula controle. A diferença no comprimento celular inicial é esperada uma vez que a mesma célula foi utilizada nos dois tipos de corrida, e nem sempre é possível escolher o mesmo campo para a captura das imagens.

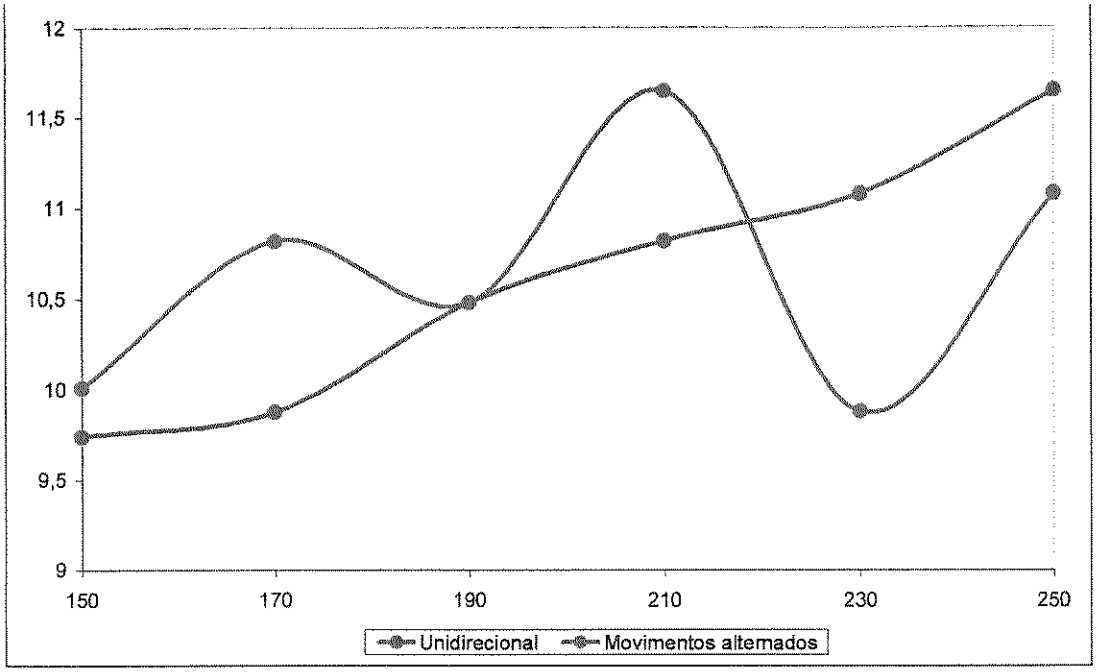


figura 25 - *Gráfico representando o comportamento anormal das células quando a corrida é aplicada em movimentos alternados. (Velocidade μm/s x Comprimento μm)*

Deste modo, foi padronizado que a corrida dos experimentos seria feita em somente uma direção, não importando se esta fosse para o sentido direito ou esquerdo. Esta escolha é feita pelo aplicativo de controle que mede a distância necessária para a corrida e evita que a célula, durante o experimento, saia do campo central da câmara.

No ponto central é escolhida uma célula qualquer, é então disparado o laser e a célula pinçada é suspensa a 50μm do fundo da câmara. Esta é arrastada contra o plasma em seis velocidades que variam de 150 μm/s a 250 μm/s, com acréscimo de 20 μm/s e uma parada de 400 – 600 milisegundos entre cada velocidade. A cada velocidade, a célula é arrastada por 180 μm. Destes, os primeiros 70 a 100 μm são utilizados para aceleração e os 4 a 6 últimos para desaceleração, assim temos pelo menos 70μm onde a célula atinge sua elongação máxima naquela velocidade, facilitando a captura das imagens. Todos os movimentos da célula são gravados em VHS, para posterior aquisição.

Após a última velocidade dá-se início a fase na qual a célula é libertada da armadilha óptica, fechando-se o obturador do laser.

A pinça então, livre de célula, volta para o ponto de origem e executa a escolha de um ponto aleatório na câmara para a captura da célula seguinte. O software escolhe uma região da lâmina com uma distância mínima de 5 a 10μm do ponto de origem da última

célula pinçada. Neste novo local, caso não existam células no campo, outro campo é escolhido mantendo a área de exclusão mencionada. Esta nova escolha do campo, bem como o posicionamento da armadilha óptica exige a intervenção do usuário. Com a integração de aquisição de imagens ao aplicativo de controle será possível controlar esta fase diretamente do aplicativo de controle do experimento.

O tempo decorrido entre o aprisionamento e a liberação da célula é de 18 segundos. Foi observado que as células normais podem ficar aprisionadas pelo laser por um período de até 1 minuto e 20 segundos sob uma potência de 80 mw, após o qual a célula é deformada. Este tempo pode ser bastante estendido caso não haja a necessidade de ser movimentar a célula, pois pode se diminuir a potência do laser.

9.6 - Captura das imagens

As imagens dos experimentos são gravadas em vídeo VHS de alta resolução sendo depois digitalizadas através do software Adobe Premiere por processo de captura de quadros (Stop motion), com isso é possível escolher o melhor quadro para a realização das análises levando se em conta a padronização do campo de captura. Deve se tomar cuidado em adquirir as imagens na região do terço final de corrida onde as hemácias já atingiam sua elongação máxima para aquela velocidade (figura 26). As medidas do comprimento celular em repouso e nas diferentes velocidades foram analisadas, utilizando-se o Software Image Pro-Plus (figura 27), e os cálculos foram realizados numa planilha do EXCEl.

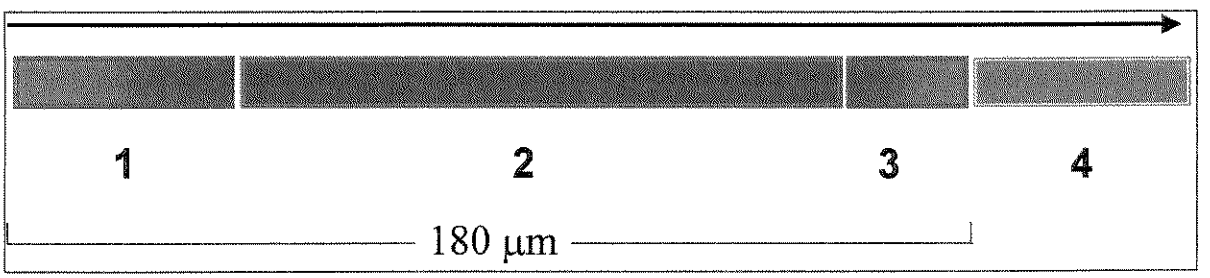


figura 26 - *Esquema de uma velocidade do experimento. O quadro 1 indica a área de aceleração, 2 = local onde as células atingem o elongamento máximo (melhor local para aquisição das imagens para análise), 3 desaceleração e 4 pausa entre velocidades. A seta indica o sentido do movimento.*

As primeiras medidas deste projeto foram feitas manualmente, somente após a produção de um conjunto de macros, do próprio Image Pro-Plus, foi possível realizar a medida automática das imagens capturadas. Com a automatização da medida foi possível aumentar a quantidade de células pesquisadas por experimento, sendo que a medida manual só era realizada nas células que apresentassem distorções focais ou baixo contraste. Outra vantagem importante foi que com a automatização das medidas, o tempo de análise foi enormemente diminuído, podendo-se analisar até 8 células por minuto.

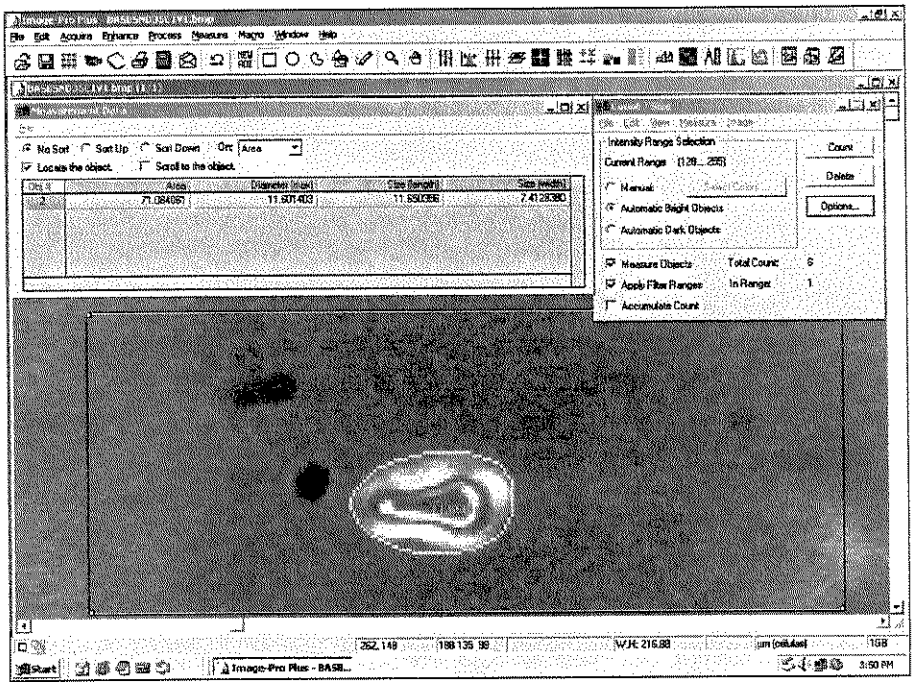


figura 27 - *Image Pro-plus com o sistema de medida automática das variáveis celulares.*

A medida manual foi uma das maiores dificuldades na análise dos dados deste projeto, por ser muito demorado e dispendioso medir célula por célula em duplicata para uma melhor aferição da medida. Cada célula demorava, em média, de 2 a 3 minutos para ser medida. Com a automatização, a medida do comprimento e largura celular é a média de 50 medidas, e o resultado individual não leva mais do que poucos segundos para ficar pronto. Após a realização de cada medida os dados são enviados automaticamente para a planilha de cálculo do Excel.

9.7 -Planilhas de Cálculos

Para agilizar a realização dos cálculos foi desenhada uma planilha onde todas as fórmulas para os cálculos estão prontas e formatadas para análise, apenas a inserção das medidas de cada célula foi necessária (figura 28 e figura 29).

Após medida das células os dados são exportados para a planilha automaticamente pelo software de medição (Image Pro-Plus). As planilhas foram escritas em Visual Basic utilizando-se a plataforma Microsoft Excel.

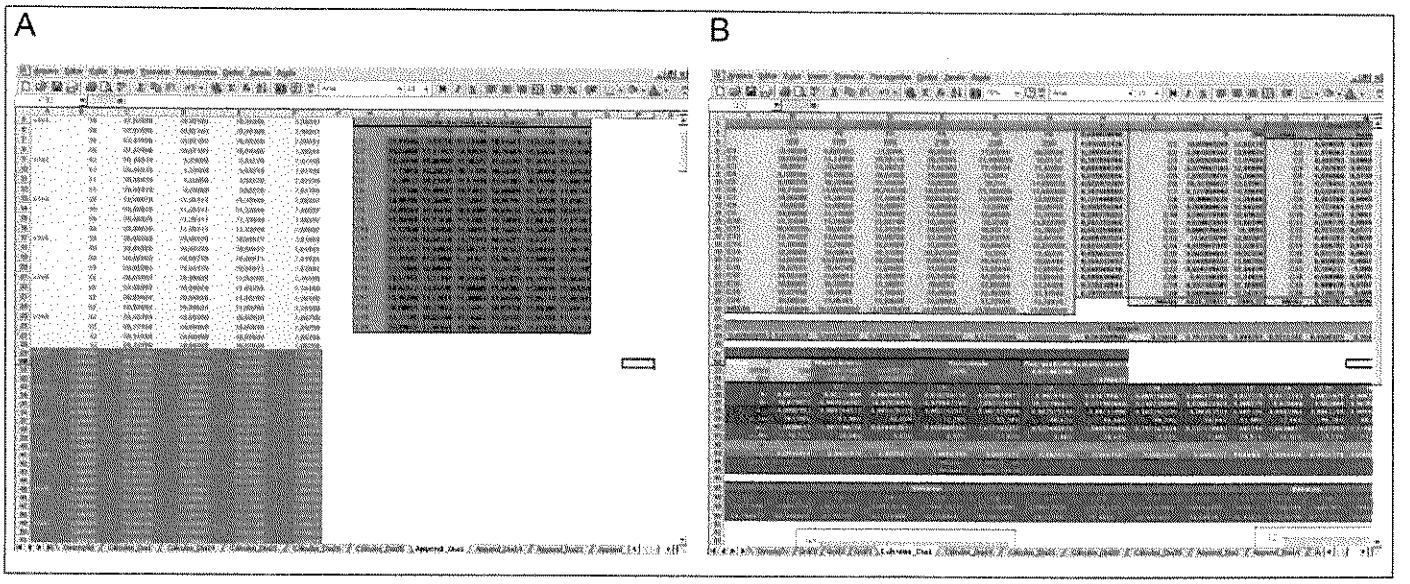


figura 28 - *Planilhas de cálculos. A – Tabela de importação dos dados; B – Tabela de cálculos e resultados*

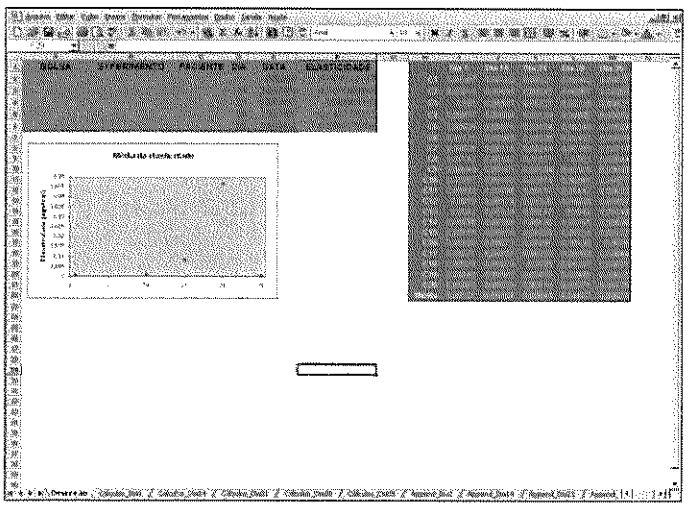


figura 29 - *Tabela de Resumo dos resultados.*

Os dados são então enviados para um banco, e estão prontos para a análise estatística.

10 - Metodologia para o estudo da deformabilidade

Os experimentos foram realizados no laboratório de Pinças Ópticas aplicadas a Biomedicina do Departamento de Eletrônica Quântica do Instituto de Física da UNICAMP.

10.1 - Casuística

Foram selecionados para o estudo 7 pacientes com esferocitose hereditária, 20 pacientes homozigotos para anemia falciforme sendo 5 em crise falcêmica (HbSS/CF), 15 em fase estável (HbSS) e, destes, 5 utilizavam medicamento hidroxiureia (HbSS/HU) por pelo menos 6 meses. Foram também selecionados 3 pacientes com anemia ferropriva, 10 portadores de traço falciforme (HbAS). Foram também estudadas 20 bolsas de doação de sangue sendo 7 de heterozigotos para hemoglobina S, 3 bolsas irradiadas com 25 Gy de radiação gama (γ-rad) para uso em imunossuprimidos e 10 bolsas de controles normais. Participaram também do estudo 90 controles normais (Tabela 2 -).

A coleta de sangue foi realizada no Hemocentro da UNICAMP com a autorização dos pacientes ou doadores de sangue, dependendo do experimento. A coleta de sangue dos pacientes era realizada no dia de ambulatório de Hematologia do Hemocentro. Eram considerados fatores de exclusão, presença de infecção ou febre e uso de medicamentos como aspirina, descongestionante nasal ou antiinflamatório.

Os pacientes selecionados tinham duas amostras de 5 ml de sangue colhidas em tubos Vacuntainer contendo EDTA, uma das quais era enviada para realização de hemograma completo e confirmação do tipo de Hemoglobinopatia, a outra para o experimento com o laser pelo sistema de duplo cego. Em todos os experimentos realizados com células de pacientes ou doadores era feito um experimento com sangue controle. No caso do estudo das bolsas de doação, o sangue seguia todos os padrões de coleta e controle de qualidade comumente aplicados às bolsas de doação captadas pelo Hemocentro da UNICAMP.

Tabela 2 - *Casuística apresentada neste projeto.*

Condição celular	N	NC
Participantes		
Esferocitose	7	140
Crise falcêmica	5	180
Anemia Ferropriva	3	116
HbSS	10	265
HbSS/HU	5	100
HbAS	10	238
Controles	90*	6254
Bolsas de doação		
HbAS	7	210
Irradiadas	3	69
Controles	10	400
		7972

N – número de casos; NC – Número de células analisadas; HbSS – Homozigoto para anemia falciforme; HbSS – Homozigoto para anemia falciforme tratado com hidroxiuréia; HbAS – Heterozigoto para anemia falciforme; * inclui controles utilizados na fase de montagem e calibração da pinça.

As bolsas de sangue eram guardadas em câmara fria com temperatura controlada (4°C) por até 35 dias. Durante este período eram feitas coletas nos dias 1 (dia da coleta do sangue), 14, 21, 28 e 35 para análise na pinça óptica. Esta coleta era feita retirando-se cerca de 10 cm do tubo de conexão (espaguete) da bolsa através de um sistema de coleta estéril automatizado (figura 30).

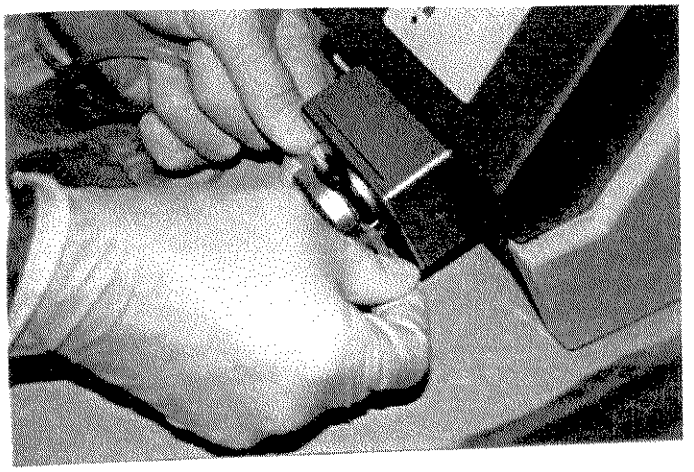


figura 30 - *Coleta da amostra de bolsa de doação através do "sterile collector".*

Alguns cuidados no transporte e acondicionamento do sangue eram tomados:

a. As bolsas de doação eram mantidas a 4°C,
b. O tempo máximo decorrido entre a coleta e o início dos experimentos não ultrapassava 2 horas,
c. Os tubos de coleta não eram centrifugados, apenas deixava se decantar por ação da gravidade,
d. No momento da coleta, as bolsas de sangue eram levemente homogeneizadas,
e. Os tubos de coleta não eram expostos ao sol ou refrigerados,
f. A diluição do sangue no plasma somente era feita no laboratório de Pinça Óptica momentos antes de se iniciar o experimento,
g. A solução de plasma e sangue era trocada a cada 5 minutos de exposição ao laser e à luz do microscópio ou a cada 10 células analisadas.

As células para análise eram diluídas em plasma humano AB + fresco com viscosidade conhecida (1,615 a 1,623 poise), para se evitar a ação de antígenos sobre as células, na proporção de 0,5 μl de concentrado de hemácias para 1000μl de plasma (figura 31).

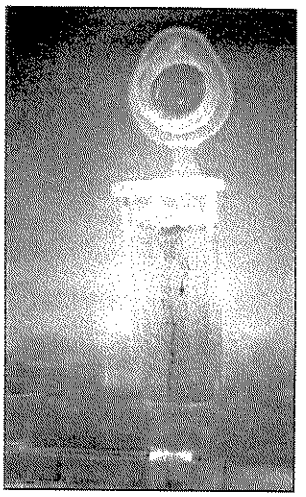


figura 31 - *Sangue diluído em plasma AB Humano.*

Desta solução, 13μl eram colocados em uma câmara de Neubauer e cobertos por lamínula. O aparato de observação (Câmara, solução de hemácias e lamínula) era então colocado no microscópio e focalizado o fundo da câmara com a objetiva de 100x de aumento. Para calibração do aplicativo de controle do experimento devia se posicionar o foco do microscópio na região central da área de contagem representada pela letra E na figura 32 .

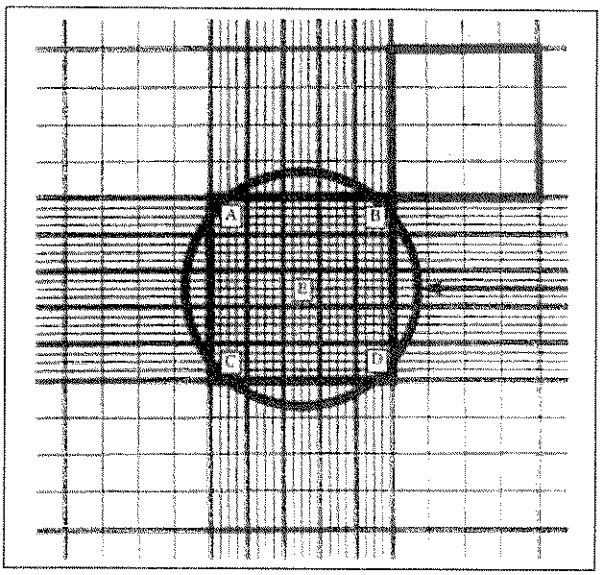


figura 32 - *Esquema do hemocitômetro manual (Câmara de Neubauer).*

Todas as variáveis controladas pelo software eram dependentes desta calibração, em especial a posição no eixo Z do movimento. Uma calibração errada poderia quebrar a

câmara de Neubauer ao forçá-la contra a objetiva do microscópio. Outra característica importante era o correto posicionamento aleatório durante o experimento.

10.2 - Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram baseadas no teste de soma de ranks de Wilcoxon (Wilcoxon Rank-sum test). Os cálculos das análises foram feitos com o auxílio do software S-plus.

O teste de Wilcoxon é um teste não paramétrico alternativo ao teste *t* de duas amostras, e equivalente ao teste U de Mann-Whitney.

Este é utilizado para testar a hipótese nula de que a distribuição de duas populações, vindas de duas amostras aleatórias, é idêntica, contra a hipótese alternativa de que elas diferem na média, mediana, moda ou média geométrica.

Este teste assume que:

1. dentro de cada amostra os valores são independentes e igualmente distribuídos,
2. As duas amostras são independentes entre si,

O teste de Wilcoxon é baseado nas notas (rank) das observações n_a+n_b. A cada observação é atribuída uma nota, a menor tem nota 1, a segunda menor nota 2 e assim em diante. O teste estatístico de Wilcoxon é a soma das notas das observações de uma das amostras. Tanto o p-valor como as notas de cada observação são calculadas pelo programa estatístico.

As hipóteses testadas na maioria dos experimentos eram se a população alterada tinha comportamento reológico igual a do controle.
(http://www.basic.nwu.edu/statguidefiles/sghome.html,
http://www.stat.auckland.ac.nz/~wild/ChanceEnc/)

11 - Resultados

11.1 - Potencia do laser utilizada

Após os procedimentos de inicialização do equipamento, o laser era disparado sobre a câmara de neubauer, através da objetiva do microscópio. Para que a potencia do laser na amostra fosse entre 80 mW foram testadas diversas potencias da lâmpada do laser. A Tabela 3 - mostra a variação da potencia em relação ao tipo de alteração da hemácia. Os dados de esferocitose são para uma potencia final de 100 mW.

Tabela 3 - *Relação tipo de hemoglobina celular e potência do laser.*

Tipo de hemácia	Potência da lâmpada do laser
Controle	23,0 – 23,5
HbSS com ou sem HU	23,3 – 23,5
HbAS	23,5
HbSC	23,7 – 24,0
Esferocitose	24,0 – 24,3

11.2 - Automatização do método de medida

Com os pacotes de medidas automáticas o tempo de realizadas das mesmas diminuiu enormemente. A Tabela 4 - mostra os dados da elasticidade obtidos nos dois métodos de medida, manual e automático.

11.3 - Uniformidade das medidas

Antes da realização dos experimentos com portadores de alterações nas hemácias, foram testados 21 controles normais. Estes testes visaram a padronização das técnicas de medida e aquisição das imagens e dados durante as análises.

As medidas da pinça óptica se mostraram altamente reprodutivas. Os desvios padrão das análises de um mesmo indivíduo são sempre muito baixos. A média de todos os controles feitos foi de 0,8895 dyn/cm $x10^{-3}$, com desvio padrão de 0,4942 dyn/cm $x10^{-3}$, Tabela 5 - . Nos experimentos com hemácias alteradas, o desvio padrão chegava a ser 6 vezes a média.

Tabela 4 - *Elasticidade celular medida manualmente e medida automática.*

	Elasticidade μ (Dyn/cm)	
Célula	Manual	Automática
HbSS	0,002456	0,002551
HbSS	0,001262	0,001269
HbSS	0,002891	0,002919
HbSS	0,003192	0,0030
HbAS	0,008553	0,008553
HbAS	0,000953	0,000949
HbAS	0,001745	0,001732
Controle	0,002147	0,002099
Controle	0,001811	0,001787

Tabela 5 - *Dados da elasticidade de todos os indivíduos controles estudados.*

		Elasticidade (dyn/cm $x10^{-3}$)			
N_I	**N**	**Média**	**Desv pad**	**Mediana**	**Variação**
90	6254	0,8895	0,4942	0,6920	0,1084 – 2,7180

N_I = número de indivíduos; N = número de células; Desv pad = desvio padrão

Na Tabela 6 - estão mostrados os resultados de diferentes medidas da elasticidade em dois indivíduos do grupo controle. As amostras foram colidas e analisadas em dias diferentes.

Tabela 6 - *Elasticidade de hemácias obtidas em diferentes amostras de 2 indivíduos controles.*

Tipo	Amostra	Elasticidade (dyn/cm)	Tipo	Amostra	Elasticidade (dyn/cm)
Controle 1	1	1,121	Controle 2	1	0,803
	2	1,233		2	0,795
	3	1,156		3	0,964
	4	1,110		4	0,884
	5	1,132		5	0,802
	6	1,089		6	0,811
	7	1,289			
	8	1,110			
	9	1,122			
	10	1,095			
Média		*1,115*			*0,843*
Desvio padrão		*0,065*			*0,068*

11.4 - Experimentos com portadores de Esferocitose Hereditária (EsH)

A Esferocitose Hereditária (EsH) é uma doença autossômica dominante, cosmopolita com prevalência de 1 caso em cada 5000 indivíduos que causa uma anemia hemolítica de expressão variada. Caracteriza-se pela presença de numerosas hemácias que perderam a capacidade de deformação e, devido a um decréscimo da razão superfície/volume, se tornam esféricas (esferócitos). As hemácias possuem um aumento da fragilidade osmótica e encontram-se relativamente desidratadas e por isso apresentam uma maior concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Beutler and Williams, 1995).

As anormalidades moleculares são heterogêneas. A EsH pode ser dividida em 4 subtipos: 1- deficiência parcial da proteína de membrana espectrina; 2- combinação da deficiência parcial de espctrina com deficiência da anquirina; 3- deficiência parcial da proteína banda 3 e 4- deficiência da proteína 4.2 e outras deficiências menos comuns (Beutler and Williams, 1995).

11.5 - Morfologia dos esferócitos

A principal característica morfológica dos esferócitos é uma célula vermelha sem a concavidade central, possui um diâmetro menor e parece ser mais hemoglobinizada do que as hemácias normais. Estas características refletem, em parte, alteração da geometria celular: o diâmetro de uma esfera é menor e a camada de hemoglobina é mais concentrada do que em um disco do mesmo volume (figura 33).

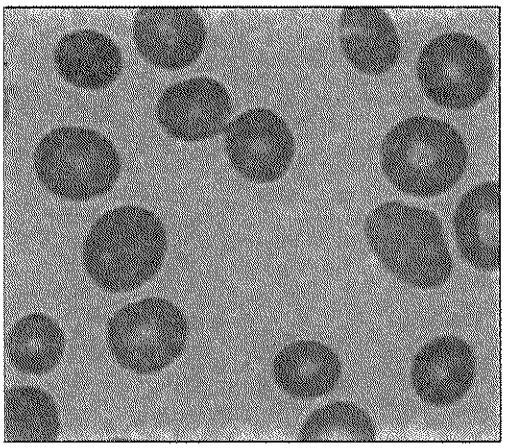


figura 33 - *Morfologia dos esferócitos*

Os esferócitos são menos deformáveis que as hemácias normais, apresentam um certo grau de rigidez de membrana, incapazes de sofrer a acentuada deformação necessária para atravessarem os capilares e sinusóides do baço, sendo seqüestrados e destruídos neste último (Hoffbrand and Pettit, 1993).

11.6 - Estudos da deformabilidade da EsH com Pinça Óptica

Em 1980 Mohandas *et al.,* usando ectacitometria, demonstraram que esferócitos, em meio isotônico, apresentam uma menor deformabilidade comparada aos controles. Quando diminuída a osmolalidade há um aumento na deformabilidade das células (Mohandas et al., 1980).

Neste projeto, foram analisados 7 pacientes com EsH comprovados por análises clínicas no Hemocentro da UNICAMP e moleculares em nosso laboratório, Tabela 7 - .

Os esferócitos apresentaram-se rígidos e estatisticamente diferentes quando comparados às células dos controles normais (p=0,0022 Wilcoxon – Mann Whitney), Tabela 8 - .

Não houve diferença na elasticidade celular quando os tipos de deficiência das proteínas de membrana foram comparados (Tabela 9 -), bem como entre indivíduos esplenectomizados ou não.

Tabela 7 - *Dados hematológicos dos indivíduos analisados.*

Indivíduo	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	Reticulócitos (%)	Hb (g/dl)	Conteúdo protéico relativo
*1**	104,0	35,8	1,0	12,2	80% Espectrina
2	87,0	35,8	ND	13,8	79% Banda 3
3	94,2	33,8	7,6	15,1	75% Espectrina
*4**	82,1	35,5	1,0	14,1	66% Ank
5	88,5	35,4	2,8	13,3	80% Banda 3
6	89,0	35,3	5,1	11,6	70% Banda 3
7	88,0	36,1	3,5	15,8	88% Espectrina

* indivíduo esplenectomizado, VCM = Volume corpuscular médio, CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média, Hb = hemoglobina, ANK = anquirina, ND = Dado não disponível.

Tabela 8 - *Quadro comparativo entre as médias, medianas e variação (mínimo e máximo) da elasticidade nos grupos controle e portadores de esferocitose hereditária.*

	Elasticidade (dyn/cm $x10^{-3}$)			
	N	Média	Mediana	Variação
Controle	100	0,86	0,69	0,11 – 2,15
EsH	90	3,03	1,39	0,22 – 23,27

N = número de células analisadas, EsH = portadores de esferocitose hereditária.

Tabela 9 - *Quadro comparativo das elasticidades entre as diferentes mutações.*

		Elasticidade (dyn/cm $x10^{-3}$)		
Proteína deficiente	**N**	**Média**	**Mediana**	**Variação**
Banda 3	32	2,67	1,28	0,37 – 19,43
Anquirina	39	4,86	1,67	0,38 – 23,30
Espectrina	19	3,80	1,56	0,38 – 17,00

N = Número de células analisadas.

Cerca de 30 % do total de células analisadas não apresentaram deformação suficiente para se calcular sua elasticidade, apresentando um μ igual a zero ou um valor negativo. Para se contornar este problema foram feitas algumas tentativas de ajuste no programa de corrida.

Para demonstrar se estas células apresentavam este comportamento devido à baixa força aplicada pela pinça, foram acrescidas as velocidades de 270 e 290 μm/s e eliminou-se a primeira velocidade 150μm/s das seis habituais (150, 170, 190, 210, 230, 250 μm/s), com o intuito de não estender o tempo em que a célula fica presa à armadilha óptica. Como antes, aproximadamente 30% das células que completaram o experimento não apresentaram nenhum tipo de deformação e, daquelas que foram pinçadas, aproximadamente 20% não completavam um experimento, soltando-se da armadilha óptica nas velocidades 250 ou 270μm/s.

Outra alternativa tentada foi o aumento da potência do laser. Esta havia sido fixada em torno de 80,0 mW (mili watts) para todas as análises, a fim de padronizar e tornar as análises estatísticas mais reais. No caso do estudo dos esferócitos, foi tentado elevar a potência do laser para, aproximadamente, 105 mW, com o intuito de aumentar a força da armadilha e forçar as células a completar um experimento sem se desprender da pinça tanto nas seis velocidades padrão como no teste com sete. Este procedimento foi válido em pinçar as células pelo tempo necessário mas se tornou nulo devido às alterações morfológicas causadas nas células, possivelmente um efeito térmico causado pelo laser (figura 34).

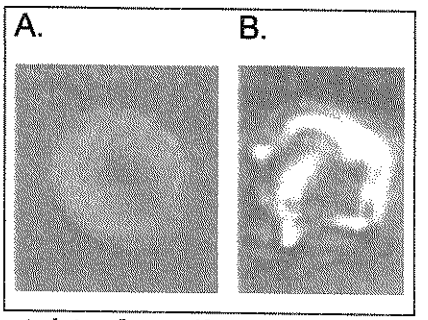


figura 34 - *A. Célula pinçada no início da análise. B. Célula com aumento da potenciado laser, morfologia alterada.*

A princípio foi pensado que devido ao seu formato característico a elasticidade dos esferócitos não poderia ser calculada utilizando–se a fórmula matemática usual. A primeira parte do experimento (pinçamento com o laser e arrasto contra o plasma) foi realizada sem alteração na técnica. Os cálculos da elasticidade foram feitos, primeiramente, com as fórmulas e planilhas padronizadas. Em seguida a deformabilidade foi calculada utilizando os dados do diâmetro máximo dos esferócitos em cada velocidade, sem alteração nas fórmulas utilizadas. Esta medida, diâmetro máximo, pode ser obtida automaticamente pelo software Image Pro-Plus. Ambos os tipos de cálculos apresentaram respostas muito próximas, devido à alteração da forma celular não ser muito grande.

Foram realizadas quatro análises duplas sendo que as médias das elasticidades não foram significativamente diferentes (p=0,875 Teste *t* para amostras pareadas), os dados estão mostrados na Tabela 10 - .

Tabela 10 - *Quadro comparativo da Elasticidade média de esferócitos usando como modelo para o cálculo uma esfera e um paralelepípedo.*

	Elasticidade (dyn/cm $x10^{-3}$)	
Paciente	**Esfera**	**Paralelepípedo**
1	1,302	1,254
2	4,956	4,814
3	3,489	3,319
4	3,929	3,824

Decidiu-se então manter a forma de cálculo já padronizada, com todos os programas de computador prontos e em pleno funcionamento, evitando-se assim ter diferentes planilhas de cálculos.

Nas análises da esferocitose hereditária viu-se que o índice de células com experimento completo é muito baixo para se ter certeza de seu comportamento reológico. Outro fator que dificultou a análise dos dados foi, como já mencionado acima, 30% das células não sofreram nenhuma deformação com aplicação das forças de arrasto durante o experimento. É possível que a técnica de medição da elasticidade celular por pinça óptica de feixe único não possa diferenciar células com baixa deformabilidade. Assim, pode-se, dizer que células cuja elasticidade esteja acima de um determinado valor, possivelmente superior a 25,0 dyn/cm $x10^{-3}$, não podem ser corretamente medidas por esta técnica. O mesmo problema se repete quando as células são muito deformáveis.

11.7 - Experimento com pacientes em crise falcêmica

Foram estudados cinco casos de pacientes em crise falcêmica. Os experimentos com essas células foram extremamente difíceis de se realizar. Todas as células apresentavam grande instabilidade quanto à integridade da membrana celular. A maioria das células, cerca de 60%, se rompia ao ser capturada pela pinça óptica, outros 12%, ao entrarem na armadilha óptica, apresentavam uma falcização não mais se deformando, impossibilitando a realização dos experimentos de corrida. De fato, em apenas um dos cinco pacientes foi possível capturar mais de 10 células com o experimento de corrida completo. Em outro paciente foi impossível a realização da captura e corrida contra o plasma. Nos restantes a captura foi finalizada apenas com 10 células. Os dados da análise da deformabilidade celular estão mostrados na Tabela 11 - .

Denota-se que as células que puderam ser estudadas apresentaram elasticidade próxima do normal. Entretanto, a impossibilidade de avaliar o conjunto de células impediu uma conclusão definitiva.

Tabela 11 - *Dados da deformabilidade celular dos pacientes homozigotos para anemia falciforme em crise falcêmica.*

			Elasticidade (dyn/cm x10^{-3})		
Paciente	**N**	**NC**	**Média**	**Mediana**	**Variação**
1	15	20	0,86	0,65	0,13 – 1,97
2	10	60	0,65	0,46	0,10 – 2,01
3	10	40	0,70	0,61	0,11 – 2,16
4	10	30	0,81	0,71	0,11 – 2,20
5	0	30	ND	ND	ND

N= Número de células onde foi possível a realização dos experimentos, NC = Número de células capturas para se obter N.

11.8 - ***Propriedades mecânicas de células de portadores de anemia ferropriva***

Neste projeto foi realizada análise com três pacientes portadores de anemia ferropriva por hiperfluxo menstrual (Tabela 12 -). Um mínimo de 30 e um máximo de 56 células de cada indivíduo foram submetidas e analisadas pela pinça óptica. As células de indivíduos com anemia ferropriva se apresentaram mais rígidas quando comparadas aos controles (p=0,0021 Wilcoxon – Mann Whitney) com uma elasticidade média de 1,256 dyn/cm x10^{-3}, contra 0,850 dyn/cm x10^{-3} dos controles. Ainda assim, um dos pacientes com anemia ferropriva apresentou uma deformabilidade maior que o grupo controle.

Tabela 12 - *Dados hematológicos dos indivíduos com anemia ferropriva utilizados neste experimento.*

	Hb (g/dl)	Fer	HCT (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	N	Elasticidade (dyn/cm x10^{-3}) Média	Mediana (Variação)
1	9,55	<1,50	30,54	70,40	22,01	30	1,11	0,56 (0,065 – 6,360)
2	7,81	<1,50	25,78	56,00	16,97	30	1,24	0,99 (0,065 – 13,290)
3	8,30	<1,50	29,90	65,60	18,30	56	0,63	0,34 (0,096 – 2,02)

Hb = concentração de hemoglobina, Fer = Ferritina, HCT = Hematócrito, VCM = Volume corpuscular médio, HCM = Hemoglobina corpuscular média, N = Número de células analisadas.

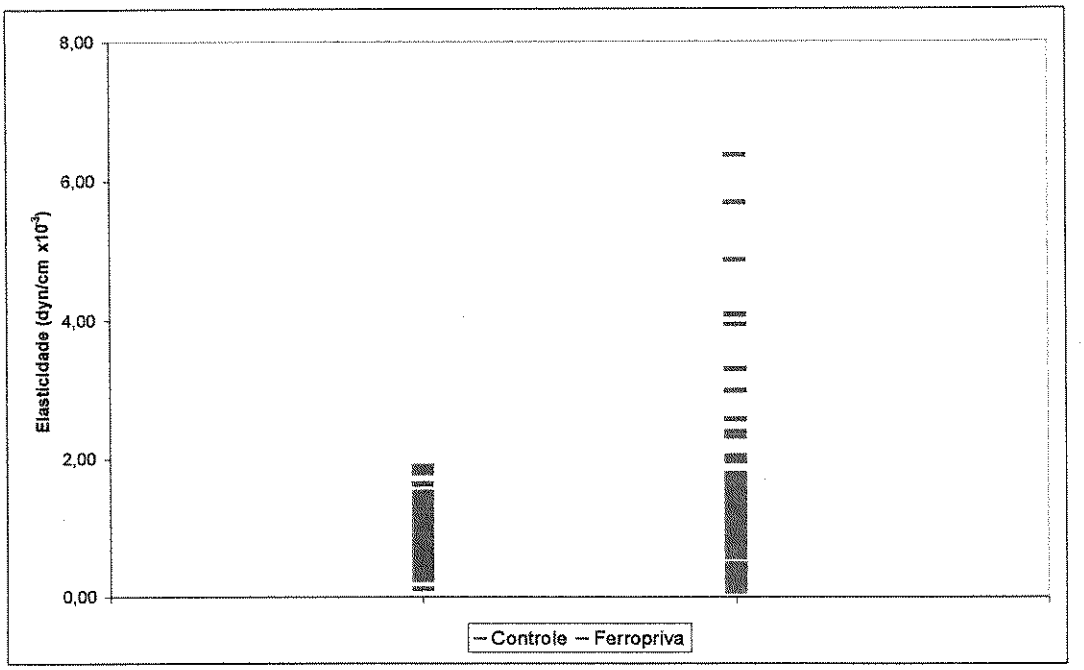


figura 35 *Gráfico com a distribuição da elasticidade das células com anemia ferropriva.*

11.9 - Trabalhos publicados e submetidos

11.9.1 - Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: Application to the study of drug response in sickle cell disease.

M. M. Brandão[1], A. Fontes[2], M. L. Barjas-Castro[1], L. C. Barbosa[2], F. F. Costa[1], C. L. Cesar[2], S. T. O. Saad[1]

[1]Department of Internal Medicine and Haemocentre, [2]Physics Institute Gleb Wataghin, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

Trabalho publicado no "European Jounal of Haematology 2003 70:207-211"

11.9.1.1 - Summary

The deformability of erythrocytes is a critical determinant of blood flow in microcirculation. By capturing red blood cells with optical tweezers and dragging them through a viscous fluid we were able to measure their overall elasticity. We measured, and compared, the red blood cell deformability of 15 homozygous patients (HbSS) including five patients taking Hydroxyurea for at least six months (HbSS/HU), 10 subjects with sickle cell trait (HbAS) and 35 normal controls. Our results showed that the red blood cell deformability was significantly lower in HbS subjects (HbSS and HbAS), except for HbSS/HU cells, whose deformability was similar to the normal controls. Our data showed that the laser optical tweezers technique is able to detect differences in HbS red blood cells from subjects taking hydroxyurea, as well as to differentiate red blood cells from normal controls and HbAS, indicating that this is a very sensitive method and can be applied for detection of drug-response in sickle cell disease.

Optical tweezers, sickle cell, hydroxyurea, red blood cell elasticity, deformability.

11.9.1.2 - Introduction

The deformability of erythrocytes is a critical determinant of blood flow in the microcirculation. This deformability is the combined result of several mechanical and geometrical properties, such as internal viscosity, surface area-volume ratio, and membrane elasticity and viscosity.

The sickle mutation substitutes thymine for adenine in the beta globin gene, thereby encoding valine instead of glutamic acid in the sixth position of the haemoglobin beta chain (Haemoglobin S or HbS). This mutation causes a defect in the haemoglobin structure, responsible for profound changes in molecular stability and solubility. In sickle cell anaemia, the red blood cells exhibit reduced deformability and the abnormalities in the erythrocyte rheology are of clinical importance in sickle cell disease.

Patients homozygous for this mutation (HbSS) present haemolytic anaemia and vaso-occlusive crises, leading to damage of most tissues (Platt, 1990). On the other hand, heterozygous individuals for this mutation (HbAS or sickle cell trait) are asymptomatic (Platt, 1990).

Hydroxyurea (HU) has been successfully used for treatment of this disease. It is known that, in addition to the improving foetal haemoglobin production, HU has a great effect on whole cell deformability (Ballas et al., 1989). Recently, we proposed a new method for measuring the elasticity and viscosity of red blood cells using laser optical tweezers (Huruta et al., 1998). This technology is based on photon momentum transfer (Ashkin et al., 1987), and has a variety of biological applications such as the trapping of cells and organelles, micromanipulation of gametes, biomolecular genetic assay and study of membrane mechanical properties.

In the present study, using sickle cell anaemia as a clinical model, we show, on experimental and theoretical grounds, that this technique is very sensitive and can be applied for clinical and research purposes.

11.9.1.3 - Methods

Patients:

We studied the red blood cell deformability of 25 haemoglobin S (HbS) subjects aging from 23 to 51 years old (15 homozygous for HbS including five patients taking Hydroxyurea for at least six months, and 10 subjects with sickle cell trait) and 35 normal controls, seen at the Haematology and Haemotherapy Center of Campinas – Brazil. Regarding β-globin haplotypes, 8 patients were Benin/Bantu, 4 Benin/Benin and 3 Bantu/Bantu. α-Thalassemia was absent in 8 HbSS patients (Table 13). The Ethical Committee of the University Hospital of Campinas approved this study.

Data Analysis

To examine whether significant differences were present between HbS Groups and controls we use the Mann-Whitney-Wilcoxon Rank Sums nonparametric Test (unpaired, independent groups). P-values were identified as significant if they were less than or equal to 0.05 (for a 2-tailed hypothesis). Results are presented as medians, minimal and maximal values.

Apparatus assembling:

The optical trap consisted of a Nd:YAG laser strongly focused through 100× oil immersion objective of an microscope (Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (JVC Company of America, Elmwood, NJ). The images were recorded in real time (VHS) and captured by a computer. The analysis of the images was performed with Image Pro Plus Software (Media Cybernectics, Baltimore, MD) and the mathematical calculation was performed using MS Excel (Microsoft Corp., Richmond, CA).

Optical tweezers analysis:

The analysis was performed in a 100 μm depth Neubauer improved chamber attached to a computer-controlled motion control (Prior Scientific, Rockland MA). Five ml of peripheral blood was collected in a vacuntainer containing EDTA and the erythrocytes, at 50% haematocrit, were diluted (0.5:1000 μl) in AB human plasma, Rh positive, with known viscosity (η = 1.856 centipoise at 23°C).

At least 17 cells of each subject were submitted to 6 velocities varying from 150 to 250 μm/s with an addition of 20 μm/s on each step and laser power of 100 mW. This force was applied only in one direction to avoid abnormal deformation caused by back and forward movement. All cell preparations and measurements were carried out at room temperature (25° C) within 2 hours of venipuncture, and no cell hydration, oxygenation or deoxygenating procedure was performed.

Measurement Technique and Models:

In order to evaluate the red cell membrane elasticity and viscosity, the cell model was assumed as a parallelepiped with length L, width W and negligible thickness δ. The cell was located at a distance Z_1 from the bottom of a Neubauer chamber and Z_2 from the cover slip. Optical tweezers dragged it with 6 constant velocities (V) through a fluid (Human AB plasma) with viscosity η (figura 5).

To define the drag force F, we assumed a simple model of two surfaces with W and L dimensions, one surface standing still (cell surface) and the other moving with velocity V in a viscous fluid with viscosity $\tilde{\eta}$.This resulted in the mathematical expression, $F_{Drag} = \eta \frac{WL_0}{Z_{eq}} V$ where η is the plasma viscosity and $\frac{1}{Z_{eq}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2}$. We assumed that the overall cell elastic response to an applied force F is given by $F_{Elastic} = \mu \frac{W}{L_0} \Delta L$, μ being the "overall elasticity" and ΔL (L - L_o) the cell length deformation, adopting L_o as the cell length in the absence of any force. Equilibrium occurs when the elastic force cancels the drag force. At the equilibrium, the cell length L is given by $L = L_o + \frac{\eta L_o^2}{\mu Z_{eq}} V$, independently of the

cell width W. Therefore, the measurement of the cell length as a function of the drag velocity can be used to extract a value for μ, once the plasma viscosity η, the initial length L_o and Z_{eq} are known. The slope of this curve $\frac{\eta L_o^2}{\mu Z_{eq}}$ is also a function of the equivalent depth Z_{eq}, and can be used to test this model.

In order to verify the previsions of the parallelepiped model, the cell length was measured as a function of the drag velocity for various Z_1. The camera of the optical tweezers microscope registered the cell images. These images were captured in a computer where its length was measured. We used the Neubauer chamber squares as the length calibration. The depth Z_1 was measured by focusing the bottom of the Neubauer chamber and then lowering the chamber by the desired amount (10 to 90 μm) while keeping the cell fixed with the optical tweezers. figura 10 shows the result of the cell length measurement as a function of the drag velocity and figura 11 shows the slope of the cell length vs velocity as a function of the depth Z_1. The slope of this straight line (L vs V) shows a dependence on Z_1 given by the expression $\frac{1}{Z_{eq}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{d - Z_1}$, assuming $Z_2 = d - Z_1 - \delta \cong d - Z_1$. This slope tends to infinity as Z_1 tends to zero or d, producing the odd shaped curve of figura 11 .

With this proposed technique, the entire cell is analyzed and not only the intrinsic membrane elasticity.

*11.9.1.4 - **Results***

Our results showed that the deformability of red blood cells was lower in subjects with HbS than normal controls (controls *vs* HbSS, *p = 0.0031*; controls *vs* HbAS, *p = 0.004*). On the other hand, the red blood cell deformability of HbS homozygous taking Hydroxyurea was similar to that observed in controls (*p = 0.640*). The results are presented in Figures 30a and 30b and table 14. Patients with sickle cell trait did not differ significantly from HbSS (p=0.9445). Our results showed that HbS cell deformability presented a wide spread distribution compared to normal control cells (figura 36 a). The cell deformability data did

not have a bimodal distribution, but the dispersion was high and some cells escape from the majority (figura 36 b).

We also did not find any correlation between red cell elasticity and β-globin haplotypes or α-thalassemia status. Individual data of sickle cell patients are shown in table 13.

11.9.1.5 - Discussion

In the present study, we measured the red cell deformability from HbS subjects using an optical tweezers technique. The optical tweezers uses a Nd:YAG laser that operates in the infrared wavelength region, at 1064 nm and, at the lower power used in this study (100mW), does not cause any heat damage to the cells. In fact, Ashkin and Dziedzic proved that a yeast cell could be trapped for 3 hours and remains alive (Ashkin and Dziedzic, 1987).

We found that the red cell deformability was not different in HbS subjects (Homozygotes and Heterozygotes), but that both were significantly different from normal cells. After testing this methodology in several normal RBC cells, we observed that the data are distributed in a very narrow range and are very reproducible. On the other hand, in the HbSS and HbAS groups, a very heterogeneous RBC population was detected, with regard to their deformability. Reid and colleagues (Reid and Obi, 1982), using a filtration method, demonstrated that HbSS present no erythrocyte deformability index while in HbAS the index was 50% lower than in normal controls. Indeed, Hiruma *et al* (Hiruma et al., 1995) demonstrated that HbAS and HbSS cells present an impaired filtration in an oxygenated environment even with normal cell morphology, suggesting that cell morphology is not directly related to the abnormal rheologic behaviour.

Thus, we believe that the optical tweezers is such a sensitive method that it cannot differentiate well between homozygotes and heterozygotes. Therefore, the deformability of these cells is only one of the factors that contribute to the clinical aspects of HbS subjects. This impaired deformability is attributed to the HbS cells concentration in the blood, their increased adhesiveness to the endothelial cells and plasma viscosity (Hebbel et al., 1980). Since the adherence of HbS cells to endothelium contributes to the microvascular occlusion (Hebbel et al., 1980; Setty et al., 2002) and cells of homozygotes are more adherent than cells of heterozygotes (Barabino et al., 1987), it is not surprising that sickle cell trait

individuals are asymptomatic, despite the abnormal elasticity of their cells observed in this study.

Interestingly, HbSS subjects taking HU for at least 6 months had cell deformability similar to that of the controls. In addition, about 5% of their cells had an even better deformability compared to normal controls (figura 36 a and b). It is known that, cells treated with HU present an improvement in the cellular hydration status and in deformability (Ballas et al., 1989; Engstrom and Lofvenberg, 1998). Gulley and colleagues (Gulley et al., 1982) demonstrated that cellular deformability is greatly influenced by its state of hydration and a rise or a fall in cell hydration resulted in an alteration in cell deformability.

Other techniques such as ektacytometry (Ballas et al., 1989) (Groner et al., 1980; De Franceschi et al., 1997), and micropipette aspiration (Evans and La Celle, 1975; Hochmuth et al., 1979) have been successfully used for analysis of HbSS red cell deformability. The micropipette technique, as well as optical tweezers, has the advantage of quantification of the rheologic properties of individual cells rather than the average rheologic behaviour of a cell population (Itoh et al., 1995). This individual cell analysis is necessary to detect differences between normal and abnormal populations. The micropipette technique measures, mainly, the cell membrane deformability (Evans and La Celle, 1975) whilst the optical tweezers measures the entire cell deformability (overall elasticity) and not only the intrinsic membrane elasticity. In fact, Evans and colleagues (Evans and Mohandas, 1987) demonstrated that the rheological behaviour of the erythrocyte is provided by both membrane and cytoplasm properties, therefore the overall elasticity is very sensitive to any change in the cell environment, such as the osmotic pressure, changes due to molecules attached to the cell surface or haemoglobin defects (Dong et al., 1992).

In conclusion, the data herein presented showed that the laser optical tweezers technique was able to detect differences in the deformability of red blood cells from HbS subjects. Therefore, it was also able to detect an improvement in cell deformability after treatment with Hydroxyurea, indicating that laser optical tweezers is a very sensitive method and can be applied for detection of drug-response in sickle cell disease.

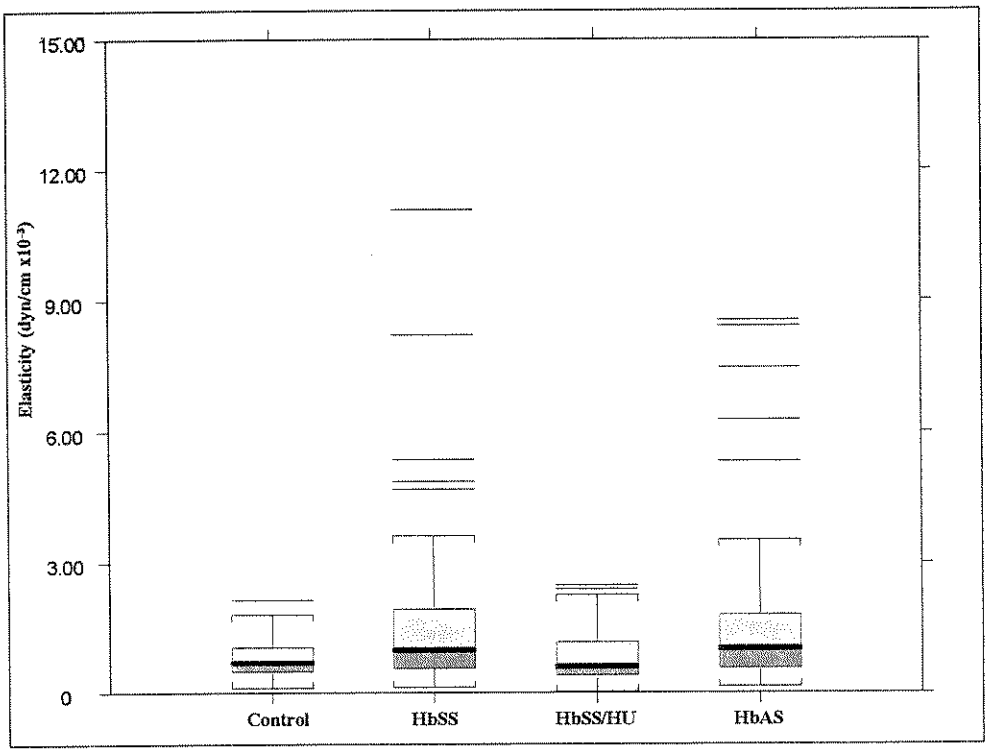
Tabela 13 - *Haematological data of patients with Sickle Cell Anaemia.*

Patient	RBC ($x10^{12}$/l)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	HbF (%)	Haplotype	α globin locus	Elasticity (dyn/cm $x10^{-3}$)	
								Median	Range
1	2.44	7.7	92.0	31.2	9.8	BENIN / BANTU	αα/αα	2.316	1.621 – 6.601
2	1.93	7.2	94.0	34.7	2.7	BENIN / BENIN	αα/αα	0.947	0.451 – 12.503
3	2.06	7.1	94.0	32.5	6.9	BENIN / BENIN	αα/αα	1.127	0.329 – 5.116
4	2.05	7.0	94.0	33.7	10.0	BENIN / BANTU	αα/αα	0.905	0.454 – 15.541
5	2.36	8.4	96.0	35.2	5.4	BENIN / BANTU	αα/αα	0.883	0.372 – 4.463
6	2.98	9.7	90.9	32.6	10.8	BENIN/BENIN	α_/α_	1.720	0.870 – 7.907
7	3.63	10.2	81.9	28.1	10.2	BENIN/ BANTU	α_/α_	0.994	0.242 – 6.837
8	1.82	6.4	95.6	35.2	4.5	BANTU / BANTU	α_/α_	1.709	0.717 – 8.526
9	2.01	5.9	83.0	29.4	2.6	BENIN/ BANTU	α_/αα	0.721	0.124 – 5.122
10	2.54	6.6	70.4	26.0	5.4	BENIN/ BANTU	α_/α_	0.940	0.598 – 5.330
PATIENTS TAKING HU									
11	1.71	6.9	95.0	30.8	10.5	BENIN / BANTU	αα/αα	1.178	0.483 – 1.426
12	2.96	7.3	91.0	30.4	7.1	BENIN / BANTU	αα/αα	0.743	0.295 – 2.397
13	2.86	11.1	106.0	34.2	18.7	BENIN / BENIN	αα/αα	0.515	0.017 – 2.256
14	2.71	9.1	95.2	33.6	11.2	BANTU / BANTU	α_/α_	0.627	0.288 – 2.043
15	2.6	7.7	87.5	29.6	7.2	BANTU / BANTU	α_/αα	0.747	0.245 – 2.485

Tabela 14 - *Red cell overall elasticity measured by optical tweezers in normal controls, sickle cell anaemia patients (HbSS), sickle cell anaemia patients taking hydroxyurea (HbSS/HU), and sickle cell trait subjects (HbAS).*

	Number of cells analysed	Elasticity (dyn/cm x10^{-3})	
		Median	Range
Controls	900	0.692	0.108 – 2.146
HbSS	177	0.976	0.124 – 15.542
HbSS/HU	131	0.590	0.018 – 2.485
HbAS	158	1.010	0.132 – 8.553

A)



B)

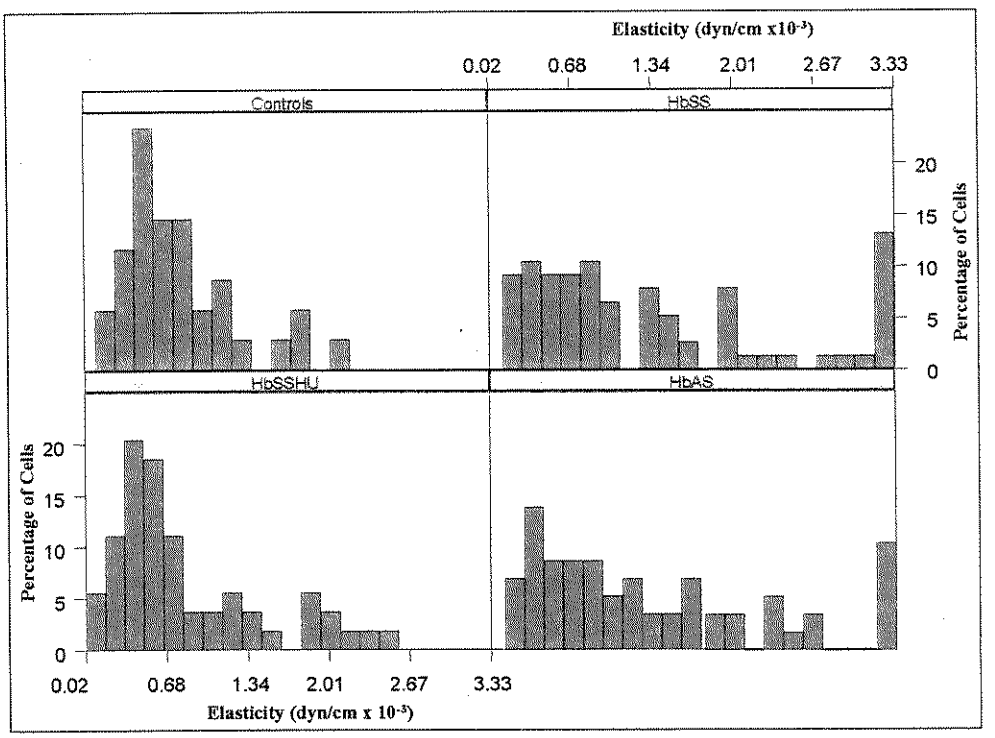


figura 36 - *Distribution of red cell elasticity in all subjects analyzed. A) Box plot, the black line represents the median and single lines over the boxes indicate the out liners. B) Histogram excluding the out line cells.*

11.9.2 - Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers.

M. L. Barjas-Castro*[1], M. M. Brandão*[1], A. Fontes*[2], F. F. Costa[1]C, L. Cesar*[2], S. T. O. Saad [1]

[1]Hematology and Transfusion Center; [2]Physics Institute "Gleb Wataghin", State University of Campinas, Campinas, Brazil.

Publicado na "Transfusion 2002 Sep;42(9):1196-9"

11.9.2.1 - Abstract

Background: Gamma irradiation of RBC results in the production of reactive oxygen, capable of initiating the process of membrane lipid peroxidation, and accelerates the leakage of potassium ions from RBC resulting in an increase of internal viscosity.

Study design and methods: The elastic properties of irradiated and stored RBC units were studied using laser optical tweezers. The laser trapped the cell and the membrane elasticity was analyzed measuring the cell deformation in six different drag velocities. Five RBC units were split into two portions. One portion received a gamma irradiation dose of 25Gy and the second one was used as a control and was not irradiated. All units were stored (4°C) and the elasticity was examined on days 1, 14, 21 and 28

Results: Elastic properties (μ) from irradiated RBC stored for 21 days and 28 days were significantly affected when compared to control cells (21 days: control $0.3\pm0.03x10^{-3}$;irradiated $3.5\pm1.3x10^{-3}$ dyn/cm; p-v<0.001 and 28 days: control $0.5\pm0.09x10^{-3}$; irradiated $14\pm3.2x10^{-3}$ dyn/cm; p-v<0.001).

Conclusion: The sensitivity of the laser optical tweezers method showed that there is no significant change in elasticity over time up to 14 days of storage, regardless of whether the unit was irradiated or not. However, beyond 21 days of storage, irradiated units demonstrate decreased elasticity.

Key words: red cell elasticity, optical tweezers, gamma irradiation.

11.9.2.2 - Introduction

Transfusion associated graft-versus-host disease (TA-GVHD) is usually a fatal complication of blood transfusion in immunosuppressed patients and results from the engraftment and clonal expansion of allogenic donor leukocytes (Baldwin et al., 1992; Williamson and Warwick, 1995). Gamma irradiation of blood components is an effective way to prevent TA-GVHD, however it induces hematological and biochemical RBC changes and reduces their survival (Button et al., 1981; Jeter et al., 1991; Baldwin et al., 1992). Irradiation of RBC results in the production of reactive oxygen species such as hydroxyl radicals, which are capable of initiating or enhancing the process of lipid peroxidation and affect membrane integrity (Pryor, 1976; Halliwell and Gutteridge, 1985; Anand et al., 1997). Furthermore, irradiation accelerates leakage of potassium ions from RBC resulting in an increase of internal viscosity and an impair of cell deformability (Ramirez et al., 1987; Moroff and Luban, 1994; Cicha et al., 2000).

The indications for irradiated components have increased in the recent years and the storage of RBC units for an extended period after irradiation is a regular procedure in some blood banks without immediate access to a blood irradiator. However, while non-irradiated RBC bags collected in $CPDA_1$ can be stored for 35 days, the AABB standards recommend that the shelf life of irradiated RBC be limited to 28 days after irradiation (Menitov, 1999).

The RBCs deformability is the combined result of several mechanical and geometrical properties, such as internal viscosity, surface area-volume ratio, and membrane elasticity.

Laser optical tweezers were developed by Ashkin et al (Ashkin et al., 1986) and it is a very sensitive method which allows individual, cell by cell, elasticity measurement method. This method has been used with success and has a variety of biological applications such as trapping of cells and organelles, micro - manipulation of gametes, biomolecular genetic assay and the study of elastic properties of membranes (Bronkhost et al., 1995; Sleep et al., 1999). It also seems to be very sensitive to measure the elastic properties of stored red blood cells (Huruta et al., 1998). Thus, the aim of this work was to analyze the elasticity of irradiated stored red blood cell units using optical tweezers.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

11.9.2.3 - Material and Methods

Optical Tweezers

The membrane elasticity was obtained by measuring the deformation of the cell when dragged at six different velocities through the plasma fluid. The optical trap consisted of a Nd:YAG laser beam (wavelength 1064 μm) focused through the 100X objective of a microscope (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) equipped with a minicam (JVC Company of America, Elmwood, NJ), which registered the trapped red cell image in real time. These images were recorded in VHS and captured in a computer where they could be quantitatively and qualitatively analyzed by a software (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). The model used for calculating the values for the membrane elasticity assumed that the cell was a parallelepiped with length (L), width (W) and negligible thickness (δ) located at a distance Z_1 from the bottom of Neubauer chamber and Z_2 from the cover slip (figura 5). We assumed that the overall cell elastic response to an applied force was given by $F=\mu(W/Lo)\ \Delta L$, where F was the force, μ was the elasticity and ΔL ($L-L_0$) was the cell length deformation, adopting Lo as the cell length in the absence of any force. We assumed a drag force F given by $F_{drag} = \eta\ (WLo/Zeq)\ V$, where η was the plasma viscosity, $(1/Zeq) = (1/Z_1) + (1/Z_2)$ and V was the drag velocity. The equilibrium occurred when one force canceled the other. Therefore the elongation ΔL as a function of drag velocity was given by $\Delta L = [\eta Lo2/(\mu Zeq)]\ V$, from where we could extract a value for μ provided by the plasma viscosity η, the length Lo and Zeq which were easily measured.

Cell elasticity (μ) behaves as the spring elastic constant, where the force (F) applied to a spring is precisely proportional to its deformation (ΔL) and the proportionality constant (k) is called the elastic constant ($F=k\ \Delta L$). Therefore, the higher the elastic constant of the spring, greater is the force applied, in order to obtain an equivalent deformation. Consequently, the higher μ value, defined as elasticity, the less deformable is the cell.

Material

Five RBC units from healthy blood donors were collected in $CPDA_1$ (Fresenius, Asem-NPBI, Itapecirica da Serra, São Paulo, Brazil) and each one split into two portions (split units) via a sterile connecting device (Terumo Medical Corporation, Elkton MD). One bag from each split unit received a gamma irradiation dose of 25Gy (IBL 437C Irradiator - Cis Bio International, Gif sur Yvette, France) and the second one served as a control and was not irradiated. Samples of each RBC unit were analyzed after gentle mixing via a sterile connecting device (Terumo Medical Corporation, Elkton, MD) during storage period. The RBC samples were diluted (1:1000μl) in AB plasma with viscosity (η) of 1.504 centipoises measured at 25°C. The elasticity of RBCs was examined during storage at 4°C on days 1, 14, 21 and 28. Ten erythrocytes from each unit were submitted to six different and constant drag velocities (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s), controlled by a computer and a stage controller. This force was applied only in one direction. Cell samples and measurements were carried out at room temperature (25°C). The RBC images were recorded in VHS and captured in a computer where they were twice analyzed by measurement software (Image - Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Statistical analysis was performed using Wilcoxon test (Splus 2000 - mathsoft Inc.) and the data was analyzed as a cell pool.

11.9.2.4 - Results

The elasticity of fifty RBC from five irradiated and control units were analyzed during storage up to 28 days. Erythrocytes from irradiated units stored for 21 days ($3.54\pm1.3 \times 10^{-3}$ ± dyn/cm) and for 28 days ($14.0\pm3.2 \times 10^{-3}$ ± dyn/cm) presented significant lower elasticity when compared to control cells stored for 21 days ($0.37\pm0.03 \times 10^{-3}$ ± dyn/cm; p-v <0.001) and 28 days ($0.50 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ dyn/cm; p-v<0.001). The elasticity of RBCs irradiated and stored for 14 days ($0.43 \pm 0.038 \times 10^{-3}$dyn/cm) presented no significance statistic difference when compared to non-irradiated units ($0.34 \times 10^{3} \pm 0.02$ dyn/cm; p-v 0.058) - table 15. The box-and-whisker plot (figura 37) showed a clear distinction between the membrane elasticity (μ) from irradiated and not-irradiated RBC stored for 21 and 28 days.

11.9.2.5 - Discussion

Gamma irradiation of cellular components has been important for the prevention of GVHD after transfusion and has become a common practice in Blood Banks (Baldwin et al., 1992). Biochemical and morphological effects of irradiation on RBCs have been reported using doses from 15 up to 30 Gy (Davey et al., 1992; Suzuki et al., 2000) and these effects can be accentuated by blood storage (Card et al., 1982; Suzuki et al., 2000).

Suzuki et al (Suzuki et al., 1993) have studied the RBC deformability of gamma-irradiated blood (50Gy) using a high-shear rheoscope and demonstrated that the deformation index of irradiated and control red cells were not statistically different. However, the deformation index of red cells decreased slightly during storage. Cicha et al (Cicha et al., 2000) showed that the gamma irradiation of 35 Gy to RBCs stored in mannitol-adenine-phosphate medium reduced the RBC deformability and, the number of undeformable cells steeply increased during storage. The cell deformability was examined under shear flow and the low deformability was mainly induced by excess leakage of K^+ from the cells.

We have previously demonstrated that the optical tweezers are a sensitive and precise method to study the elasticity of stored RBCs (Huruta et al., 1998). In the present study we applied the same method focusing irradiated and stored RBC units for transfusion purposes and the results were in accord with the findings of the previous studies which suggested that the deformability of irradiated RBC decreases during storage (Cicha et al., 2000; Suzuki et al., 2000). However, the sensitivity of the laser optical tweezers method allowed us to conclude that there is no significant change in RBC elasticity over time up to 14 days of storage, regardless of whether the unit was irradiated or not. In addition, units stored for more than 21 days after irradiation presented loss of elastic cell properties. This modification could interfere in the mechanical behavior of the erythrocyte in microcirculation. Taken together our data suggest that irradiated red blood cell units stored for 21 days seem to be impaired and the transfusion of this component may be more effective during up to 14 days of storage.

Tabela 15 - *Elasticity (dyn/cm) of irradiated and control RBC cells stored for 1, 14, 21 and 28 days. The elasticity (μ) has been studied measuring the deformation of each cell dragged at six different and constant velocities (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s).*

Stored days	Elasticity - μ (dyn/cm) x 10^{-3} (mean ± SEM)		p – value
	Control RBC	Irradiated RBC	Wilcoxon test *
1	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.373
14	0.20 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.129
21	0.22 ± 0.03	2.15 ±0.69	0.0002

**Splus 2000 - mathsoft Inc.*

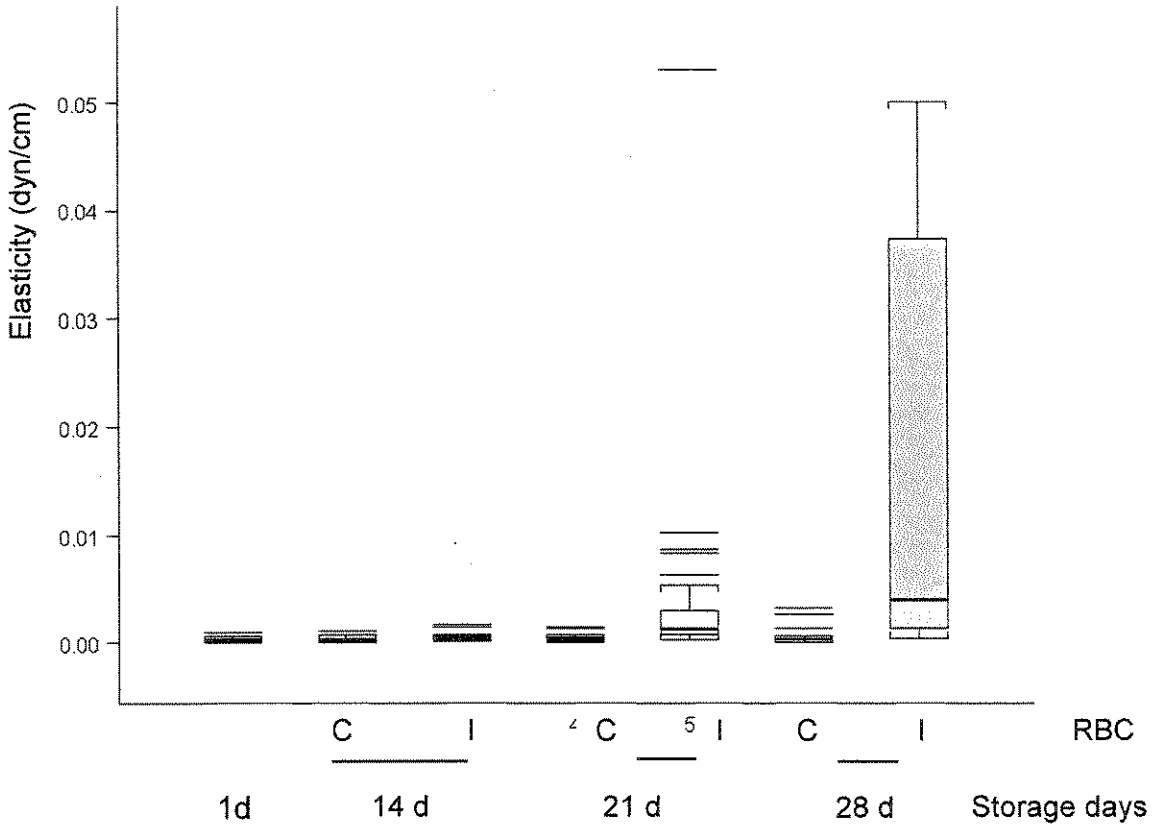


figura 37 - *Box-and-whisker plot comparing the distribution of elasticity (dyn/cm) of fifty RBC from five split units. Each unit was divided into non-irradiated (control-C) and irradiated (I) RBC and stored for 1, 14, 21 and 28 days. The plot shows a box defined by the lower and upper quartiles and the elasticity median marked by a subdivision of the box.*

11.9.3 - Elastic properties of stored red blood cell units from donors with sickle cell trait

Brandão MM[1], Saad STO[1], Cezar CL[2], Costa FF[1], Barjas-Castro ML[1]

[1] Hemocentro Unicamp; [2] Instituto de Física "Gleb Wataghin", State University of Campinas, Campinas, Brazil.

Trabalho aceito para publicação na Vox Sanguinis.

Red blood cells (RBC) from sickle cell disease patients exhibit secondary alterations in cell metabolism and membrane structure. Sickle cell trait (AS) subjects present around 35% of HbS from the total hemoglobin and mostly are asymptomatic. AS individuals are eligible for blood donation and their RBCs are considered safe for transfusion and have normal survival rate in recipients who have no anoxia.

Laser optical tweezers (Ashkin et al., 1986) are a very sensitive method that allows individual cell elasticity measurement. This method provides a sensitive tool to measure the elastic properties of stored RBCs (Huruta et al., 1998; Barjas-Castro et al., 2002). Thus, the aim of this study was to analyze the elasticity of stored AS RBCs using optical tweezers.

The membrane elasticity was obtained by measuring the cell deformation when dragged at six different velocities (150 to 250μm/s) through the plasma fluid. The optical trap consisted of a Nd:YAG laser beam focused through the 100X objective of a microscope equipped with a minicam (JVC Company of America, Elmwood, NJ), which registered the trapped cell image in real time. These images were recorded in VHS and captured in a computer where they could be analyzed by an automated method, using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Baltimore, MR).

Fourteen RBC units from healthy blood donors, being seven with sickle cell trait (AS) and seven normal controls (AA), were collected in $CPDA_1$ and stored at 4°C for 35 days. Samples from each unit were obtained during storage period on days 1, 14, 21, 28 and 35. They were diluted (0.5:1000μl) in AB plasma with viscosity of 1.616cP measured at 23°C. Twenty-five cells from each unit were analyzed and the measurements were carried out at

room temperature (23°C). Statistical analysis was performed using Wilcoxon rank-sum test and the data was analyzed as a cell pool.

RBCs elasticity from AS units stored for 1 day ($0.84x10^{-3}$dyn/cm), 14 days ($0.81x10^{-3}$ dyn/cm) and 21 days ($1.48x10^{-3}$dyn/cm) presented significantly lower elasticity when compared to AA cells stored for 1 day ($0.58x10^{-3}$dyn/cm), 14 days ($0.65x10^{-3}$ dyn/cm) and 21 days ($0.66 x10^{-3}$ dyn/cm) (table 16 and figura 38). Mostly of RBcs from AS units stored for 28 and 35 days were very rigid and escaped from the optical trap. So, more than 30% the cells analyzed did not stay in the trap when the velocities were increased. Hence, the accuracy of elasticity measurement was impaired. On the other hand, on days 28 and 35 control RBCs presented elasticity of $0.92x10^{-3}$ dyn/cm and $0.77x10^{-3}$ dyn/cm, respectively.

Our data corroborate with previous results (Hipp and Scott, 1974; Ould et al., 1997), that demonstrated AS cells stored in CPD for 21 days filtered less rapidly than normal controls. We conclude that stored AS RBC units have lower elasticity compared to normal control units. During RBCs storage, many cells became very rigid, suggesting that, hemoglobin S in low concentration might compromise the cell elasticity.

Tabela 16 - *Elasticity (dyn/cm) of AS and control RBC cells stored for 1, 14 and 21 days. The elasticity (μ) has been studied measuring the deformation of each cell dragged at six different and constant velocities (150, 170, 190, 210, 230, 250μm/s).*

Stored days	Elasticity- μ dyn/cmx10^{-3} Median (min-max)		p-value
	AS RBC (n=175 cells)	AA RBC (n=175 cells)	Wilcoxon*
1	0.84 (0.10-14.6)	0.58 (0.08-1.80)	0.005
14	0.81 (0.17-14.50)	0.65 (0.15-1.81)	0.020
21	1.48 (0.18-59.7)	0.66 (0.07-3.41)	<0.001

Wilcoxon rank-sum test *(Splus 2000 – Mathsoft, Seattle, WA)*

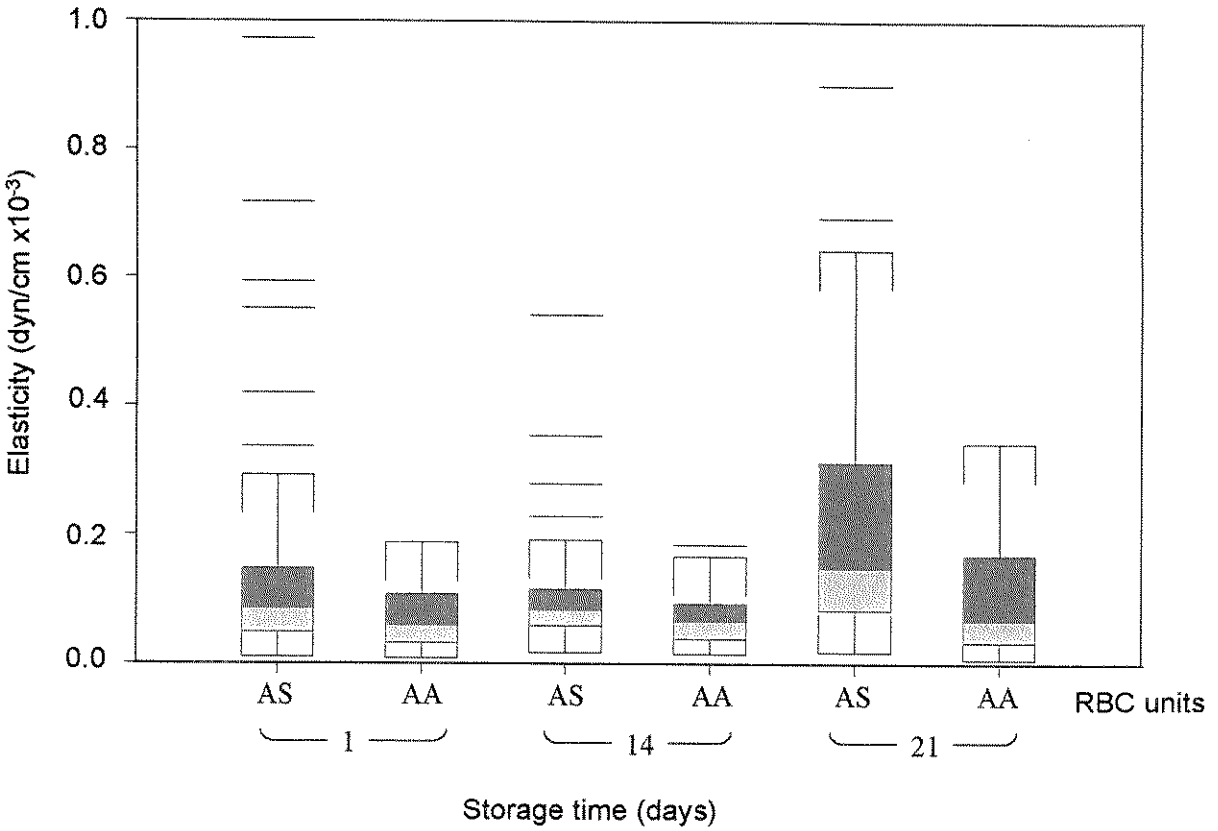


figura 38 - *Box-and-whisker plot comparing the distribution of elasticity (dyn/cm) of 175 RBCs from AS units and 175 cells from control units (AA), during storage period on days 1, 14 and 21. The plot shows a box defined by the lower and upper quartiles and the elasticity median marked by a subdivision of the box.*

12 - Discussão

A metodologia padronizada para este projeto apresentou-se muito eficiente, com alto grau de reprodutibilidade e com uma sensibilidade maior do que os métodos de averiguação das propriedades mecânicas das hemácias comumente utilizadas. Algumas técnicas, tais como filtração e ectacitometria, provam ser úteis na delineação das bases do comportamento reológico anormal de populações celulares(Mohandas and Evans, 2000). Entretanto, falham ao providenciar detalhes das propriedades reológicas de células vermelhas individuais, não possibilitando uma definição completa das conseqüências fisiológicas da deformabilidade anormal (Mohandas and Hebbel, 1994). Em geral, os campos de força e as formas aplicadas nas células nestas técnicas não são axialmente simétricas, isto significa que a modelagem dos resultados experimentais requer análises extremamente complicadas envolvendo excessiva computação numérica e aproximações grosseiras.

Cada uma das técnicas citadas acima se baseia em um critério particular da deformabilidade celular que pode envolver apenas um aspecto do comportamento reológico. Por exemplo, os métodos de filtração são apenas qualitativos (Mohandas and Evans, 2000), medindo apenas a capacidade da célula de passar por aberturas menores do que seu diâmetro. A técnica de micropipeta avalia a deformação do eritrócito com o mesmo embasamento, mas, é aplicada a uma célula por vez sobre condições de *stress* definidas (Mohandas et al., 1980), e permite apenas a análise das características intrínsecas do material constituinte da membrana celular (Evans and La Celle, 1975).

Devido à consistência líquida da solução de hemoglobina encontrada no interior dos eritrócitos, a capacidade de deformação é regularmente associada com a elasticidade da membrana celular (Evans, 1983). Mas, em seu trabalho de distribuição de moléculas de O_2 pelo organismo, o eritrócito está sujeito a forças tanto em sua membrana como em seu interior. Assim, a resposta mecânica dos eritrócitos deve ser vista como a interação citoplasma – membrana.

É válido notar que a medida das propriedades mecânicas das células com a técnica de pinça óptica apresenta diferença na grandeza da elasticidade comparada a outras técnicas, e chega a ser 10 vezes menor do que a apresentada na literatura (Mohandas and Hebbel, 1994). Este fato pode ser explicado comparando-se a pinça com a técnica de

micropipetas. Nesta técnica, uma célula vermelha é aspirada por um capilar, com aproximadamente 4μm de diâmetro interno, gerando uma dobra na membrana celular (Evans and La Celle, 1975). Sabendo-se o quanto esta membrana entra pelo capilar e a força aplicada para se sugar esta, a elasticidade é medida. Esta diferença na grandeza medida foi também observada por Sleep *et al* utilizando pinça óptica dupla para capturar e aplicar diferentes forças a esferas acopladas à hemácias desprovidas de seu conteúdo citoplasmático (Sleep et al., 1999). Para exemplificar o processo de cálculo desta elasticidade tomaremos como modelo a figura 39 .

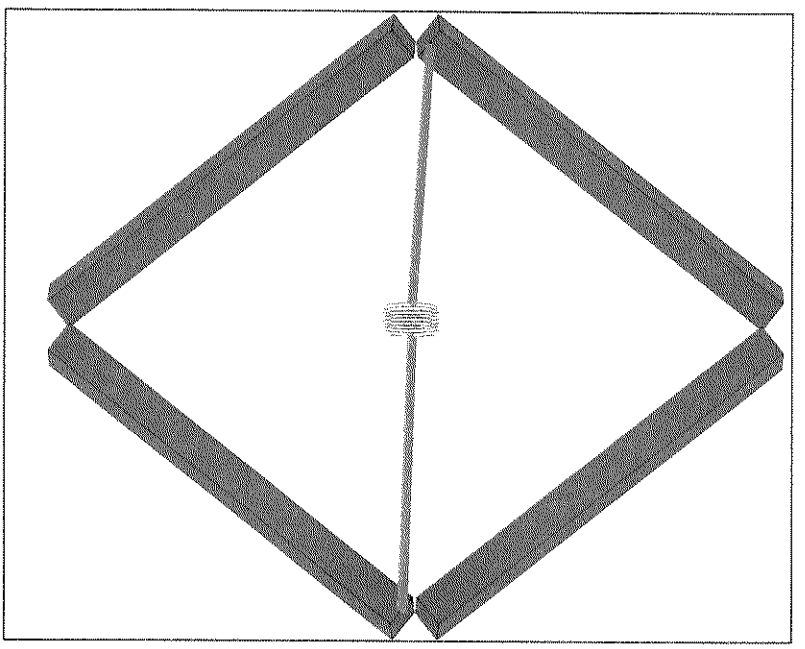


figura 39 - *Modelo representativo: as barras diagonais vermelhas representam a membrana celular, as duas linhas verdes perpendiculares o interior celular.*

Neste modelo a hemácia é representada por quatro barras (membrana celular) e duas linhas perpendiculares ligadas por uma mola com constante elástica *k* (interior celular). Ao utilizarmos a técnica de micropipetas apenas uma pequena porção de uma barra é sugada, sem causar deformabilidade no restante celular, até atingir o equilíbrio, ou seja até que a força aplicada pela sucção seja igual a constante elástica da membrana (figura 40).

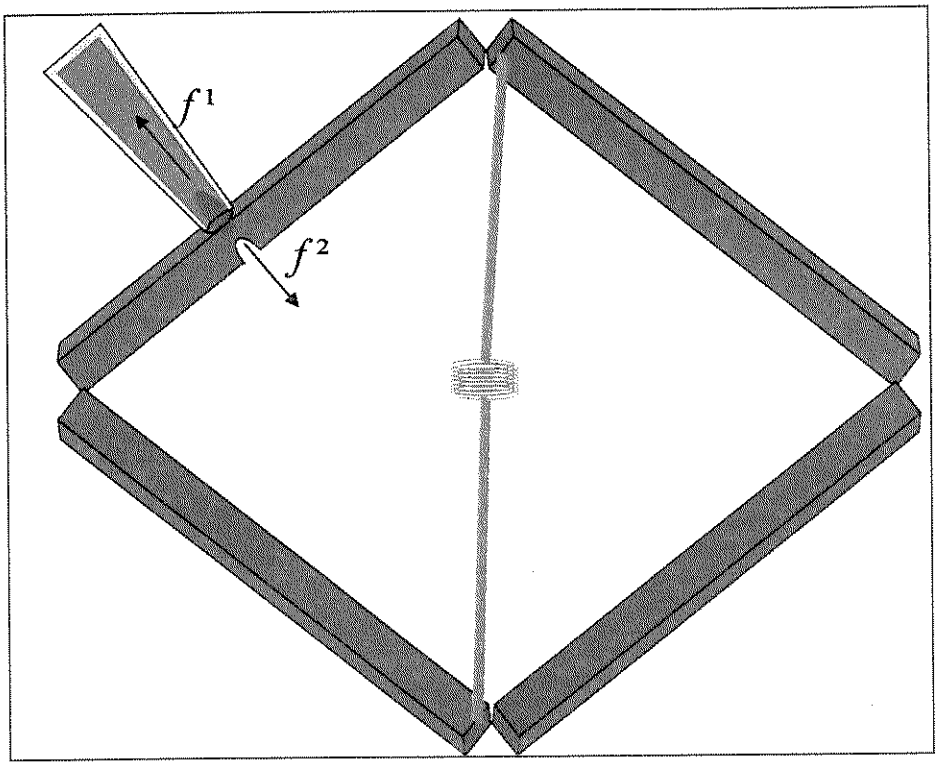


figura 40 - *Representação do equilíbrio onde* $f_1 = f_2 = \mu_{membrana}$.

Se analisarmos apenas uma porção da membrana que se distende para dentro do capilar teremos que $f_1 = f_2 = \mu_{membrana}$, onde μ = elasticidade da barra, f^1 = Força gerada pela pressão negativa da micropipeta e f^2 Força da elasticidade (figura 41).

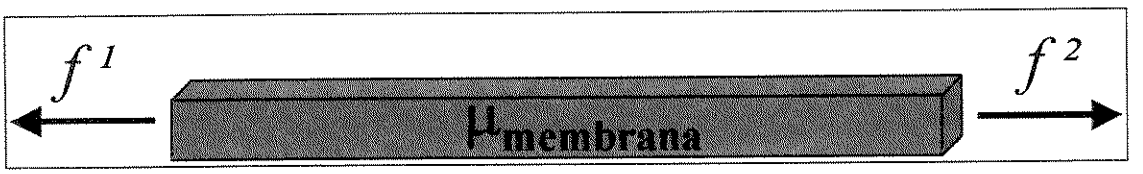


figura 41 - *Representação de uma porção da membrana, onde* $f1 = f2 = \mu_{membrana}$.

Assim não é levado em consideração o conteúdo do interior celular, o qual tem muito mais importância para a fisiologia do organismo.

No método da pinça óptica uma força f_1 é aplicada sobre um dos lados do nosso modelo e o conjunto é arrastado sobre um fluido de viscosidade η gerando uma alteração na forma celular sem, contudo, modificar seu volume (figura 42).

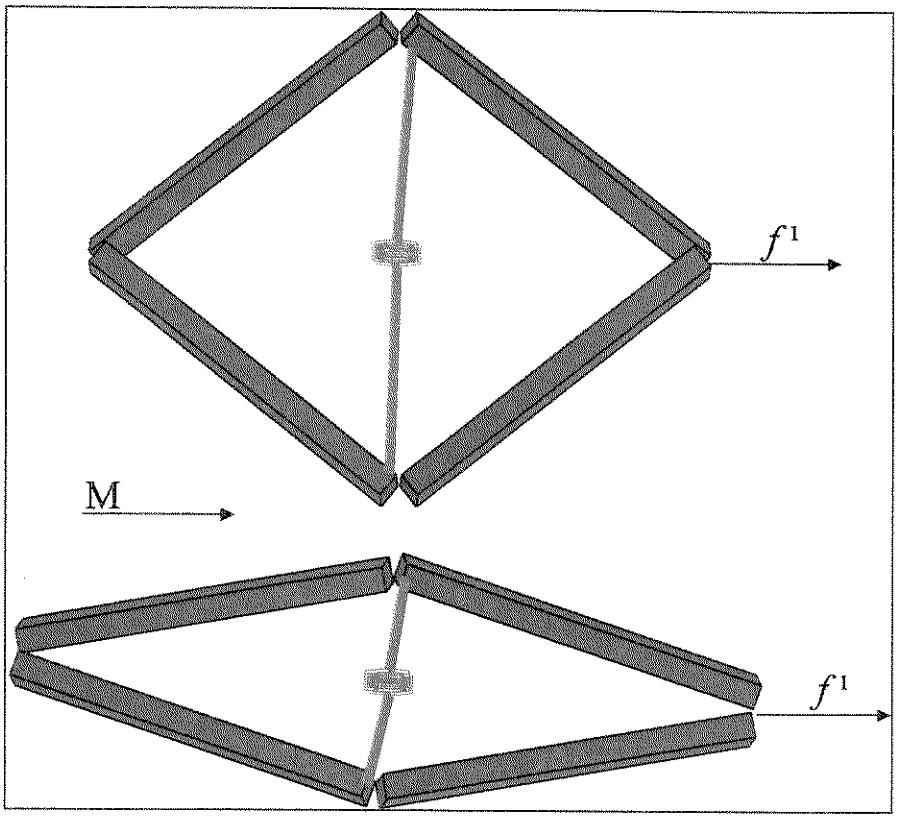


figura 42 - *Modelo da distensão celular causado pela aplicação da força f_1, M = sentido do movimento.*

O conjunto se distende até que a constante de elasticidade *k* (conteúdo intracelular) se iguale a f_1. Assim nossos dados refletem a distensão do interior celular resultante de uma Força aplicada ao conjunto membrana - interior celular.

Para que possamos analisar a distensão total da célula seria necessário aplicar uma força que fosse capaz de ultrapassar o *k* do modelo e o μ da membrana. A figura 43 representa um gráfico hipotético mostrando os dados da força aplicada *vs* comprimento celular, onde as condições acima foram atingidas. A força máxima aplicada com uma pinça óptica é insuficiente para gerar uma distorção capaz de remodelar da forma do envelope celular (Sleep et al., 1999).

Deste modo, o método de pinça óptica, por avaliar a deformabilidade da hemácia com base na combinação das elasticidades da membrana e do interior celular, em relação à viscosidade do plasma, é mais fidedigna para o estudo das propriedades mecânicas das células na corrente circulatória.

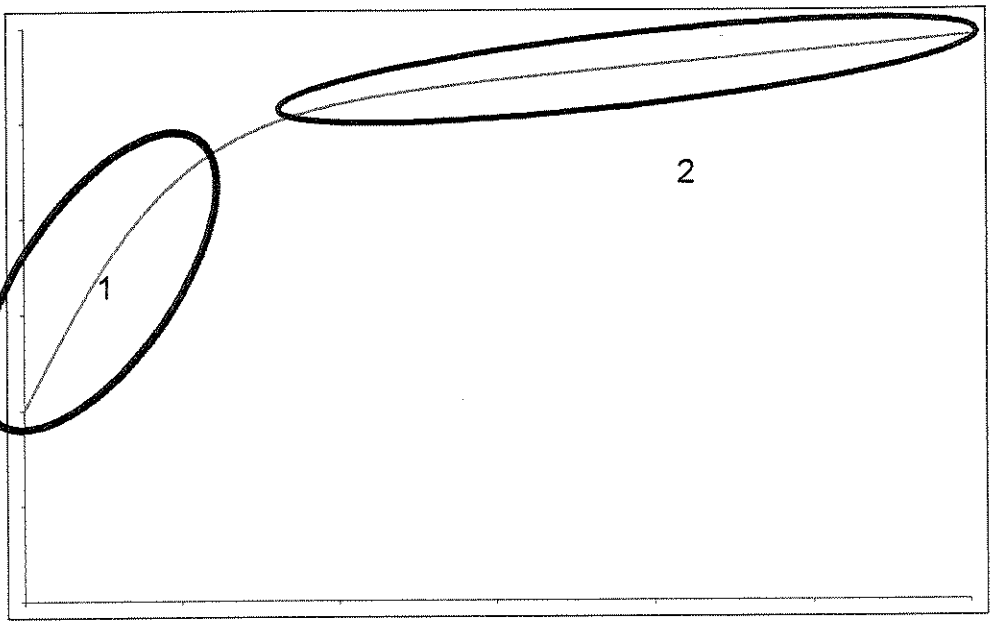


figura 43 - *Gráfico representando a velocidade da corrida (força aplicada) vs comprimento celular. A região 1 indica a área onde são feitas as análises deste projeto, sem atingir o μ da membrana e o k máximo. A região 2 indica que estes valores já foram ultrapassados.*

A grandeza medida com a pinça óptica pode ser denominada "elasticidade aparente" ou "elasticidade total" da hemácia em lugar de elasticidade da membrana da hemácia que é uma grandeza bem definida. Isso porque com esta técnica é possível analisar a estrutura da hemácia como um todo e não apenas a elasticidade intrínseca de sua membrana.

Alguns estudos com células vermelhas alteradas auxiliam em desvendar os efeitos dos vários componentes da membrana e do citoplasma, como a hemoglobina, sobre o comportamento mecânico da célula como um todo. Foi observado que o aumento da concentração de hemoglobina em células falcêmicas causa um aumento na rigidez celular, fato não observado em células normais (Evans et al., 1984). A hidratação celular e diminuição da concentração de hemoglobina, em células falcêmicas, implicam em um aumento da interação da hemoglobina S com a membrana causando um comportamento reológico anômalo. Esta observação deriva do fato de que membranas vindas de células normais quando preenchidas com hemoglobina S apresentam maior rigidez do que quando preenchidas com hemoglobina normal, mesmo vinda de outras células normais (Evans and Mohandas, 1987).

Os resultados obtidos neste estudo com a análise de células com traço falciforme estocadas corroboram os dados de Hipp e Scott (Hipp and Scott, 1974) e de Amar *et al.*

(Amar et al., 1996). Estes, utilizando o método de filtração, demonstraram que células HbAS estocadas por 21 dias a 4°C em CPD (Hipp and Scott, 1974) e SAG-manitol (Amar et al., 1996) apresentam, em todos os dias de estocagem, um tempo de filtração maior quando comparado ao grupo controle, ou seja as células se mostraram menos deformáveis. O mesmo resultado foi observado por Bodensteiner (Bodensteiner, 1994), Ould (Ould et al., 1997) e Gorlin (Gorlin and Gudino, 2001) utilizando filtros para redução de células brancas em bolsas de doação de sangue de portadores de HbAS.

Com a pinça óptica também foi possível analisar o comportamento de células irradiadas com radiação gama (γ-rad) estocadas por 28 dias em relação a células não irradiadas estocadas pelo mesmo período. Os resultados estão de acordo com estudos anteriores (Cicha et al., 2000; Suzuki et al., 2000) que demonstraram uma menor deformabilidade das células γ-rad quando comparadas a células não irradiadas. Pela pinça óptica foi possível ver que esta diferença começa a aparecer após 14 dias de estocagem, chegando ao seu pico em 21 dias, onde as células γ-rad apresentam uma perda significativa da sua capacidade de deformação.

Em relação aos portadores de HbS, tanto homozigotos (HbSS) como heterozigotos (HbAS) apresentaram hemácias significativamente menos deformáveis do que as do grupo controle. Ambas populações apresentam uma ampla distribuição da deformabilidade celular. Reid e Obi (1982) utilizando a metodologia de filtração, demonstraram que células HbSS não apresentavam índice de deformação, enquanto células HbAS apresentavam índice 50% menor que o do grupo controle. E ainda, Hiruma *et al.* demonstraram que tanto células HbSS como HbAS apresentam alteração na filtração mesmo com morfologia celular normal em um ambiente oxigenado, sugerindo que a morfologia celular não está tão intimamente ligada à alteração das características mecânicas das células (Hiruma et al., 1995). Por outro lado, as hemácias de pacientes HbSS tratados com hidroxiureia (HU) por pelo menos 6 meses apresentaram deformabilidade semelhante a dos controles normais.

A hidroxiureia vem sendo utilizada no tratamento de portadores de anemia falciforme, estimulando a produção de hemoglobina fetal nestes pacientes. Ballas *et al,* utilizando um ectacitômetro, demonstraram que, *in vivo*, a HU provoca uma melhora na deformabilidade celular, bem como promove um aumento da hidratação das células (Ballas et al., 1989; Engstrom and Lofvenberg, 1998). Gulley *et al* demonstraram que a deformabilidade celular é fortemente influenciada pelo grau de hidratação, e que, um

aumento ou diminuição na hidratação resulta em uma alteração da deformabilidade (Gulley et al., 1982). Com todos os refinamentos técnicos presentes na pinça óptica (tanto no aparato óptico como no de análise computacional) foi possível, pela primeira vez, caracterizar a ação da hidroxiureia na deformabilidade celular de pacientes homozigotos para hemoglobina S (Brandao et al., 2003). Assim, a determinação precisa das propriedades mecânicas dos eritrócitos pode ser válida para o monitoramento da resposta dos pacientes a hidroxiureia ou outras drogas utilizadas para o tratamento destes doentes.

Ainda, novos resultados foram apresentados para a descrição do comportamento das células com anemia ferropriva.

Não há um consenso na literatura quanto ao comportamento mecânico das hemácias com anemia ferropriva. Alguns autores sugerem uma diferença na deformabilidade celular comparada a células normais (Tillmann and Schroter, 1980; Yip et al., 1983; Reinhart, 1992; Kubota et al., 1996; Anderson et al., 2000) enquanto outros apontam para o oposto (Birgegard et al., 1984; Bareford et al., 1988). Embora Yip *et al.* (Yip et al., 1983) tenham demonstrado que a membrana celular de portadores de ferropriva seja menos deformável que o normal, esta anormalidade é, aparentemente, compensada pela redução de seu tamanho e quantidade de hemoglobina (Aarts et al., 1983). Entretanto, a um mesmo nível de hematócrito, o sangue de pacientes com anemia ferropriva tem a mesma viscosidade do que o normal (Spivak, 2002). No nosso estudo, a análise da elasticidade mostrou a presença de células, de pacientes com anemia ferropriva, com menor deformabilidade do que aquela apresentada pelo grupo controle (figura 35) e uma pequena população de células com maior deformabilidade. Esta maior deformabilidade pode estar ligada ao fato de que, neste tipo de anemia, existem populações de hemácias ainda normocíticas mas com hipocromia (Anderson et al., 2000). Assim, esta maior deformabilidade estaria mais relacionada à falta de conteúdo interno das células do que com uma "melhora" do quadro reológico. Por outro lado, a menor deformabilidade estaria relacionada à presença de células microcíticas.

A pinça óptica apresentou suas limitações quando foram realizados experimentos com células muito rígidas, como no caso dos esferócitos e de células de pacientes com crise falcêmica. Em ambos os casos não foi possível realizar as corridas necessárias para as análises devido às células não permanecerem aprisionadas pela armadilha óptica durante todo o experimento, seja por se soltarem desta ou por ruptura da membrana celular, ou ainda, por não apresentarem nenhuma alteração que tornasse possível a

realização dos cálculos matemáticos. Possivelmente, esta limitação pode ter causado, também, o comportamento anômalo das células com traço falciforme estocadas por mais de 21 dias. Assim, nos dias 28 e 35 de estocagem não foi possível ter uma visão correta das características mecânicas das células com traço falciforme.

Em pacientes com esferocitose hereditária, a deformabilidade celular é determinada pela redução da área de superfície celular e aumento da viscosidade interna (Mohandas et al., 1980) uma vez que os esferócitos apresentam deformabilidade da membrana celular normal (Nakashima and Beutler, 1979). Estes estudos foram realizados utilizando-se a técnica de ectacitometria e difração de laser, todos realizados no final da década de 70, e apresentaram os esferócitos como sendo muito mais rígidos do que células normais. Sleep *et al* observou que a característica elástica das células está relacionada a ligação entre as espectrinas formando uma rede contínua acoplada à membrana, a interrupção da desta rede por dissociação dos tetrâmeros da espectrina ou retirada da junção de actina gera uma redução na rigidez celular (Sleep et al., 1999).

No nosso estudo observamos que na crise de falcização havia uma grande população de células muito alteradas que não podiam ser capturadas pelo laser. Observamos também que algumas células, quando capturadas elogavam-se imediatamente, como num processo de falcização e não mais se deformavam. Por outro lado algumas destas células rompiam-se à ação do laser. Ballas e Smith (Ballas and Smith, 1992), usando ectacitometria, demonstraram uma maior elasticidade das células de pacientes com crise falcêmicas quando comparadas com os controles, bem como uma menor resistência da membrana celular. Ballas ainda demonstrou que, a gravidade da crise falcêmica está intimamente relacionada com o índice de deformabilidade dos eritrócitos e pacientes com deformabilidade celular reduzida apresentam uma forma mais branda da doença (Ballas, 1991). Na verdade, acreditamos que estas células que Ballas considerou mais deformáveis, são células mais alteradas e que se rompem durante a ectacitometria , invalidando o resultado.

Com o decorrer dos experimentos uma variável tornou-se importante: a quantidade de células que completam um experimento, ou seja a porcentagem das células que o laser consegue manter aprisionada durante a realização da corrida sem alterar sua morfologia ou sem desprendimento da armadilha óptica. A conclusão de um experimento está diretamente relacionada à rigidez da célula e o resultado final é fortemente afetado caso ocorra uma perda significativa das células durante uma corrida. Células muito alteradas

não podem ser capturadas pela pinça óptica e são perdidas durante o experimento, de modo que apenas as células com melhor comportamento mecânico conseguem finalizar os estudos, prejudicando a análise global.

Finalmente, a pinça óptica se mostrou bastante sensível e eficaz para o estudo da ação de drogas na deformabilidade celular de pacientes homozigotos para hemoglobina S, bem como estudar o desempenho mecânico das células com traço falcêmico e de pacientes com anemia ferropriva. Foi também útil para verificar os efeitos da estocagem e irradiação de bolsas de doação de sangue. Entretanto, este método se mostrou incapaz de analisar hemácias muito alteradas, como de pacientes com crise falcêmica, de portadores de esferocitose hereditária e de portadores de traço falciforme estocados por mais de 21 dias. Nestas situações não foi possível o aprisionamento de tais células pela armadilha óptica por tempo suficiente para a realização dos experimentos ou sofreram alterações em sua integridade durante a análise.

Portanto, a metodologia de pinça óptica pode ser muito útil para se verificar o efeito de outras drogas na deformabilidade de hemácias normais ou em pacientes com alterações da hemoglobina ou da membrana celular e também, estudar o efeito de diferentes conservantes para estocagem de hemácias.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

13 - Conclusões

- Com o auxílio dos softwares gerados para este projeto, é possível se analisar as propriedades mecânicas de hemácias com certa rapidez e alta precisão;
- A pinça óptica é sensível bastante para o acompanhamento da ação de drogas no comportamento mecânico das hemácias;
- É possível, também, se acompanhar a deformabilidade de células armazenadas em bolsas de doação de sangue, irradiadas ou não;.
- A acuidade dos dados, no caso de bolsas de doação, está ligada ao tempo de estocagem e ao tipo de célula;
- Com a tecnologia e metodologia apresentada, não é possível a análise de células com deformabilidade muito comprometida;

14 - Referências

Aarts PA, Bolhuis PA, Sakariassen KS, Heethaar RM, Sixma JJ. 1983. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. Blood 62:214-217.

Adewuyi JO, Awarun JA. 1990. Deformability of stored normal and sickle haemoglobin erythrocytes. Afr.J.Med.Med.Sci. 19:115-119.

Amar AK, Kerob-Bauchet B, Robert P, Leconte C, Maier H, Bera O, Plumelle Y, Hyronimus JC, Cesaire R. 1996. Assessment of qualitative functional parameters of stored red blood cells from donors with sickle cell trait (AS) or with heterozygote (AC) status. Transfus.Clin.Biol. 3:225-233.

Anand AJ, Dzik WH, Imam A, Sadrzadeh SM. 1997. Radiation-induced red cell damage: role of reactive oxygen species. Transfusion 37:160-165.

Anderson C, Aronson I, Jacobs P. 2000. Erythropoiesis: Erythrocyte Deformability is Reduced and Fragility increased by Iron Deficiency. Hematol 4:457-460.

Ashkin A. 1991. The study of cells by optical trapping and manipulation of living cells using infrared laser beams. ASGSB.Bull. 4:133-146.

Ashkin A, Dziedzic JM. 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. Science 235:1517-1520.

Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. Optic Lett 11:288-290.

Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature 330:769-771.

Baldwin ML, Jefferies LC, American Association of Blood Banks. 1992. Irradiation of blood components. Bethesda, Md.: American Association of Blood Banks.

Ballas SK. 1991. Sickle cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. Am.J.Hematol. 36:122-130.

Ballas SK, Dover GJ, Charache S. 1989. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. Am.J.Hematol. 32:104-111.

Ballas SK, Saidi P, Constantino M. 1976. Reduced erythrocytic deformability in megaloblastic anemia. Am.J.Clin.Pathol. 66:953-957.

Ballas SK, Smith ED. 1992. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. Blood 79:2154-2163.

Barabino GA, McIntire LV, Eskin SG, Sears DA, Udden M. 1987. Endothelial cell interactions with sickle cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow. Blood 70:152-157.

Bareford D, Stone P, Girling A, Stuart MJ. 1988. Influence of erythrocyte anisocytosis on filterability through 3 μm diameter pores. Clinical Hemorheology 8:191-196.

Barjas-Castro ML, Brandao MM, Fontes A, Costa FF, Cesar CL, Saad ST. 2002. Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. Transfusion 2002.Sep.;42.(9.):1196.-9. 42:1196-1199.

Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. 2001. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J.Surg.Res.2002.Jan.;102.(1.):6.-12. 102:6-12.

Berry RM, Berg HC. 1997. Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers. Proc Natl Acad Sci U S A 94:14433-14437.

Bessis M, Mohandas N, Feo C. 1980. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. Blood Cells 6:315-327.

Beutler E, Williams WJ. 1995. Williams hematology, 5th / ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.

Birgegard G, Carlsson M, Sandhagen B, Mannting F. 1984. Does iron deficiency in treated polycythemia vera affect whole blood viscosity? Acta Med.Scand. 216:165-169.

Bodensteiner D. 1994. White cell reduction in blood from donors with sickle cell trait. Transfusion 34:84.

Brandao MM, Fontes A, Barjas-Castro ML, Barbosa LC, Costa FF, Cesar CL, Saad ST. 2003. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. Eur J Haematol 70:207-211.

Bronkhost PJH, Streekstra GJ, Nijhof EJ, Sixma JJ, Brakenhoff GJ. 1995. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. Biophys.J. 69:1666-1673.

Buer CS, Gahagan KT, Swartzlander GA, Jr., Weathers PJ. 1998. Insertion of microscopic objects through plant cell walls using laser microsurgery. Biotechnol Bioeng 60:348-355.

Button LN, DeWolf WC, Newburger PE, Jacobson MS, Kevy SV. 1981. The effects of irradiation on blood components. Transfusion 21:419-426.

Card RT, Mohandas N, Perkins HA, Shohet SB. 1982. Deformability of stored red blood cells. Relationship to degree of packing. Transfusion 22:96-101.

Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Shiba M, Muraoka M, Tadokoro K, Maeda N. 2000. Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. Vox Sang. 79:75-82.

Dai J, Sheetz MP. 1998. Cell membrane mechanics. In: Sheetz MP, editor. Laser optical tweezers in cell biology, 1 ed. San Diego, CA, USA: Academic Press. p 157-171.

Davey RJ, McCoy NC, Yu M, Sullivan JA, Spiegel DM, Leitman SF. 1992. The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival. Transfusion 32:525-528.

De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F, Tchernia G, Cynober T, Alper S, Platt O, Beuzard

Y, Brugnara C. 1997. Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. J.Clin.Invest. 100:1847-1852.

Dobbe JG, Hardeman MR, Streekstra GJ, Strackee J, Ince C, Grimbergen CA. 2002. Analyzing red blood cell-deformability distributions. Blood Cells Mol.Dis.2002.May.-Jun.;28.(3.):373.-84. 28:373-384.

Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. 1992. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. Biophys.J. 63:774-783.

Engstrom KG, Lofvenberg E. 1998. Treatment of myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability. Blood 91:3986-3991.

Evans E, Mohandas N, Leung A. 1984. Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. Major influence of cell hemoglobin concentration. J.Clin.Invest. 73:477-488.

Evans EA. 1983. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. Biophys.J. 43:27-30.

Evans EA. 1989. Structure and deformation properties of red blood cells: concepts and quantitative methods. Methods Enzymol. 173:3-35.:3-35.

Evans EA, La Celle PL. 1975. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. Blood 45:29-43.

Evans EA, Mohandas N. 1987. Membrane-associated sickle hemoglobin: a major determinant of sickle erythrocyte rigidity. Blood 70:1443-1449.

Felgner H, Frank R, Schliwa M. 1996. Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. J Cell Sci 109 (Pt 2):509-516.

Gorlin JB, Gudino MD. 2001. Transfusion medicine illustrated. A sticky situation: WBC reduction of RBCs from donors with sickle cell trait. Transfusion 2001.Oct.;41.(10.):1192. 41:1192.

Groner W, Mohandas N, Bessis M. 1980. New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ektacytometer. Clin.Chem. 26:1435-1442.

Gulley ML, Ross DW, Feo C, Orringer EP. 1982. The effect of cell hydration on the deformability of normal and sickle erythrocytes. Am.J.Hematol. 13:283-291.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1985. Free radicals in biology and medicine. Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press.

Havell TC, Hillman D, Lessin LS. 1978. Deformability characteristics of sickle cells by microelastimetry. Am.J.Hematol. 4:9-16.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. 1980. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. J Clin Invest 65:154-160.

Helmerson K, Kishore R, Phillips WD, Weetall HH. 1997. Optical tweezers-based immunosensor detects femtomolar concentrations of antigens. Clin Chem 43:379-383.

Hipp MJ, Scott RB. 1974. Altered filterability of CPD-stored sickle trait donor blood. Transfusion 14:447-452.

Hiruma H, Noguchi CT, Uyesaka N, Hasegawa S, Blanchette-Mackie EJ, Schechter AN, Rodgers GP. 1995. Sickle cell rheology is determined by polymer fraction--not cell morphology. Am.J.Hematol. 48:19-28.

Hochmuth RM, Worthy PR, Evans EA. 1979. Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity. Biophys.J. 26:101-114.

Hoffbrand AV, Pettit FE. 1993. Essential Haematology, 3 ed. London UK: Blackwell Science.

REFERÊNCIAS

Huruta RR, Barjas-Castro ML, Saad ST, Costa FF, Fontes A, Barbosa LC, Cesar CL. 1998. Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers. Blood 92:2975-2977.

Itoh T, Chien S, Usami S. 1995. Effects of hemoglobin concentration on deformability of individual sickle cells after deoxygenation. Blood 85:2245-2253.

Jeter EK, Gadsden RH, Cate JCt. 1991. Irradiation effect on aging red blood cells. Ann Clin Lab Sci 21:420-425.

Johnson RM. 1989. Ektacytometry of red blood cells. Methods Enzymol. 173:35-54.:35-54.

Konig K, Svaasand L, Liu Y, Sonek G, Patrizio P, Tadir Y, Berns MW, Tromberg BJ. 1996. Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 42:501-509.

Kozlov MM, Markin VS. 2000. Model of red blood cell membrane skeleton: eletrical and mechanical properties. J.Theor.Biol. 129:439-452.

Kubota K, Tamura J, Shirakura T, Kimura M, Yamanaka K, Isozaki T, Nishio I. 1996. The behaviour of red cells in narrow tubes in vitro as a model of the microcirculation. Br J Haematol 94:266-272.

Kuypers FA, Scott MD, Schott MA, Lubin B, Chiu DT. 1990. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. J.Lab.Clin.Med. 116:535-545.

Menitov JE. 1999. Standards for blood banks and transfusion services, 19th ed: American Association of Blood Banks.

Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. 1980. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. J.Clin.Invest. 66:563-573.

Mohandas N, Evans E. 2000. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular and genetic defects. Annu.Rev.Biomol.Struct. 23:787-818.

Mohandas N, Hebbel RP. 1994. *Erythrocyte Deformability, Fragility, and Rheology*. In: Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, editors. Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice. New York: Raven Press LTDA. p 205-215.

Moroff G, Luban NL. 1994. The influence of gamma irradiation on red cell and platelet properties. Transf. Sci. 15:141-148.

Nakashima K, Beutler E. 1979. Erythrocyte cellular and membrane deformability in hereditary spherocytosis. Blood 53:481-485.

Nash GB. 1991. Red cell mechanics: what changes are needed to adversely affect in vivo circulation. Biorheology. 28:231-239.

Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ. 1988. Rheologic impairment of sickle RBCs induced by repetitive cycles of deoxygenation-reoxygenation. Blood 72:539-545.

Obruca A, Strohmer H, Blaschitz A, Schonickle E, Dohr G, Feichtinger W. 1997. Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. Hum Reprod 12:2242-2245.

Ould AA, Cesaire R, Kerob-Bauchet B, Robert P, Maier H, Bucher B. 1997. Altered filterability of fresh sickle cell trait donor blood. Vox Sang. 73:55-56.

Pearson TC. 2001. Hemorheology in the erythrocytoses. Mt.Sinai.J.Med.2001.May.;68.(3.):182.-91. 68:182-191.

Platt OS. 1990. The sickle syndrome. In: Hadin RA, Lux SE, Stossel TP, editors. Blood: Principles and Practice of hematology, 5 ed. New York: Mcgraw hill. p 10-11.

Pryor WA. 1976. Free radicals in biology. New York: Academic Press.

Ramirez AM, Woodfield DG, Scott R, McLachlan J. 1987. High potassium levels in stored irradiated blood. Transfusion 27:444-445.

Reid HL, Obi GO. 1982. A study of erythrocyte deformability in sickle cell disease. Trop.Geogr.Med. 34:43-46.

Reinhart WH. 1992. The influence of iron deficiency on erythrocyte deformability. Br.J.Haematol. 80:550-555.

Sakata-Sogawa K, Kurachi M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Tashiro H. 1998. Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. Eur Biophys J 27:55-61.

Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ. 2002. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. Blood 99:1564-1571.

Shohet SB, Mohandas N. 1988. Methods in Hematology:Red Cell Membranes. London, UK: Churchill Livingstone.

Sleep J, Wilson D, Simmons R, Gratzer W. 1999. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. Biophys.J. 77:3085-3095.

Smith CM, Kuettner JF, Tukey DP, Burris SM, White JG. 1981. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. Blood 58:71-77.

Spivak JL. 2002. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. Blood 100:4272-4290.

Stokke BT, Mikkelsen A, Elgsaeter A. 1986. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. III. Micropipette aspiration of unswollen erythrocytes. J.Theor.Biol. 123:205-211.

Stokke BT, Mikkelsen A, Elgsaeter A. 2000. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic Gel. III. micropipet aspiration of unswollen erythrocytes. J.Theor.Biol. 123:205-211.

Sugiura S, Kobayakawa N, Fujita H, Yamashita H, Momomura S, Chaen S, Omata M, Sugi H. 1998. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation. Circ Res 82:1029-1034.

Sutera SP, Gardner RA, Boylan CW, Carroll GL, Chang KC, Marvel JS, Kilo C, Gonen B, Williamson JR. 1985. Age-related changes in deformability of human erythrocytes. Blood 65:275-282.

Suzuki Y, Seiyama A, Tateishi N, Yamanishi S, Maeda N. 1993. Rheological evaluation of X-ray irradiated blood. Vox Sang 64:139-144.

Suzuki Y, Tateishi N, Cicha I, Shiba M, Muraoka M, Tadokoro K, Maeda N. 2000. Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium. Clin Hemorheol Microcirc 22:131-141.

Thomas N, Thornhill RA. 1998. The physics of biological molecular motors. J Phys D Appl Phys 31:253.

Tillmann W, Schroter W. 1980. Deformability of erythrocytes in iron deficiency anemia. Blut 40:179-186.

Voet D, Voet JG. 1995. Biochemistry, 2nd ed. New York: J. Wiley & Sons.

Williamson LM, Warwick R. 1995. Transfusion-associated graft- versus-host disease and its prevention. Blood Reviews 9:251-261.

Yip R, Mohandas N, Clark MR, Jain S, Shohet SB, Dallman PR. 1983. Red cell membrane stiffness in iron deficiency. Blood 62:99-106.

15 - Anexos

15.1 - Lista de fabricantes

Computadores	DELL Computer Corp., Round Rock, TX, EUA.
Microscópio	Olympus optical Co. LTD, Tókio, Japão
Câmera CCD	JVC Company of América, Elmwood, NJ, EUA.
Software Image Pro-Pus	Media Cybernetics, Baltimore, MD, EUA.
Software MS Excel	Microsoft Corp., Richmond, CA, EUA.
Microcontrolador de movimento	Prior Scientific, Rockland, MA, EUA.
Software Labview	National Instruments Corp, Austin, TX, EUA.
Laser ND:YAG	Spectra-Physics, Mountain View, CA, EUA.
Software Adobe Premiere	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA.