

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE PINÇAS ÓPTICAS
PARA ESTUDOS DE INTERAÇÕES CELULARES – APLICAÇÕES
EM HEMOTERAPIA**

Aluno: Diego César Nunes da Silva

Orientador: Profa. Dra. Adriana Fontes

Co-orientadora: Profa. Dra. Beate S. Santos

Recife, 30 Agosto de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE PINÇAS ÓPTICAS
PARA ESTUDOS DE INTERAÇÕES CELULARES – APLICAÇÕES
EM HEMOTERAPIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Pernambuco, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do título
de mestre.

Aluno: Diego César Nunes da Silva

Orientador: Profa. Dra. Adriana Fontes

Co-orientadora: Profa. Dra. Beate S. Santos

Recife, 30 Agosto de 2010

Silva, Diego César Nunes da

Desenvolvimento de um sistema de pinças ópticas para estudos de interações celulares – aplicações em hemoterapia / Diego César Nunes da Silva. – Recife: O Autor, 2010.

62 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes

Co-Orientadora: Beate S. Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Sangue – Componentes**
- 2. Sangue – Transfusão**
- 3. Nanotecnologia I. Título.**

573.1536

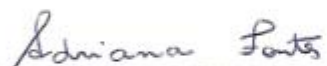
CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-094

COMISSÃO EXAMINADORA

"Desenvolvimento de um sistema de pinças ópticas para estudos de interações celulares - aplicações em hemoterapia"

TITULARES


Prof.^a Dr.^a Adriana Fontes - (Orientador/UFPE)


Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia - (UFPE)


Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra - (UFPE)

Provérbios 3:5-6 Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas.

Agradecimentos

Aos meus pais, pela compreensão e estímulo;

Às professoras: Adriana Fontes, Beate Santos e Patrícia Farias pela orientação, dedicação e apoio na elaboração deste trabalho;

Aos amigos do laboratório pela imensa ajuda e contribuição;

À Cauêh Jovino pela grandiosa ajuda e amizade;

À minha namorada Carol pelo companheirismo e carinho;

À Fundação Hemope;

À FACEPE pelo auxílio financeiro essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Resumo: A pinça óptica (PO) é uma ferramenta que utiliza luz para capturar e mover partículas. Por exercer forças da ordem de Piconewtons sob as partículas capturadas, sua principal aplicação é de interesse microscópico, especialmente no estudo de células e biomoléculas que podem ser manipuladas individualmente sem danos térmicos. Devido a essas características, a PO pode ser utilizada para medir importantes propriedades eritrocitárias, tais como elasticidade e cargas elétricas da membrana. O concentrado de hemácias (CH) é o hemocomponente mais utilizado na prática transfusional. As hemácias quando estocadas sofrem progressiva deteriorização metabólica e celular com diminuição gradual da elasticidade (μ) e da morfologia bicôncava. Por outro lado, a membrana da hemácia é carregada negativamente. Estas cargas influenciam a distribuição de íons ao redor da célula, criando um potencial elétrico repulsivo denominado potencial Zeta (ζ), que atua impedindo a agregação das hemácias na corrente sanguínea. Alterações de cargas nos eritrócitos podem refletir lesões de membrana ocorridas durante o armazenamento. Neste trabalho, realizamos a montagem do sistema de PO e estabelecemos metodologias para quantificar o ζ e μ . Aplicamos essa metodologia para medidas do ζ em hemácias recém coletadas com EDTA e, visando avaliar alterações relacionadas a lesões oxidativas do armazenamento, também realizamos um estudo temporal do ζ e da μ em células do CH coletadas com CPD/SAG-M. O ζ é obtido através da velocidade terminal das células após serem liberadas da armadilha óptica, sob diferentes voltagens. Já a μ é medida movimentando as células aprisionadas com velocidades progressivas e a máxima deformação é registrada. A μ é obtida analisando-se a deformação da hemácia em função da velocidade. Quanto maior for o valor obtido, menos elástica a hemácia. Para todos os estudos realizados, pelo menos 20 células foram analisadas. As medidas do ζ e da μ foram realizadas no primeiro dia de cada semana durante o período de 35 dias. O ζ em EDTA foi -8,0 mV. Para hemácias estocadas em CPD/SAG-M os valores do ζ foram decrescentes a partir do 1º dia de armazenamento. Os valores médios foram de -14,8 mV (1ª semana), da 2ª semana até a 4ª semana de ζ = -10,0 mV, decaindo para valores mais baixos a partir da 5ª semana, estabelecendo assim em -8,0 mV. Já para a μ , após a primeira 1ª semana, o valor médio foi $4,1 \times 10^{-4}$ dina/cm, permanecendo constante até o final da 2ª semana. Ao final da 3ª semana observou-se o valor de $4,6 \times 10^{-4}$ dina/cm, ao término da 4ª semana de $6,4 \times 10^{-4}$ dina/cm, atingindo $9,6 \times 10^{-4}$ dina/cm na 5ª semana. A redução mais acentuada do ζ na 1ª semana pode ser devido a enzimas liberadas de leucócitos lisados que podem alterar as glicoproteínas da membrana eritrocitária levando a uma redução das cargas negativas. Assim, avaliamos o efeito da leucorredução sobre as cargas elétricas das hemácias estocadas e observamos que as mesmas apresentaram o mesmo perfil de decaimento de cargas que as não deleucocitadas, mostrando que a presença de leucócitos não é a responsável por este decaimento. Visto que a maioria dos testes imunohematológicos de reação antígeno-anticorpo, realizados em bancos de sangue, são baseados no princípio de aglutinação e necessitam da diminuição do ζ para que a reação ocorra, substâncias potencializadoras como a papaína, que atuam diminuindo este ζ são empregadas rotineiramente nestes centros. Como esses testes podem ser realizados em hemácias coletadas em EDTA ou em bolsas de doação e sabendo que hemácias coletadas em EDTA apresentaram valores menores do ζ em relação às em CPD/SAG-M, avaliamos o ζ de hemácias papainizadas coletadas nestes dois meios. Os ζ foram em módulo 3,2 (EDTA) e 4,0 mV (CDP/SAG-M). Esses resultados mostram que mesmo que o ζ seja diferente inicialmente em EDTA e CPD/SAG-M, em ambos os casos ocorre a redução necessária para a que haja a aglutinação. Além disso, observamos que após o tratamento com papaína, algumas hemácias se tornam carregadas positivamente, mas o ζ continua reduzido em módulo. Em conclusão, através da PO foram estabelecidas metodologias sensíveis e capazes de quantificar importantes propriedades eritrocitárias, que poderão contribuir tanto para a compreensão dos efeitos do armazenamento nas cargas de membrana e na elasticidade das hemácias em diferentes e variadas situações, como para a padronização de técnicas de hemaglutinação na rotina transfusional, melhorando a sensibilidade da reação sem perda significativa da especificidade.

Palavras-chave: Pinça Óptica, potencial Zeta, Elasticidade

Abstract: Optical tweezers is a very sensitive tool capable of capturing and moving particles with light. As the forces involved in optical tweezers are in the Piconewtons range, its main application is in the microscopic world, especially for studying cells and biomolecules which can be manipulate without any damage. Because of these characteristics, optical tweezers can be used to measure important properties of red blood cells (RBC), such as elasticity and membrane electrical charges. Erythrocytes are the component most used for transfusion purposes. RBCs have a progressive metabolic and cellular deterioration with gradual loss of elasticity (μ) and biconcave morphology. On the other hand, RBC membrane is negatively charged. These charges can change the ions around the cell causing a repulsive electrical potential called Zeta Potential (ζ). The ζ acts preventing the RBC agglutination in the blood stream. Changes in the RBC ζ can reflect membrane damages caused by storage. In this work, we set up an optical tweezers system and propose methodologies to quantify the ζ and μ . After that, we applied these methodologies to measure the ζ of RBCs freshly collected in EDTA, and with the objective of analyzing oxidative damages caused by blood storage, we also did a temporal study of the ζ and μ in RBCs collected in CPD/SAG-M. The ζ was obtained by the measurement of the terminal velocity of the RBC after released from the optical trap for different applied voltages. The μ was measured by moving the trapped RBCs with constant progressive velocities. The μ is obtained by analyzing the cell deformations in function of the velocities. How bigger is the elasticity value, less elastic is the cell. At least 20 cells were analyzed in all the experiments. The measurements of ζ and μ were performed in the first day of each week during 35 days. The ζ in EDTA was -8.0 mV. The ζ for RBCs in CPD/SAG-M decreased from the 1^o day of storage. The ζ values were -14.5 mV (1^a week), from 2^a week to 4^a week of ζ = -10.0 mV, declining to lower values as of the 5^a week, thereby establishing at -8.0 mV. For μ , after the 1^a week, the value was 4.1×10^{-4} dyne/cm, at the end of the 3^a week it was observed the value of 4.6×10^{-4} dyne/cm, at the end of 4^a week of 6.4×10^{-4} dyne/cm. In the last week of measurement the RBCs were 134% less elastic than the first and μ was 9.6×10^{-4} dyne/cm. The marked reduction of ζ could be due enzymes released from lysate leucocytes which could change glycoproteins of RBC membrane taking to a reduction in the electrical charges. Therefore, we evaluate the leukoreduction effect in electrical charges of storage RBC membrane and observed that the measurements had the same profile showing that the presence of leucocytes is not responsible for the ζ decreasing. Although the ζ decrease intravascular agglutination, the majority of the immunohematological tests in transfusions centers are based on cell agglutination caused by antigen-antibody interactions. Frequently, it is necessary to decrease the zeta potential, through the introduction of artificial potential substances such as papain, to allow the agglutination to happen. As these tests are performed in EDTA and in CPD/SAG-M and knowing that the ζ in EDTA was smaller compared to ζ in CPD/SAG-M, we measured the ζ from RBCs treated with papain after be collected in both EDTA and CPD/SAG-M. The values were in modulus 3.2 (EDTA) and 4.0 mV (CDP/SAG-M). These results show that even though the ζ is smaller in EDTA before the treatment, after papain treatment the ζ decrease enough for allowing the agglutination. Moreover, we observed that after papain treatment, some cells become positively charged, but the ζ remains reduced in modulus. In conclusion, we could propose methodologies sensitive enough to quantify important parameters of RBCs that can help not only to the comprehension of the effects in electrical membrane charges and elasticity caused by blood storage in different conditions, but also in the standardization of automatized routines in hemotherapy improving the immunohematological tests usually performed in blood banks.

Keywords: Optical Tweezers, Zeta Potential, Elasticity

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

- Figura 1. Figura 1.** Absorção dos pigmentos melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda (Adaptado do site <http://csernigm.hu/>). 5
- Figura 2. Figura 2.** Armadilhas Ópticas: (a) armadilha de feixes contra-propagantes, onde só pode-se prender em uma dimensão, (b) levitação, onde se podem prender partículas no ar utilizando a gravidade como força de equilíbrio, (c) as pinças ópticas, onde através de uma lente convergente, pode-se capturar nas três dimensões (Adaptado de ASHKIN, 1997). 6
- Figura 3.** Esquema simplificado da aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois feixes de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la (FONTES, 1999). 7
- Figura 4. :** Pinça Óptica Dupla (dois pontos de captura) (a) “rouleaux” de hemácias, (b) hemácias deslizando entre si ao ter uma das extremidades presa e a outra arrastada, ambas pela pinça óptica, (c) máximo deslizamento entre as hemácias, mostrando uma forte adesão nas bordas (FONTES , 1999). 9
- Figura 5.** Representação esquemática do potencial Zeta (Modificada de POLLACK et al., 1977). 10
- Figura 6. :** Estrutura de uma molécula de ácido siálico. Em destaque grupo carboxil que em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), maior responsável pela eletronegatividade eritrocitária (EYLAR et al, 1962, ALBERTS et al, 1997). 10
- Figura 7.** Diagrama mostrando a mínima distância para ligação de duas hemácias com moléculas de IgG e IgM desenhadas em escala (100Å). A, B e D (Rh_0) determinantes antigênicos da membrana eritrocitária (VAN OSS et al., 1983). 12
- Figura 8.** Representação de reação de hemaglutinação. Antígenos eritrocitários e anticorpos com formação do agregado das hemácias demonstrando a reação de hemaglutinação. 13
- Figura 9.** Ação da papaína (em amarelo) e sítios de clivagem na banda 3, maior glicoproteína da membrana eritrocitária (POPOV et al., 1997). 15
- Figura 10.** Ilustração do método de aspiração por micropipeta (FONTES, 1999). 17
- Figura 11.** Elasticidade total da hemácia medida pela pinça óptica em pacientes com anemia falciforme HbSS, homozigotos HbSS tomando HU e controles normais (modificado de BRANDÃO et al., 2003). 18
- Figura 12.** Ao ser arrastada pela pinça óptica sob diferentes velocidades, podemos observar a deformabilidade sofrida pela hemácia em função de velocidades constantes (FONTES, 2005). 19

LISTA DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Tabela 1. Descrição dos efeitos do tratamento enzimático por proteases na membrana da hemácia (DANIELS, 2007).

15

SUMÁRIO:

1. CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
2. CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 PINÇAS ÓPTICAS	5
2.2 POTENCIAL ZETA	9
2.3 SUBSTÂNCIAS POTENCIALIZADORAS	12
2.4 ELASTICIDADE ERITROCITÁRIA	16
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
3. CAPÍTULO III: OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. CAPÍTULO IV: ARTIGO CIENTÍFICO	27
5. CAPÍTULO V: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	37
5.1 CONCLUSÃO	38
5.2 PERSPECTIVAS	38
6. ANEXOS:	1
ANEXO I: NORMA DA REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS	2
ANEXO II: COMPROVANTE DE ACEITE	5
ANEXO III: ATIVIDADES COMPLEMENTARES E RESUMOS DE CONGRESSOS	7
1. ESTUDO DOS COMPONENTES DE UM SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA, ADAPTAÇÕES E MONTAGEM.	8
1.1 COMPONENTES DO SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA	8
1.1.1 MICROSCÓPIO ÓPTICO SIMPLES E OBJETIVA	8
1.1.2 ESPELHOS	9

1.1.3	LASER	10
1.1.4	TELESCÓPIO	10
1.1.5	SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGEM	11
1.2	ALINHAMENTO DO SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA	11
1.3	MONTAGEM DO SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA	13
1.4	FUNCIONAMENTO DA PINÇA ÓPTICA	14
2.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE HEMÁCIAS COLETADAS EM EDTA E CPD/SAG-M COM A ENZIMA PAPAÍNA	15
2.1	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	15
2.1.1	COLETA	15
2.1.2	TRATAMENTO DAS HEMÁCIAS COM A ENZIMA PAPAÍNA	16
2.1.3	RESULTADOS	16
3.	RESUMO APRESENTADO NO 2º CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE BIOMEDICINA, 6º CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA E 2º EREMBIOM	17
4.	RESUMO APRESENTADO NO 37º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E 10º CONGRESSO DE CITOLOGIA CLÍNICA	18
5.	RESUMOS SUBMETIDOS AO CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (HEMO 2010)	19
5.1	MENSURAÇÃO TEMPORAL DO POTENCIAL ZETA EM HEMÁCIAS ARMAZENADAS UTILIZANDO PINÇAS ÓPTICAS	19
5.2	AVALIAÇÃO TEMPORAL DA ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS ARMAZENADAS EM CPD/SAG-M	20
	ANEXO IV: PRÊMIO	22

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO:

O forte desenvolvimento da biotecnologia, assim como da nanotecnologia, que ocorreu a partir da década de 1980 propiciou o desenvolvimento de novas ferramentas e técnicas capazes de manipular e extrair informações em escalas micrométricas e nanométricas de sistemas biológicos. Dentre essas ferramentas podemos destacar a pinça óptica que é uma ferramenta fotônica, ou seja, que usa luz, capaz de manipular e extrair informações celulares nas escalas micro e nanométrica, que seriam impossíveis de serem obtidas por outros métodos. Para os estudos dos processos no nível da célula, ou até mesmo sub-celular, pode-se dizer que a utilização de ferramentas fotônicas é quase obrigatória. A natureza ondulatória e corpuscular da luz permite extrair informações morfológicas, bioquímicas e biomecânicas remotamente e não destrutivamente de estruturas inerentes às células.

A pinça óptica é então uma ferramenta sensível para manipulação e medida individual, célula por célula, que pode ser usada para obter importantes propriedades de hemácias, tais como elasticidade e cargas elétricas da membrana. Propriedades mecânicas e elétricas de hemácias são parâmetros críticos para células estocadas em bancos de sangue, para testes imunohematológicos realizados na rotina transfusional e para doenças sanguíneas.

A deformabilidade, por exemplo, é um fator crucial para o desempenho das funções das hemácias na corrente sanguínea. Para levar oxigênio para todas as partes do corpo, as hemácias devem ser deformáveis, caso contrário não serão capazes de transpor vasos que são muito menores que o diâmetro das mesmas. Por outro lado, a membrana da hemácia é carregada negativamente, onde estas cargas influenciam a distribuição de íons ao redor da célula, criando um potencial elétrico repulsivo denominado potencial Zeta, que atua impedindo a agregação das hemácias na corrente sanguínea. Quanto maior for o potencial Zeta, mais difícil será a agregação intercelular. Alterações de cargas nos eritrócitos também podem refletir lesões de membrana ocorridas durante o armazenamento. Dessa forma, é relevante responder questões relacionadas à influência das condições de estocagem nos bancos de sangue através do estudo dessas propriedades elétricas e mecânicas.

Além disso, os testes imunohematológicos realizados em centros de transfusão são baseados em aglutinação causada por interações entre antígenos e anticorpos. Frequentemente é necessário se reduzir o potencial Zeta através de substâncias potencializadoras artificiais para permitir a aglutinação. Assim, uma análise das propriedades elétricas pode ajudar não só na investigação sobre danos oxidativos, como também numa melhor compreensão sobre as reações de hemaglutinação. A

identificação de anticorpos contra antígenos eritrocitários é de importância fundamental para a rotina transfusional, pois um erro pode levar a sérias reações hemolíticas.

Por essas razões, o presente projeto utilizou um sistema de pinças ópticas para medir a elasticidade e potencial Zeta de hemácias. Nós acreditamos que este estudo pode ajudar tanto no entendimento da biologia celular eritrocitária como na investigação de interações celulares que são relevantes para Hemoterapia.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 PINÇAS ÓPTICAS:

A incorporação de lasers na microscopia óptica tem colaborado consideravelmente para as mais modernas pesquisas nas áreas biomédicas com propósitos de manipulação, medida, diagnóstico e microanálise. Dentre as várias utilizações de lasers nessas áreas, destaca-se o trabalho pioneiro de Ashkin e colaboradores. Em 1986, eles demonstraram o uso de uma técnica, denominada pinça óptica, baseada na transferência de momento de fótons para capturar partículas dielétricas [ASHKIN et al., 1986]. Posteriormente, a partir de 1987, eles aplicaram essa técnica na captura e manipulação de partículas biológicas variando de décimos a centenas de micra [ASHKIN & DZIEDZIC, 1987].

A princípio, Ashkin utilizou um laser de argônio ($\lambda = 514 \text{ nm}$). Porém, devido ao alto coeficiente de absorção da radiação no comprimento de onda visível pelos tecidos e pigmentos biológicos, esse causava danos aos sistemas vivos levando-os à morte [ASHKIN & DZIEDZIC, 1987]. Passaram, então, a utilizar um laser de Nd:YAG (*Neodímio Yttrium Aluminum Garnet*) em 1064 nm. Como a maioria das substâncias que compõem os seres vivos são transparentes ao infravermelho próximo, a absorção nessa região é pequena e não há danos nesses organismos, como exemplificado na figura 1 para o comportamento de absorção dos pigmentos de hemoglobina oxigenada (HbO_2) e da melanina em função dos comprimentos de onda. Para evitar danos térmicos às partículas capturadas utiliza-se então num sistema de pinça óptica um laser no infravermelho próximo, entre 750 a 1200 nm, longe das linhas de absorção óptica tanto do visível quanto do infravermelho. Os sistemas biológicos são constituídos basicamente de água e a absorção da água começa a ser significativa a partir de 1500 nm, por isso a faixa de 750 a 1200 nm é chamada de janela biológica.

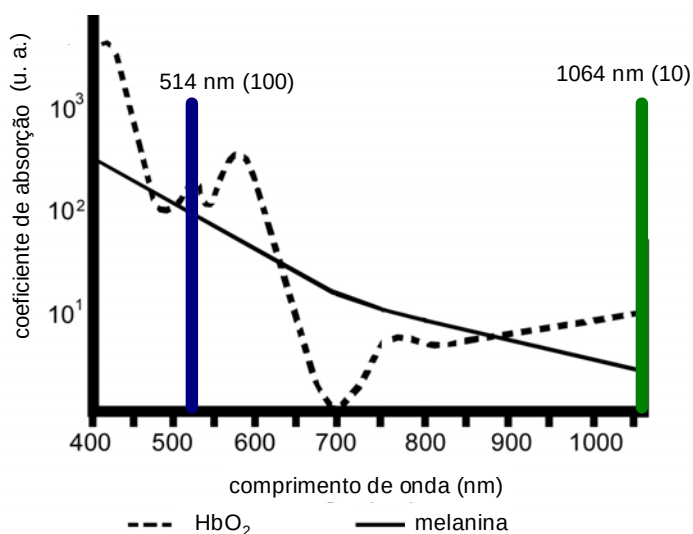


Figura 1. Absorção dos pigmentos melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda (Adaptado do site <http://csernigm.hu/>).

Ao longo dos anos foram criados vários tipos de armadilhas ópticas, como ilustrado na figura 2, mas só é chamada pinça óptica a que usa o feixe convergente, figura 2 (c). No início as armadilhas ópticas eram utilizadas para se capturar átomos, posteriormente foi então demonstrada que a mesma poderia também ser aplicada para sistemas biológicos.

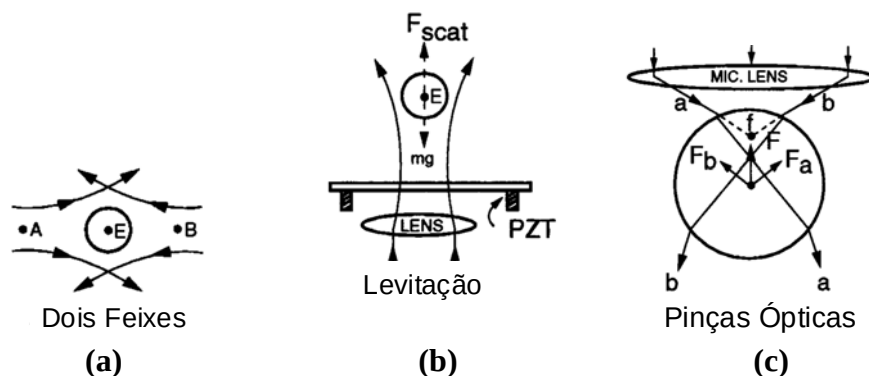


Figura 2. Armadilhas Ópticas: (a) armadilha de feixes contra-propagantes, onde só pode-se prender em uma dimensão, (b) levitação, onde se podem prender partículas no ar utilizando a gravidade como força de equilíbrio, (c) as pinças ópticas, onde através de uma lente convergente, pode-se capturar nas três dimensões (Adaptado de ASHKIN, 1997).

Hoje, a pinça óptica é considerada uma ferramenta extremamente útil em pesquisas em biofotônica, bioengenharia e nanociência [DHOLAKIA et al., 2002; SONI et al., 2002; BUSTAMANTE et al., 2003]. Artigos de revisão, tais como o de Bustamante [BUSTAMANTE et al., 2003], Block [NEUMAN & BLOCK, 2004] e de Grier [GRIER, 2003], demonstram as várias aplicações das pinças ópticas nos diversos campos de pesquisa, que vão da física até ciências da vida. A partir de então, a pinça óptica tem sido basicamente utilizada em duas vertentes: manipulação direta de células, pequenas organelas e biomoléculas (DNA, RNA e proteínas) e medidas de propriedades mecânicas (tais como: força, adesão, viscosidade, elasticidade e fluidez) desses sistemas biológicos. Como microferramenta de medida e manipulação, a pinça óptica já foi utilizada para manipulação de material genético em diferentes tipos celulares [PERKINS, 2009], mensuração do comprimento de moléculas de DNA [SAKATA et al., 1998], detecção de concentrações fentomolares e atômicas de antígenos [LALIBERTE et al., 2009], manipulação de microtúbulos para montagem dirigida de biomoléculas [DINU et al., 2009], medição de mecanismos de adesão leucocitária [WANG et al., 2004], análise da motilidade de espermatozoides [NASCIMENTO et al., 2008] e tripanossomatídeos [POZZO et al., 2009] e medidas de propriedades mecânicas e elétricas eritrocitárias [BRANDÃO et al., 2009; FONTES et al., 2008].

Uma importante função da pinça óptica é extrair a correlação existente entre o mundo mecânico e químico dos diversos sistemas biológicos, assim como de outros tipos de materiais que se apresentam na escala micrométrica e nanométrica. Sem a pinça óptica, a correlação entre esses

mundos permaneceria indefinida. A pinça óptica pode então não só disparar um evento químico através de um evento mecânico (como a produção de cálcio nas células ósseas através de sua deformação mecânica pelas pinças ópticas), como também quantificar o reflexo de uma alteração química através da medida de propriedades mecânicas. Isso exemplifica a importância fundamental que hoje se dá a essa ferramenta e também justifica a sua ampla utilização. Os recentes trabalhos de Suresh [SURESH et al., 2005] e Huang [HUANG & KAMM, 2004] também demonstram a importância de se estudar a biomecânica para o entendimento dos processos celulares.

Uma pinça óptica consiste de um único feixe de laser infravermelho fortemente focalizado. Para comprimentos de ondas menores do que os objetos aprisionados, a captura pode ser entendida a partir da óptica geométrica. Uma forma intuitiva de compreender o princípio de operação da “armadilha óptica” é examinar dois raios, um de cada lado, de um feixe de laser cônico que se encontrariam no foco. A “armadilha óptica” acontece devido à transferência de momento do fóton para a partícula capturada, que carrega momento $p = h\nu/c$ (no vácuo). 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 $\mathbf{F}$, 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 $\mathbf{F}_a$ e $\mathbf{F}_b$, e a combinação dos dois leva ao recuo na direção $\mathbf{F}$ em (b). Veja que o recuo $\mathbf{F}$ 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. É como tivéssemos sempre uma mola ($\mathbf{F}$ é uma força restauradora, assim como a de uma mola) conectando o centro da partícula ao foco do laser e quando movemos o laser, a partícula acompanha seu movimento tridimensionalmente. É ainda importante que o índice de refração da partícula seja maior que o índice de refração do meio externo, pois do contrário a direção da força resultante $\mathbf{F}$ tenderia a afastar o centro da partícula do foco do laser, expulsando-a ao invés de aprisioná-la. O objeto também não pode ser refletor e não pode absorver a luz do laser, pois essas situações tendem a expulsar e não capturar a partícula.

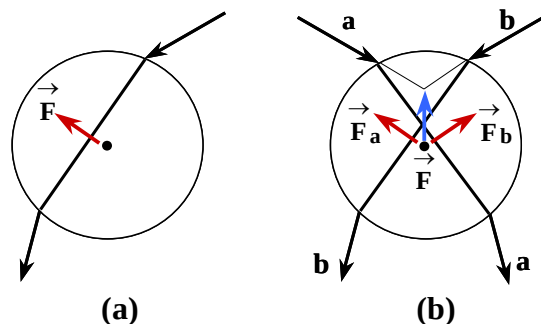


Figura 3. Esquema simplificado da aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois feixes de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la (FONTES,1999).

Como o momento do fóton é muito pequeno, as forças máximas exercidas pela pinça óptica são da ordem de uma centena de piconewtons. As forças envolvidas na captura são consideráveis se a partícula tiver uma dimensão da ordem de dezenas micrometros ou menor, pois o fóton apresenta um momento muito pequeno. De fato, considerando um laser de potência de 500 mW como exemplo, temos:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{n^{\circ} \text{ fótons}}{\text{tempo}} \times p_{\text{fóton}} = \frac{\text{potência}}{c} \Rightarrow F = \frac{0,5}{3 \times 10^8} \approx 2,0 \times 10^{-9} \text{ N}$$

onde p é o momento do fóton e c é a velocidade da luz.

Supondo agora uma partícula cúbica de 1 μm de aresta com densidade igual a da água e massa de 10^{-15} kg, a aceleração da partícula feita pelo laser é de:

$$a = \frac{F}{m} = \frac{2 \times 10^{-9}}{10^{-15}} = 2 \times 10^6 \text{ m/s}^2 = 200000 \times g$$

onde g é a aceleração da gravidade. Supondo agora uma partícula cúbica de 100 μm de aresta, e massa 10^{-9} kg, temos:

$$a = \frac{F}{m} = \frac{2 \times 10^{-9}}{10^{-9}} = 2 \text{ m/s}^2 = 0,2 \times g$$

já se a partícula tiver 1000 $\mu\text{m} = 1 \text{ mm}$ e portanto massa de 10^{-6} kg, a aceleração então será de 0,0002xg.

A força necessária para ruptura de uma ligação antígeno-anticorpo é aproximadamente de 240 pN, já as forças de moléculas motoras tais como kinesina e miosina variam entre 7 a 9 pN. Forças acima da força de escape da pinça óptica, da ordem de 200 pN, não podem portanto ser medidas com essa técnica. A aceleração só será significativa para partículas com massas menores do que 10^{-10} kg, ou seja, para partículas com dimensões da ordem de microns. Nas condições experimentais típicas em líquidos à temperatura ideal a pinça óptica pode também aprisionar partículas com dimensões da ordem de 50 nm, abaixo do limiar de resolução típica de 200 nm dos microscópios ópticos. Embora partículas dessa dimensão não sejam visíveis, seu aprisionamento pode ser detectado com técnicas espectroscópicas. Dessa forma a pinça óptica é capaz de manipular partículas com dimensões aproximadamente entre 50 nm a 50 μm , tornando-a ideal para estudos de células, microorganismos e biomoléculas. A figura 4 exemplifica manipulações de hemácias utilizando as pinças ópticas (FONTES, 2005).

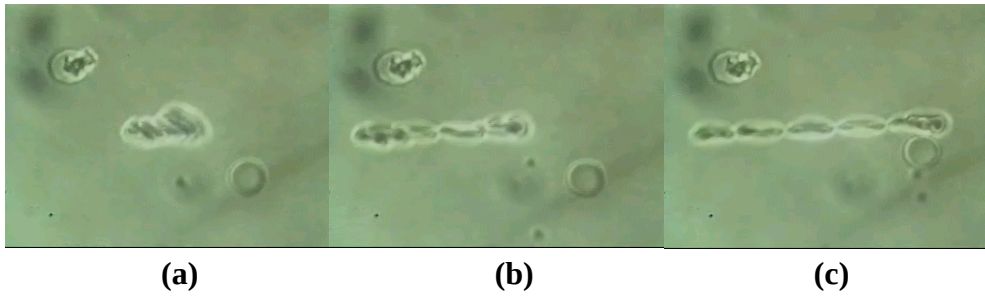


Figura 4. Pinça Óptica Dupla (dois pontos de captura) (a) “rouleaux” de hemácias, (b) hemácias deslizando entre si ao terem uma das extremidades presa e a outra arrastada, ambas pela pinça óptica, (c) máximo deslizamento entre as hemácias, mostrando uma forte adesão nas bordas (Adaptado de FONTES, 1999).

2.2 POTENCIAL ZETA:

Quando uma partícula carregada está imersa em um meio eletrolítico, ela atrai uma nuvem de íons de cargas opostas (contra-íons) formando uma dupla camada de cargas, assim como mostra a figura 5. Essa nuvem de íons se entende ao redor da partícula com uma densidade de cargas cada vez menor, tendendo a equilibrar as cargas da partícula. Se um campo elétrico for aplicado a esse sistema, a partícula será atraída para o eletrodo de polaridade oposta e quando se movimentar levará com ela os íons mais próximos e mais fortemente ligados a ela. A essa parte da nuvem de íons que pode se mover junto com a partícula denominamos camada compacta. Os íons que não pertencem à camada compacta estão na chamada camada difusa. O potencial Zeta é então definido como o potencial elétrico neste plano de deslizamento, ou seja, o potencial na fronteira que delimita a nuvem de íons que se move e que não se move com a partícula, ou ainda o potencial na fronteira entre a camada compacta e a camada difusa. Quando um campo elétrico for então aplicado sobre esse meio eletrolítico, uma força agirá sobre a partícula e ela se moverá com uma velocidade terminal constante. O potencial Zeta pode então ser determinado experimentalmente utilizando a velocidade terminal através da equação de Smoluchowski [HUNTER et al., 1981; NI et al., 2003; SZE et al., 2003]:

$$v_p = (\epsilon E / \eta) \zeta$$

onde v_p é a velocidade da partícula, E é o campo elétrico, ϵ é a permissividade elétrica, η é a viscosidade e ζ é o potencial Zeta.

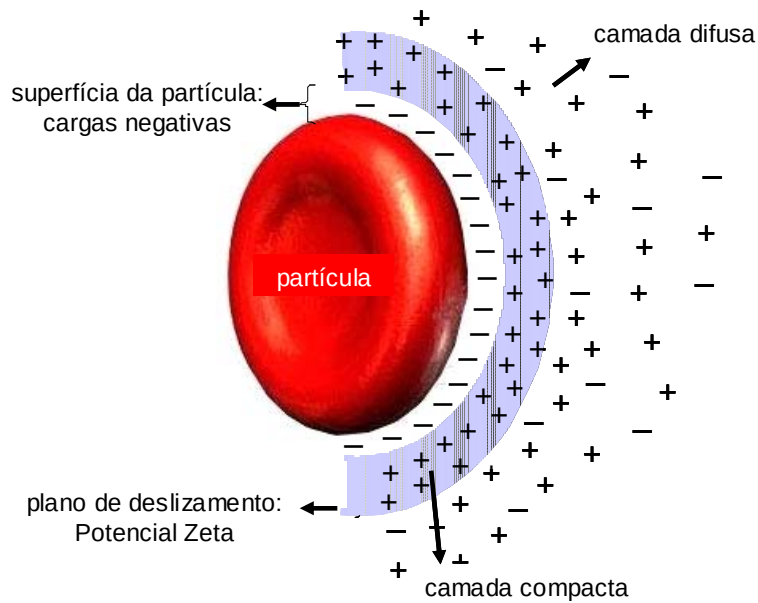


Figura 5. Representação esquemática do potencial Zeta (Modificada de POLLACK et al., 1977).

O potencial Zeta é característico de suspensões coloidais e também está presente nos colóides biológicos e células, como nas hemácias. Em decorrência do ácido siálico (ácido acetil neuramínico), presente em algumas glicoproteínas de membrana, que em contato com o meio aquoso polar torna-se negativamente carregada por apresentar em sua estrutura o grupo carboxil, conforme ilustra a figura 6, a superfície eritrocitária é carregada negativamente.

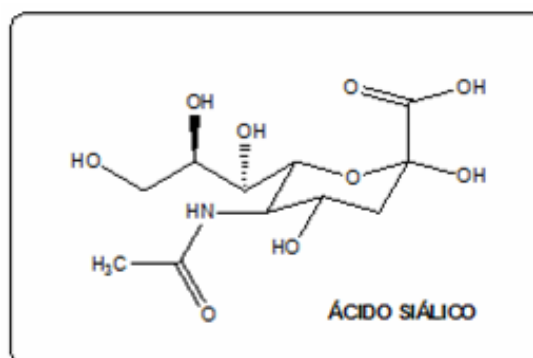


Figura 6. Estrutura de uma molécula de ácido siálico. Em destaque grupo carboxil que em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), maior responsável pela eletronegatividade eritrocitária. (EYLAR et al, 1962, ALBERTS et al, 1997)

A carga negativa da superfície eritrocitária influencia a distribuição espacial dos íons do meio aquoso que estão próximos à sua superfície, atraindo íons de carga oposta e repelindo íons de

mesma carga até que os íons livres em solução atinjam um ponto de neutralização elétrica sobre a superfície da hemácia. Assim, as hemácias também sofrem a ação do potencial Zeta.

Quanto maior a camada iônica em torno da célula, maior em módulo será o valor deste potencial Zeta eritrocitário, que fisiologicamente atua dificultando a agregação intercelular, pois aumenta a repulsão entre hemácias. As variáveis que influenciam nessa propriedade são:

1. A força iônica do meio, ou seja, quanto mais eletrolítica for a solução, menor será o potencial Zeta.
2. A constante dielétrica do meio. O campo percebido pelos contra íons diminuiu com o aumento da constante dielétrica e o potencial Zeta diminui.
3. A carga da membrana eritrocitária. A remoção de moléculas de ácido siálico, pelo tratamento das hemácias com enzimas proteolíticas ou por outros fatores externos que podem atuar na superfície da célula, reduz diretamente a carga elétrica da superfície eritrocitária o que provoca uma redução do potencial Zeta (STRATTON et al., 1973; LUNER et al., 1975).

Apesar de fisiologicamente o potencial Zeta atuar dificultando a agregação intercelular, todavia, há procedimentos laboratoriais, que visam diminuí-lo a fim de permitir a aglutinação celular, como nas reações de hemaglutinação, amplamente utilizadas em imunohematologia [AABB, 2008]. Essas reações são baseadas na ligação de anticorpos com antígenos da membrana eritrocitária, onde a formação e detecção de agregados celulares correspondem a resultados positivos. Uma maior sensibilidade destes testes ocorre com a diminuição do potencial Zeta, por favorecer a aproximação das hemácias e conseqüentemente a formação de pontes entre antígenos e anticorpos que é visualizada macroscopicamente como agregados. Esse princípio é explorado por substâncias denominadas potencializadoras, normalmente utilizadas para aumentar a sensibilidade das reações de hemaglutinação [GIRELLO, 2007]. A utilização de substâncias potencializadoras é particularmente importante quando o objetivo é investigar anticorpos IgG (figura 7). Como esses anticorpos são pequenos, se as hemácias não estiverem suficientemente próximas, não haverá a formação de pontes entre esses anticorpos e os antígenos e, portanto não haverá uma reação de aglutinação podendo levar a resultados falsos negativos.

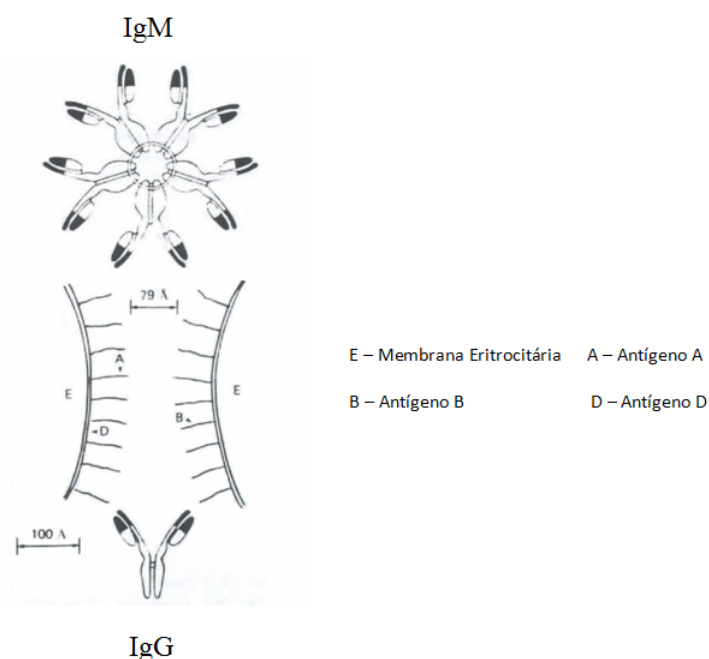


Figura 7. Diagrama mostrando a mínima distância para ligação de duas hemácias com moléculas de IgG e IgM desenhadas em escala (100Å). A, B e D (Rh₀) determinantes antigênicos da membrana eritrocitária (VAN OSS et al., 1983).

2.3 SUBSTÂNCIAS POTENCIALIZADORAS:

A identificação de anticorpos, pelo sistema imune, contra antígenos eritrocitários é de fundamental importância na prática transfusional. Reações hemolíticas agudas e tardias são alguns dos exemplos de problemas ocasionados pela destruição “*in vivo*” dos eritrócitos por estes anticorpos (HARMENING, 2006).

A ligação de anticorpos com antígenos da membrana eritrocitária pode levar a formação de um agregado de hemácias. Esse princípio de reação antígeno-anticorpo é chamado de aglutinação e é amplamente utilizado em reações imunohematológicas na prática transfusional, onde a detecção de agregados celulares corresponde a resultados positivos (AABB, 2008). Abaixo esquema de uma reação de hemaglutinação representada na figura 8. Segundo POLLACK (1977) a aglutinação é um fenômeno dinâmico que ocorre em duas fases. A primeira consiste na ligação das moléculas de anticorpos com os antígenos da superfície celular. Na segunda fase, ocorre a agregação das células sensibilizadas pelos anticorpos.

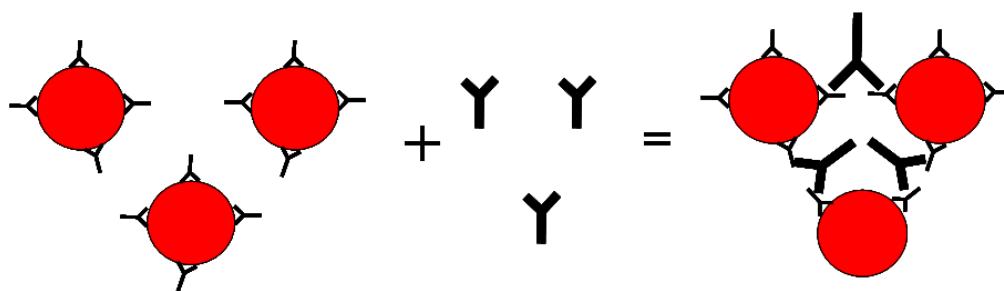


Figura 8. Representação de reação de hemaglutinação. Antígenos eritrocitários e anticorpos com formação do agregado das hemácias demonstrando a reação de hemaglutinação.

A aglutinação das hemácias na segunda fase depende principalmente da soma de forças opostas, que são à força de atração e a força de repulsão. A aglutinação irá ocorrer quando a força de atração for maior que a de repulsão (POLLACK et al., 1977). A força de repulsão é gerada pelas cargas negativas da superfície celular que ocorrem devido à presença de ácidos siálicos da membrana eritrocitária (POLLACK et al., 1977; EYLAR et al., 1961), enquanto a força de atração está relacionada à tensão superficial e às de forças de Van der Waals que existem em meios salinos (VAN OSS et al., 1983).

Como já descrito na seção 2.2, as cargas negativas da superfície eritrocitária geram o potencial Zeta que dificulta a agregação intercelular. Quanto maior o potencial Zeta, mais difícil será a agregação intercelular e conseqüentemente a detecção de tais anticorpos. A fim de se obter uma maior sensibilidade nestes testes, faz-se uso de substâncias denominadas potencializadoras, que visam diminuir o potencial Zeta favorecendo assim a aproximação eritrocitária e conseqüentemente a formação de pontes entre antígenos e anticorpos, principalmente quando se está investigando anticorpos pequenos como os do tipo IgG. A distância mínima entre a membrana de duas hemácias suspensas em uma solução isotônica é de 180 Å, considerando a distância entre as duas valências da molécula de IgG de 120 Å, a aglutinação não ocorre quando o anticorpo for da classe IgG pois o tamanho da molécula não é suficientemente grande para se ligar em determinantes antigênicos de duas hemácias diferentes e assim as hemácias ficam apenas sensibilizadas. Moléculas IgM são maiores e multivalentes permitindo fácil aglutinação direta (VAN OSS et al., 1983).

Como descrito na seção 2.2, segundo POLLACK (POLLACK et al., 1977), o potencial Zeta pode ser modificado por eletronegatividade da hemácia, constante dielétrica do meio e força iônica do meio. Sendo assim as substâncias potencializadoras, podem atuar por uma dessas 3 vias: (1) alterando a força iônica do meio, (2) alterando a constante dielétrica e (3) através da redução das cargas elétricas negativas da superfície eritrocitária. Por exemplo, o LISS (solução salina de baixa força iônica) atua na força iônica do meio; já o polietilenoglicol (PEG) e o dextran atuam na

constante dielétrica do meio e as enzimas como a papaína e a bromelina atuam nas cargas da membrana das hemácias (STRATTON et al., 1973; LUNER et al., 1975; POLLACK et al., 1977; BUXBAUM, 1982; AABB, 2008). Ainda existem controvérsias sobre a ação dessas substâncias potencializadoras sobre o potencial Zeta. As análises e conclusões são ainda baseadas em muitos resultados qualitativos e não em resultados quantitativos, por isso investigar melhor a atuação dessas substâncias pode ajudar a compreender melhor os testes e melhorar a sensibilidade da reação sem perda significativa da especificidade (FONTES, 2008).

A enzima papaína está entre as enzimas mais utilizadas nos testes de hemaglutinação. É uma protease extraída do látex do mamão *Carica papaya*. As proteases ou enzimas proteolíticas catalisam a quebra de proteínas por hidrólise de pontes de peptídeos e foram primeiramente organizadas em classes e famílias por Rawlings e Barret em 1993 (BARRET et al., 1998; BEYNON & BOND, 1989). As proteases utilizam diferentes substratos para a hidrólise e são divididas em grupos, tais como: serina, cisteína, aspártico e metalo. Cada grupo é dividido em famílias e classes de acordo com suas similaridades em estrutura e origem evolutiva. As proteases clivam especialmente as proteínas ou no meio da molécula (endopeptidase) e/ou nos terminais amino e carboxil (exopeptidases: aminopeptidases e carboxilpeptidases).

A papaína é uma cisteína endopeptidase. As proteases empregam um grupo sulfidril (de sua cadeia) de um resíduo de cisteína para sua atividade. O primeiro passo para a hidrólise envolve deprotonação (ativação) do grupo sulfidril por um resíduo de histidina. Após isso ocorre a ação enzimática sobre o anion tiol no terminal carboxil na proteína. As cisteínas proteases são organizadas em 10 classes. A papaína pertence à classe C1 (BARRET et al., 1998; BEYNON & BOND, 1989).

O tratamento das hemácias com a enzima papaína diminui a concentração de ácido siálico na superfície da célula, através da remoção de fragmentos de glicoproteínas da membrana ao qual o mesmo está associado, reduzindo assim diretamente a carga elétrica da superfície eritrocitária e conseqüentemente o potencial Zeta, favorecendo o acesso dos anticorpos aos antígenos eritrocitários (DANIELS, 2007). A figura 9 mostra a atuação da papaína sobre a banda 3 (maior glicoproteína da hemácia). A tabela 1 mostra os passos da ação enzimática na membrana das hemácias.

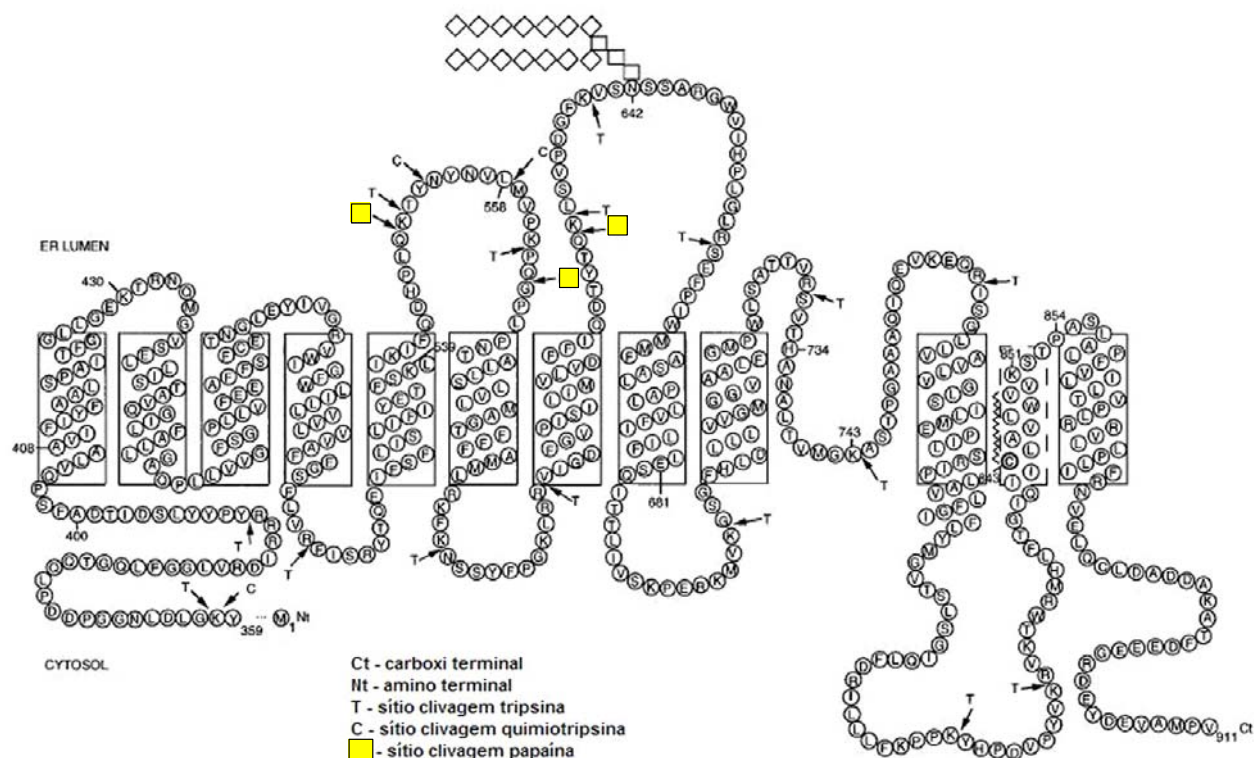


Figura 9. Ação da papaína (em amarelo) e sítios de clivagem na banda 3, maior glicoproteína da membrana eritrocitária (POPOV et al., 1997).

Tabela 1: Descrição dos efeitos do tratamento enzimático por proteases na membrana da hemácia (DANIELS, 2007).

Efeitos da clivagem de glicoproteínas de membrana de hemácia por enzimas como a papaína:			
Efeito 1	Retirada de moléculas de ácido siálico, principal contribuição para redução da carga negativa da hemácia.	Redução de Cargas negativas.	Permite que células se aproximem, reduzindo a distância entre moléculas de anticorpos.
	→	→	
Efeito 2	Glicoproteínas são hidrofílicas (Atraem moléculas de água).	Moléculas de água precisam ser compartilhadas pelas hemácias vizinhas.	Faz com que os eritrócitos se aproximem uns dos outros.
	→	→	
Efeito 3	Estruturas de glicoproteínas sobressaem da superfície da membrana eritrocitária	Redução do impedimento estérico	Antígenos mais facilmente acessíveis aos anticorpos
	→	→	
Efeito 4	Transportam certos antígenos	Perda de antígenos como M, N, S e sistema Duffy	Anticorpos com essas especificidades não são detectados.
	→	→	

2.4 ELASTICIDADE ERITROCITÁRIA

As hemácias são as células mais numerosas do sangue, sua principal função é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e o dióxido de carbono, resultante do metabolismo celular, dos tecidos para os pulmões. De forma simplificada pode ser compreendida como um compartimento líquido envolto por uma membrana a qual contém uma solução de hemoglobina, responsável por sua principal função celular. Em humanos saudáveis apresenta-se como um discóide bicôncavo com diâmetro médio de 8 a 10 μm e espessura média de 2 μm na periferia e cerca de 1 μm na sua porção central. As hemácias normais apresentam um ciclo de vida médio de 120 dias. Neste período, percorrem os vasos sanguíneos por aproximadamente 500.000 vezes totalizando uma distância de 250 km. Durante este percurso muitas vezes necessitam atravessar caminhos bem menores que sua própria circunferência (podendo se alongar até 230% da sua dimensão original), como por exemplo, capilares e os orifícios sinusoidais do baço (3 a 5 μm de diâmetro), órgão responsável pelo sequestro de células velhas, danificadas e menos deformáveis (SHOHET & MOHANDAS, 1988). Desta forma a elasticidade eritrocitária é um parâmetro de fundamental importância para o exercício pleno de suas funções normais e sua perda ou diminuição pode levar a retirada prematura das hemácias da circulação e, conseqüentemente, a diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos. Diversos fatores podem atuar diminuindo a elasticidade celular, estes geralmente interferem em uma ou mais das seguintes características: (1) composição química e estrutura da membrana eritrocitária, (2) estrutura e função da hemoglobina e (3) metabolismo eritrocitário (HARMENING, 2006).

Por esta razão, ao longo dos anos, foram propostos diversos métodos para se avaliar as características elásticas eritrocitárias, tais como: aspiração em micropipetas (EVANS & 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 & AWARUN, 1990; REINHART, 1992; BEREZINA et al., 2001), ectacitometria (BESSIS et al., 1980; JOHNSON, 1989; KUYPERS et al., 1990), reoscopia (GRONER et al., 1980; SUTERA et al., 1985; DOBBE et al., 2002) e extensão por campos elétricos de alta frequência (KOZLOV & MARKIN, 2000). No entanto estas técnicas são baseadas em um único aspecto do comportamento mecânico celular, por exemplo, a aspiração por micropipetas, exemplificada na figura 10, por gradiente de pressão avalia a elasticidade da membrana eritrocitária se baseando na porção da membrana celular que é aspirada. Como essa porção é muito pequena ($\sim 10^{-10}$ cm) e o raio da hemácia é da ordem de 10^{-4} cm, ela não aspira o citoesqueleto da célula, ou seja, não avaliando assim a elasticidade real da célula como um todo e sim da sua membrana. Na corrente sanguínea, a deformação das hemácias é decorrência tanto das propriedades elásticas da membrana como também do citoesqueleto. Também, como a pipeta

exerce forças acentuadas sobre as células, muitas podem se romper, dificultando a medida. Além disso, muitas destas outras técnicas apresentam resultados baseados em médias de um grande número de células, não analisando as células individualmente, o que muitas vezes pode esconder as assinaturas que estão relacionadas a doenças e outros processos que podem afetar as hemácias, já que um grande número de células pode estar dentro da normalidade e apenas algumas estarem alteradas.

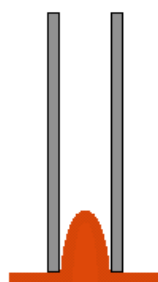


Figura 10. Ilustração do método de aspiração por micropipeta (FONTES, 1999).

Recentemente também foi proposto e consolidado um método para medir a elasticidade utilizando pinças ópticas (BRANDÃO et al., 2003). A utilização da pinça óptica apresenta algumas vantagens em relação aos métodos anteriormente propostos, tais como: (1) analisa a elasticidade da hemácia como um todo, considerando a contribuição de todos os constituintes celulares, (2) possibilita uma análise individual não fornecendo somente valores médios da elasticidade, isso permite, por exemplo, que a assinatura de uma doença seja observada e (3) por exercer forças bem pequenas (da ordem de piconewtons) não danifica as células e permite uma maior sensibilidade na detecção de pequenas alterações sofridas pelas células. Utilizando as pinças ópticas, por exemplo, se demonstrou, assim como mostra a figura 11, através da análise individual de mais de 100 células, que as hemácias de pacientes com anemia falciforme são consideravelmente mais rígidas que as hemácias de indivíduos normais e que as hemácias dos pacientes tratados com hidroxiuréia apresentam uma melhora significativa em suas propriedades elásticas (BRANDÃO et al., 2003). Na figura 11, é possível observar que a média da elasticidade nas células de pacientes com anemia falciforme é levemente diferente da média da elasticidade dos indivíduos normais, mas que a assinatura da doença vem de algumas células bem rígidas que estão representadas por traços nos gráficos. Assim, as pinças ópticas, têm a vantagem de quantificar as propriedades reológicas individualmente das células ao invés de comportamentos estatísticos relacionados somente a uma população de células. Com uma técnica que fornecesse somente valores médios, não seria possível detectar a assinatura da doença, já que os pacientes apresentam muitas hemácias normais. Por não

medirem individualmente as células, estes métodos não apresentam uma definição completa das consequências fisiológicas do comportamento reológico alterado.

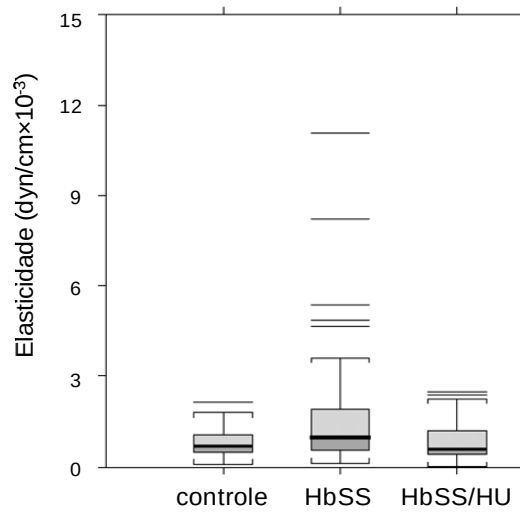


Figura 11. Elasticidade total da hemácia medida pela pinça óptica em pacientes com anemia falciforme HbSS, homozigotos HbSS tomando HU e controles normais (modificado de BRANDÃO et al., 2003).

No modelo proposto utilizando as pinças ópticas, o concentrado de hemácias é diluído em plasma sanguíneo AB em uma câmara de Neubauer e as hemácias são capturadas pelo laser e arrastadas contra o líquido com velocidades progressivas constantes (entre 150 $\mu\text{m/s}$ e 250 $\mu\text{m/s}$). Quando as hemácias são arrastadas no plasma, elas se deformam e duas forças atuam sobre as células, uma força hidrodinâmica e uma força elástica. Como essas forças estão em equilíbrio, tem-se:

$$L = L_0 + \left(\frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right) v$$

Dessa forma, determina-se o método de medida: medir a comprimento L da hemácia em função da velocidade, assim como mostra a figura 12. Como a deformação (L) é proporcional a velocidade, deve-se ter uma reta com o coeficiente angular:

$$\alpha = \left(\frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right)$$

Obtendo o coeficiente angular, conhecendo L_0 (tamanho de repouso), Z_{eq} (distância da hemácia até o fundo da lâmina e lamínula) e η (viscosidade do fluido) determina-se a elasticidade μ . Assim, através da análise da deformação celular em razão da velocidade obtém-se, portanto a elasticidade celular. Vale a pena dizer que elasticidade é uma grandeza inversamente proporcional, quanto maior é seu valor, mais rígida é a célula, assim como é para a constante elástica das molas.

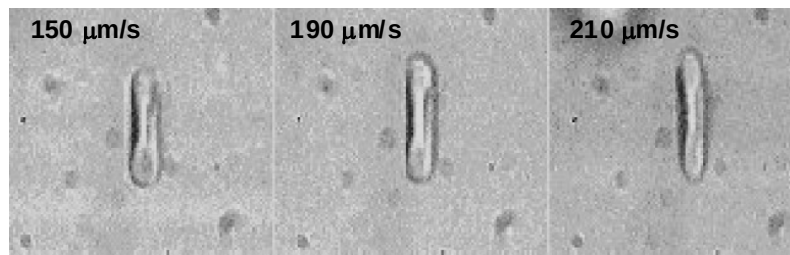


Figura 12. Ao ser arrastada pela pinça óptica sob diferentes velocidades, podemos observar a deformabilidade sofrida pela hemácia em função de velocidades constantes (FONTES, 2005).

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADEWUYI, J. O.; AWARUN, J. A. Deformability of stored normal and sickle haemoglobin erythrocytes. **Afr. J. Med. Sci.** 19:115-119, 1990.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. **Biologia Molecular da célula**. 3ª Edição, Porto Alegre, Artes Médicas; 1997.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical Manual AABB**. 16th ed., Bethesda, Maryland, 2008.

A ASHKIN, A. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Volume: 94 Issue: 10 Pages: 4853-4860 Published: MAY 13 1997.

ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; BJORKHOLM, J. E. & CHU, S. – Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. **Optic. Lett.**, vol. 11 pg. 288 – 290, 1986.

ASHKIN, A.; DZIEDZIC. OPTICAL Trapping and Manipulation if Viruses and Bacteria. **Science**, vol. 235, pg. 1517 – 1520, 1987.

BALLAS, S. K.; SAIDI, P.; CONSTANTINO, M. Reduced erythrocytic deformability in megaloblastic anemia. **Am. J. Clin. Pathol.** 66:953-957, 1976.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Handbook of proteolytic enzyme. London, **Academic Press**, 1998.

BAXBAUM, K.; EVANS, E.; BROOKS, D. E. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. **Biochemistry**. 21: 3235-3239, 1982.

BEREZINA, T. L.; ZAETS, S. B.; MORGAN, C.; SPILLERT, C. R.; KAMIYAMA, M.; SPOLARICS, Z.; DEITCH, E. A.; MACHIEDO, G. W. 2001. Influence of storage on red blood cell rheological properties. **J. Surg. Res.** 2002. Jan.; 102.(1):6-12. 102:6-12, 2001.

BESSIS, M.; MOHANDAS, N.; FEO, C. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. **Blood Cells** 6:315-327, 1980.

BEYNON, R. J.; BOND, J.S. Proteolytic enzymes - a pratical approach, **IRL Press** , 1989.

BRANDÃO, M. M.; Barjas-Castro, M. L.; FONTES, A.; CESAR, C. L.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O. - Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. , v.43, p.217 - 221, 2009.

BRANDÃO, M. M.; FONTES, A.; BARJAS-CASTRO, M. L.; BARBOSA, L. C.; COSTA F. F.; CESAR, C. L.; SAAD, S. T. O. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application

to the study of drug response in sickle cell disease. **European Journal of Haematology.** , v.70, p.207 - 211, 2003.

BUSTAMANTE, C.; BRYANT, Z.; SMITH, S. B.: “Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics”. **Nature** 421, 423, 2003.

DANIELS GL, BROMILOW I. Essential guide to blood groups. **Blackwell publishing**, 2007.

DHOLAKIA, K.; SPALDING, G.; MAC DONALD, M.: Optical Tweezers: the next generation. **Physics World** 15, 31, 2002.

DINU, C.; Z.; CHAKRABARTY, T.; LUNSFORD, E.; MAUER, C.; PLEWA, J.; DORDICK, J. S. & CHRISEY, D. B. – Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly. **Soft Matter**, 5: 3818–3822, 2009.

DOBBE, J. G.; HARDEMAN, M. R.; STREEKSTRA, G. J.; STRACKEE, J.; INCE, C.; GRIMBERGEN, C. A. Analyzing red blood cell-deformability distributions. **Blood Cells Mol. Dis.** 2002. May. – Jun.;28 (3):373.-84. 28:373-384, 2002.

EVANS, E. A. & LA CELLE, P. L. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. **Blood** 45:29-43, 1975.

EYLAR, E. H.; MADOFF, M.A.; BRODY, O. V.; ONCLEY, J. L. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. **J Biol Chem** 237:1992-2000, 1962.

FONTES, A.; FERNANDES, H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA, L. C.; BARJAS-CASTRO, M.L.; CESAR, C.L. - Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers. **Journal of Biomedical Optics.** , v.13, p.014001-1 - 014001-6, 2008.

FONTES, A.; FERNANDES, H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA, L. C.; BARJAS-CASTRO, M. L.; CESAR, C. L.. Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers. **Journal of Biomedical Optics.** , v.13, p.014001-1 - 014001-6, 2008.

FONTES, A.; THOMAZ, A. A.; POZZO, L.; BARJAS-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; SAAD, S. T. O.; BARBOSA, L. C.; CESAR C. L. Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers In: Optics & Photonics, 2005, San Diego. **Proceedings of SPIE - Optical Trapping and Optical Micromanipulation II.** , 2005. v.5930. p.439 – 444

FONTES, A. **Manipulação e Microanálise com pinças ópticas.** Tese (Doutorado em Física) defendida pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil. 2004.

FONTES, A. **Uso de Lasers para Manipulação e Medidas de Células Vivas.** Dissertação (Mestrado em Física) defendida pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas,

Brasil. 1999.

GIRELLO, A. L. & KUHN, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno - Hematologia Eritrocitária**. 2 Ed. Brasil. Senac Editora, 2007, 208 p.

GRIER, D. G.: “A revolution in optical manipulation”. **Nature** 424, 810, 2003.

GRONER, W.; MOHANDAS, N.; BESSIS, M. 1980. New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ektacytometer. **Clin. Chem.** 26:1435-1442, 1980.

HARMENING, D. M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transusão**. 4ª Ed. Brasil. Editora Revinter, 2006, 592 p.

HAVELL, T. C.; HILLMAN, D.; LESSIN, L. S. Deformability characteristics of sickle cells by microelastimetry. **Am. J. Hematol.** 4:9-16, 1978.

HUANG, H.; KAMM, R. D.; LEEL, R. T.: “Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology”. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 287, C1, 2004.

HUNTER, R. J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. **London Academic Press**, 1981.

JOHNSON, R. M. 1989. Ektacytometry of red blood cells. **Methods Enzymol.** 173:35-54.:35-54.

KOZLOV, M. M.; MARKIN, V. S. Model of red blood cell membrane skeleton: eletrical and mechanical properties. **J. Theor. Biol.** 129:439-452, 2000.

KUYPERS, F. A.; SCOTT, M. D.; SCHOTT, M. A.; LUBIN, B.; CHIU, D. T. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. **J. Lab. Clin. Med.** 116:535-545, 1990.

LALIBERTE, M.; BORDELEAU F.; MARCEAU, N. & SHENG, Y. – Antigen detection at atomolar concentration using optical tweezers. **Proc. SPIE**, 7386: 09, 2009.

LUNER, S. J.; STURGEON, P.; SZKLAREK, K.; McQUISTON D. T. Effects of proteases and neuramidase on RBC surface charge and agglutination. **Vox Sanguinis** 28: 184-199, 1975.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L.; MEYERS S.; GAGNEUX, P.; LOSKUTOFF, N. M.; BOTVINICK E. L. & BERNS, M. W. – The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. **J. R. Soc. Interface**, 5 (20): 297–302, 2008.

NASH, G. B.; JOHNSON, C. S.; MEISELMAN, H. J. Rheologic impairment of sickle RBCs induced by repetitive cycles of deoxygenation-reoxygenation. **Blood** 72:539-545, 1988.

NEUMAN, K. C. & BLOCK, S. M.: “Optical trapping”. **Rev. Sci. Instr.** 75, 2787, 2004.

- NI, H.; AMME, R. C. Ion redistribution in a electric double layer. **Journal of colloid and interface science**. 260: 344-348, 2003.
- PERKINS, T. T. – Optical traps for single molecule biophysics: a primer. **Laser & Photon. Rev.** 3: 203–220, 2009.
- POLLACK, W.; RECKEL, R. P. A reappraisal of the forces involved in Hemagglutination. **Int Archs Allergy Appl. Immun.** 54:29-42, 1977.
- POPOV, M.; TAM, L. Y.; LI, J.; REITHMEIER, R. A. F. Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. **The journal of biological chemistry** 272 (29): 18325–18332, 1997.
- POZZO, L.; FONTES A.; THOMAZ A. A.; SANTOS B. S.; FARIAS P. M. A.; COPI D.; GIORGIO S. & CESAR C. L. – Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for *Leishmania amazonensis* parasites. **Micron**, 40: 617–620, 2009.
- REINHART, W. H. The influence of iron deficiency on erythrocyte deformability. **Br. J. Haematol.** 80:550-555, 1992.
- SAKATA, S. K.; KURACHI, M. & SOGAWA, K. – Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. **Eur. Biophys. J. Biophys.**, 27: 55–61, 1998.
- SHOHET S. B.; MOHANDAS, N. **Methods in Hematology: Red Cell Membranes**. London, UK: Churchill Livingstone, 1988.
- SMITH, C. M.; KUETTNER, J. F.; TUKEY, D. P.; BURRIS, S. M.; WHITE, J. G. 1981. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. **Blood** 58:71-77.
- SONI, G. V. et al: “Development of an optical tweezer combined with micromanipulation for DNA and protein nanobioscience”. **Current Science** 83, 1464, 2002.
- STOKKE, B. T.; MIKKELSEN, A.; ELGSAETER A. The human erythrocyte membrane skeleton may be na ionic gell. III. Micropipette aspiration of unswollen erythrocytes. **J. Theor. Biol.** 123:205-211, 1986.
- STRATTON, F.; RAWLINSON, V. I.; GUNSON, H. H.; PHILLIPS, P. K. The role of Zeta Potential in Rh agglutination. **Vox Sanguinis** 24: 273-279, 1973.
- STRATTON, F.; RAWLINSON; VI; GUNSON, H. H.; PHILLIPS, P. K. The role of Zeta Potential in Rh agglutination. **Vox Sanguinis** 24: 273-279, 1973.

- SURESH, S.; SPATZ, J.; MILLS, J. P.; MICOULET, A.; DAO, M.; LIM, C. T.; BEIL, M.; SEUFFERLEIN, T.: "Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria". **Acta Biomaterialia** 1, 15, 2005.
- SUTERA, S. P.; GARDNER, R. A.; BOYLAN, C. W.; CARROL, G. L.; CHANG, K. C.; MARVEL, J. S.; KILO, C.; GONEN, B.; WILLIAMSON, J. R. Age-related changes in deformability of human erythrocytes. **Blood** 65:275-282, 1985.
- SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L.; LI, D. Zeta-potential measurements using Smoluchowski equation and slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. **J. Colloid Interface Sci.** 261: 402-410, 2003.
- VAN OSS, C. J.; ABSOLON, D. R. "Zeta potential, Van der Walls Forces and hemagglutination". **Vox sanguinis** 44: 183-190, 1983.
- VAN OSS, C. J.; ABSOLON, D. R. "Zeta potential, Van der Walls Forces and hemagglutination". **Vox sanguinis** 44: 183-190, 1983.
- WANG, S. K.; CHIU, J. J.; CHEN, L. J.; LI, M. R.; CHOU, S. C. & HWANG, N. H. C. – Optical tweezers measurements of leukocyte-endothelium adhesion force. **Asaio Journal**, 50 (2): 166, 2004.

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver o sistema de pinça óptica na UFPE e aplicá-lo para medidas de propriedades de hemácias que ajudarão no entendimento tanto de sua biologia celular como das interações celulares que são relevantes em Hemoterapia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Estudo dos componentes de um sistema de pinças ópticas, adaptações, montagem e alinhamento;
- o Demonstração do sistema de pinça óptica através de algumas manipulações celulares;
- o Estabelecimento de uma metodologia para quantificação do potencial Zeta;
- o Mensuração temporal do potencial Zeta em hemácias armazenadas em CPD/SAG-M, para avaliação das alterações relacionadas a lesões oxidativas de estocagem;
- o Quantificar a redução do potencial Zeta de hemácias papainizadas em diferentes meios;
- o Avaliação do efeito da leucorredução sobre o potencial Zeta;
- o Estabelecimento de uma metodologia para mensuração da elasticidade eritrocitária;
- o Quantificação temporal da elasticidade em hemácias armazenadas em CPD/SAG-M, para avaliação das lesões de estocagem.

CAPÍTULO IV

4. ARTIGO CIENTÍFICO:

USO DE PINÇAS ÓPTICAS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE HEMÁCIAS EM EDTA, CPD-SAGM E ESTOCADAS

Artigo aceito pela Revista Brasileira de Análises Clínicas

USO DE PINÇAS ÓPTICAS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE HEMÁCIAS EM EDTA, CPD-SAGM E ESTOCADAS

USE OF OPTICAL TWEEZERS FOR EVALUATION OF ZETA POTENTIAL OF RED BLOOD CELLS IN EDTA, CPD-SAGM AND STORED IN BLOOD BANKS

D. C. N. Silva¹, H. P. Fernandes², C. N. Jovino³, M. M. Filho¹, A. F. M. Filho¹, A. D. P. R. Oliveira¹, P. M. A. Farias¹, B. S. Santos³, C. L. Cesar⁴, M. L. Barjas-Castro², A. Fontes¹

RESUMO - A hemácia é carregada negativamente, principalmente devido ao ácido siálico, o que gera um potencial elétrico denominado potencial Zeta (ζ), que impede a aglutinação intravascular. Os testes de hemaglutinação na rotina transfusional, necessitam de substâncias potencializadoras, das quais muitas agem diminuindo o ζ para se ter maior sensibilidade. Através da pinça óptica, ferramenta capaz de capturar células utilizando a luz, foi proposta uma metodologia para quantificar o ζ e aplicar em hemácias coletadas com EDTA e estocadas em CPD/SAG-M (visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas a lesões de armazenamento). Os ζ em CPD/SAG-M foram superiores (-14,8 mV) aos em EDTA (-7,9 mV) e decrescentes a partir do primeiro dia de armazenamento, estabilizando-se a partir da terceira semana com ζ = -7,6 mV. Hemácias com CPD/SAG-M apresentaram ζ maior, pois possivelmente este conservante evitou lesões mais significativas da membrana que poderiam alterar as cargas. A redução do ζ no armazenamento pode ser consequência de enzimas liberadas de leucócitos lisados que tenham alterado as glicoforinas da membrana. A metodologia permitiu avaliar o ζ em diferentes condições e poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação com diferentes meios potencializadores e no melhor conhecimento das lesões de estocagem para fins transfusionais.

PALAVRAS-CHAVE - Potencial Zeta, Imunohematologia, EDTA, CPD/SAG-M, Estocagem.

SUMMARY – Erythrocytes are negatively charged, mainly due to sialic acids, which generate an electrical potential called zeta Potential (ζ), preventing intravascular agglutination. Hemagglutination tests applied in transfusional routine use reactions potentiators. Many of them act by decreasing the ζ to obtain a higher reaction sensitivity. Using optical tweezers, a tool that captures cells using light, we proposed a methodology to quantify the ζ . We measured the ζ of red blood cells (RBCs) collected with EDTA and stored in CPD/SAG-M to evaluate changes in the membrane charges related to storage injuries. The ζ for CPD/SAG-M was higher (-14.8 mV) than for EDTA (-7.9 mV) and decreased from the first day of storage, remaining stable from the third week with ζ = -7.6 mV. The RBCs ζ with CPD/SAG-M presented higher values, possibly because of the preservative medium, which prevents significative lesions of the cell membrane that could modify the charges. The ζ reduction for stored cells can be caused by enzymes released from lysed leukocytes that can change membrane glycoporphins. The methodology here proposed allowed the evaluation of ζ under different conditions, which can contribute to the standardization of hemagglutination techniques with different reactions potentiators and a better knowledge of the lesions of RBCs stored for transfusion.

KEYWORDS – Zeta Potential, Immunohematology, EDTA, CPD/SAG-M, Storage.

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco

² Hematology and Transfusion Center, Universidade Estadual de Campinas

³ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

⁴ Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

A incorporação de lasers na microscopia óptica tem colaborado consideravelmente para as mais modernas pesquisas nas áreas biomédicas com propósitos de manipulação, medidas, diagnósticos e microanálises. Entre as modernas técnicas, destaca-se a pinça óptica, uma ferramenta de alta sensibilidade que utiliza um laser no infravermelho fortemente focalizado por uma objetiva de um microscópio que possibilita o aprisionamento e a movimentação de partículas da ordem de micrômetros [2]. As forças, da ordem de femto a picoNewtons, exercidas pela pinça óptica sobre as partículas, permitem especialmente a captura e a medida de propriedades de células e pequenas organelas, que podem ser manipuladas individualmente sem qualquer dano térmico. Entre as várias aplicações da pinça óptica, temos: a manipulação de material genético em diferentes tipos celulares [16], a mensuração do comprimento de moléculas de DNA [19], a detecção de concentrações femtomolares e atômicas de antígenos [14], modificação estrutural de estruturas microtubulares [8], a medição de deslocamentos celulares e mecanismos de adesão leucocitária [21], e a análise da motilidade de espermatozoides [15] e tripanossomatídeos [18].

Para o estudo da biologia eritrocitária, a pinça óptica permite a manipulação e a medida de propriedades mecânicas (adesão, viscosidade da membrana e elasticidade) de hemácias normais e alteradas por algum fator externo, por exemplo: estocagem, irradiação, ação de um medicamento ou até mesmo por uma doença hematológica [3, 4, 13]. Além disso, a pinça óptica também permite a mensuração das cargas elétricas da membrana eritrocitária [10].

A superfície eritrocitária possui algumas glicoproteínas conjugadas ao ácido siálico, principal responsável pela carga negativa da membrana da hemácia, que em solução criam um potencial elétrico repulsivo denominado potencial Zeta (ζ) [9, 17]. É esse potencial repulsivo que impede a agregação dos eritrócitos na corrente sanguínea. Essa carga elétrica negativa influencia a distribuição dos íons da solução ao redor da célula formando duas camadas, a primeira compacta com íons rigidamente ligados à hemácia e uma segunda camada de íons distribuídos difusamente. Quanto maior a camada iônica em torno da célula, maior em módulo será o valor do ζ , dificultando a agregação intercelular. Todavia, há procedimentos laboratoriais, que visam diminuir o ζ e permitir a aglutinação celular, como as reações de hemaglutinação, amplamente utilizadas em imunohematologia [1]. Essas reações são baseadas na ligação de anticorpos com antígenos da membrana eritrocitária, onde a formação e detecção de agregados celulares correspondem a resultados positivos. Uma maior sensibilidade destes testes ocorre com a diminuição do ζ , por favorecer a aproximação das hemácias e conseqüentemente a formação de pontes entre antígenos e anticorpos que é visualizada macroscopicamente como agregados. Esse princípio é explorado por substâncias denominadas potencializadoras, normalmente utilizadas para aumentar a sensibilidade das reações de hemaglutinação [11].

Neste trabalho, foi proposta uma metodologia utilizando a técnica de pinças ópticas para a quantificação do ζ e a sua aplicação para medidas de hemácias coletadas em EDTA (K_3 - anticoagulante normalmente utilizado para pesquisa de antígenos eritrocitários pelas reações de hemaglutinação) e para células de concentrado de hemácias preservadas em CPD/SAG-M e estocadas por períodos crescentes, visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas a diferentes condições de coleta e às lesões de armazenamento. Nós acreditamos que uma melhor compreensão das cargas de membrana da hemácia pode levar a um aprimoramento da sensibilidade e especificidade das reações de hemaglutinação e guiar o desenvolvimento de novas substâncias potencializadoras para serem usadas em Hemocentros.

MATERIAL E MÉTODOS:

PINÇA ÓPTICA: O sistema de pinças ópticas utilizado consiste de um feixe de laser no infravermelho próximo ($\lambda = 1064 \text{ nm}$ – IPG Photonics, EUA), passando por um conjunto de lentes e focalizado no material de análise através de uma objetiva de 100x. Esta é acoplada a um microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha) equipado com platina motorizada (Prior Scientific, Inglaterra) e sistema de captura de imagem em tempo real constituído de uma câmera de vídeo (SDC-415ND, Samsung, Japão) e uma placa de vídeo (Pinnacle Systems, EUA) acoplada a um computador. A Figura 1 ilustra o sistema de pinças ópticas.

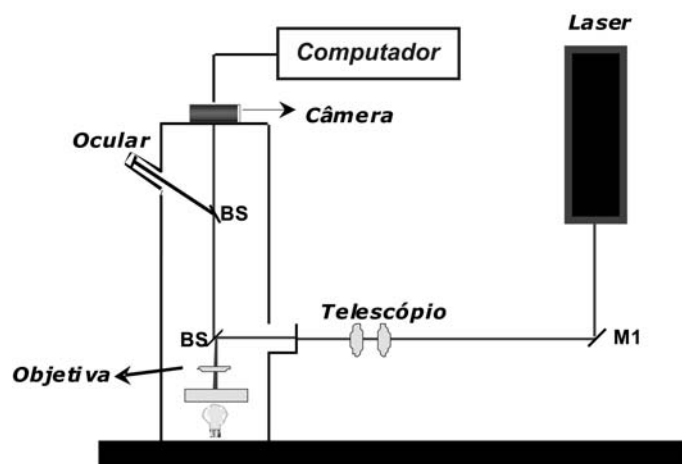


Figura 1: Esquema de montagem da pinça óptica.

CÂMARA PARA MEDIDA DO POTENCIAL ZETA: Para a mensuração do ζ desenvolveu-se uma câmara que permite a realização das medidas nas mesmas condições eletrolíticas das reações de aglutinação utilizadas na prática imunohematológica. Esta câmara feita em acrílico apresenta dois reservatórios laterais que se comunicam através de um canal de 25 mm de comprimento (L), 2 mm de largura (W) e 75 μm de profundidade (δ). Nos reservatórios foram instalados eletrodos de platina (99,95%, Heraeus, São Paulo), material não reativo em processos eletrolíticos, a uma distância média de 40 mm entre si. Para geração de um campo elétrico foi utilizada uma fonte de alta voltagem ligada aos eletrodos. A Figura 2 mostra um esquema da câmara de medidas.

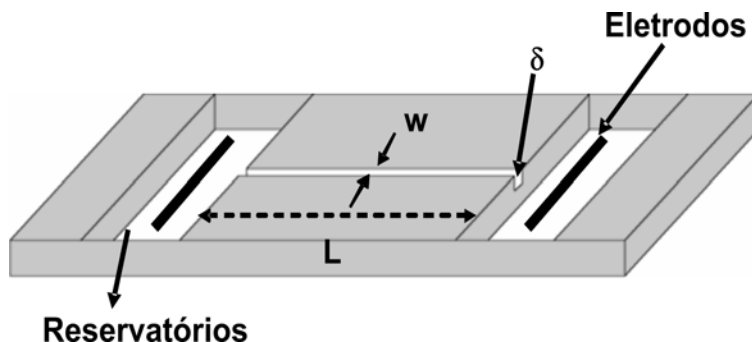


Figura 2: Esquema da câmara de medidas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS: Trinta e uma células em CPD/SAG-M (Citrato, Fosfato, Dextrose, Solução Salina, Adenina, Glicose e Manitol) obtidas do tubo conector da bolsa do concentrado de hemácias e quarenta e nove de tubos de coleta a vácuo com EDTA (K₃), foram analisadas no primeiro dia de estocagem. Realizou-se medidas temporais a cada 5 dias até o 25º dia de armazenamento dos eritrócitos das bolsas do concentrado de hemácias com solução de CPD/SAG-M, sendo analisadas 10 células a cada experimento. Todas as amostras foram obtidas de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), pertencentes ao grupo O Rh (D) positivo. As amostras foram diluídas em soro do grupo AB Rh (D) positivo (0.5:500 µL). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa desta instituição (Parecer Nº. 003/2009).

MEDIDAS DO ZETA: Após a diluição, a solução com as hemácias é adicionada na câmara em volume suficiente para preencher o canal que comunica os dois reservatórios que contêm os eletrodos. Utilizando as pinças ópticas captura-se uma hemácia e para a mesma célula aplicam-se diferentes voltagens (30, 40, 50, 60, 70 e 80 V) no sistema. Como a hemácia é carregada e a solução ao seu redor é eletrolítica, ela irá se mover em velocidade constante de acordo com a voltagem aplicada, como ilustrado na Figura 3. Assim, para cada voltagem mede-se a velocidade terminal da hemácia e se recaptura a mesma célula para ser aplicada a próxima voltagem. Métodos baseados em medidas individuais são mais sensíveis a pequenas diferenças existentes que métodos baseados somente em médias. Todas as medidas foram gravadas em tempo real e as imagens foram analisadas qualitativamente com auxílio dos softwares Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e VirtualDub (by Avery Lee). Após as medidas e as análises, o ζ foi determinado experimentalmente através da equação de Smoluchowski [20]:

$$v = (\varepsilon \zeta / \eta) E,$$

onde V é a velocidade terminal medida, E é o campo elétrico dado pela voltagem dividida pela distância entre os eletrodos, ε é a constante dielétrica do soro sanguíneo [7] e η é a viscosidade do soro sanguíneo medida utilizando um viscosímetro de Ostwald. Assim, através de uma curva de velocidade em função do campo elétrico podemos determinar o ζ .

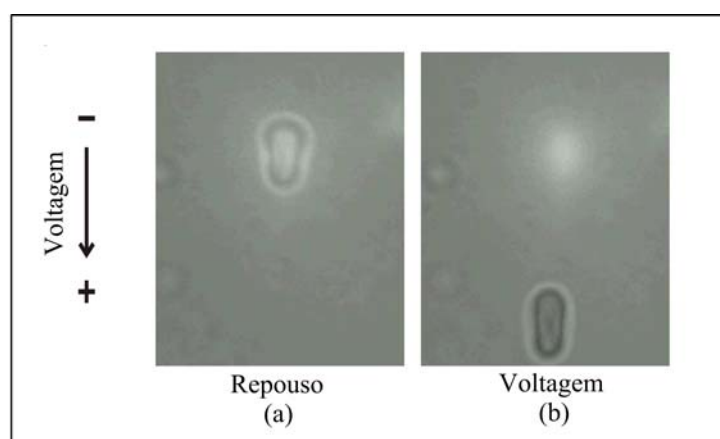


Figura 3: Migração de hemácia submetida a voltagens.

RESULTADOS:

Para a análise dos eritrócitos do 1º dia, obtidos de bolsas de concentrado de hemácia com solução de CPD/SAG-M e em tubos em EDTA (K₃), observamos uma diminuição do ζ na presença do EDTA, ilustrado nos histogramas da Figura 4. Os valores

médios, máximos e mínimos obtidos para o ζ com EDTA e CPD/SAG-M estão na Tabela 1. A média do ζ das hemácias em CPD-SAGM foi $\zeta = -14,8$ mV e em tubos com EDTA foi $\zeta = -7,9$ mV. As células estocadas apresentaram valores decrescentes do ζ durante as duas primeiras semanas, estabilizando-se a partir da terceira semana, assim como mostra a Figura 5. As hemácias estocadas apresentaram os seguintes valores: 5º dia: $\zeta = -13,5$ mV, 10º dia: $\zeta = -9,0$ mV, 15º dia: $\zeta = -7,5$ mV, 20º dia: $\zeta = -7,5$ mV e 25º dia: $\zeta = -7,8$ mV.

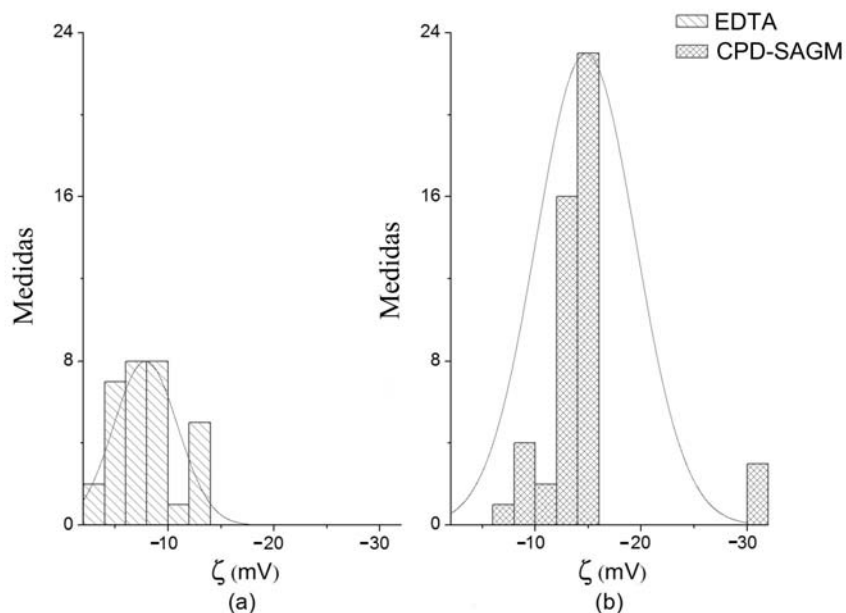


Figura 4: Histogramas da distribuição do potencial Zeta: (a) EDTA e (b) CPD-SAGM.

	N total	Média (ζ) mV	Mínimo (ζ) mV	Máximo (ζ) mV
EDTA	31	- 7.9	- 3.1	- 14.0
CPD/SAGM	49	-14.8	- 7.8	- 31.1

Tabela 1: Valores do ζ obtidos em EDTA e CPD-SAGM.

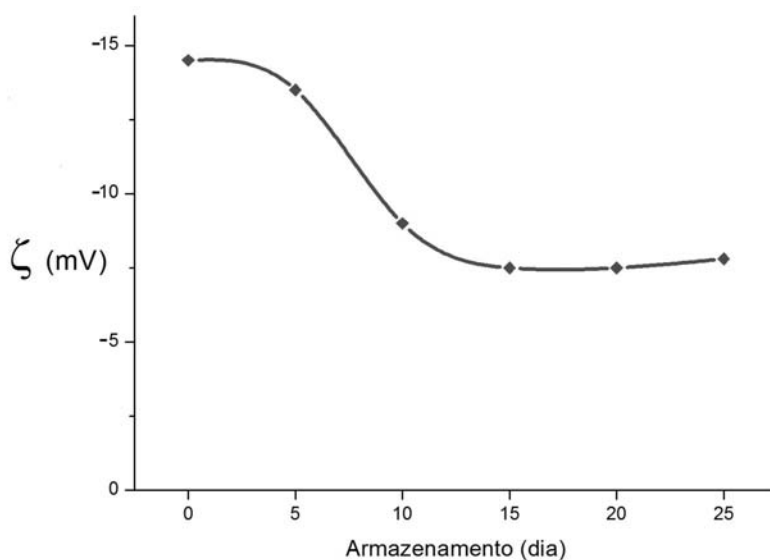


Figura 5: Evolução temporal do ζ durante o armazenamento em CPD-SAGM.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Devido a sua propriedade não conservante, o EDTA (K_3) não previne danos oxidativos, podendo assim favorecer a redução das cargas elétricas, com conseguinte diminuição do ζ . O próprio EDTA tem sido citado por sua possível ação sobre as propriedades da membrana eritrocitária alterando, por exemplo, a permeabilidade e elasticidade celular através de danos a proteínas membranares [12], logo tal processo também pode ser sugerido como o possível mecanismo responsável pela diminuição das cargas. Já para as hemácias estocadas, provavelmente, a degeneração de leucócitos presentes no concentrado tenha possibilitado a diminuição das cargas negativas da membrana eritrocitária, devido à liberação de enzimas hidrolíticas durante o armazenamento que alteram as glicoproteínas da membrana. A leucorredução ou deleucotização por filtros remove mais de 99,9% de leucócitos do componente original [1, 5]. Desta forma entre outras vantagens, tais como a redução da sensibilização contra antígenos leucocitários, a deleucotização pode também prevenir os danos da membrana eritrocitária por enzimas leucocitárias.

Foi estabelecida uma metodologia para avaliar o ζ de hemácias em diferentes condições, a qual poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação utilizando diferentes meios potencializadores e proporcionar melhor conhecimento sobre as lesões de membrana em hemácias durante o período de armazenamento com diversos meios conservantes.

Nós também acreditamos que a metodologia proposta para medir o potencial Zeta usando pinças ópticas pode ser estendida para outros tipos de células, onde o ζ seja um parâmetro importante. As células nos organismos multicelulares são carregadas e cercadas de soluções eletrolíticas. O potencial Zeta pode, por exemplo, ser utilizado para diferenciar células de baixo potencial metastático de células de alto potencial metastático [6].

AGRADECIMENTOS: À Fundação HEMOPE nas pessoas de Raul Melo, Frida Reffert, Aderson Araujo, Ana Maria do Nascimento e Roberto Porpino que colaboraram para realização desta pesquisa, ao HEMOCENTRO (UNICAMP) e as seguintes agências financiadoras: L'oreal, ABC, UNESCO, CAPES, CNPq e FACEPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical Manual AABB**. 16th ed., Bethesda, Maryland, 2008.
- 2- ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; BJORKHOLM, J. E. & CHU, S. – **Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles**. Optic. Lett., 11: 288 – 290, 1986.
- 3- BARJA-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; FONTES, A.; COSTA, F. F.; CESAR, C. L. & SAAD, S. T. O. – **Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers**. Transfusion, 42 (9): 1196 – 1199, 2002.
- 4- BRANDÃO, M. M.; BARJA-CASTRO, M. L.; FONTES, A.; CÉSAR C. L.; COSTA, F. F. & SAAD, S. T. O. – **Impaired red cell deformability in iron deficient subjects**. Clin. Hemorheol. and Microcirc., 43: 217 – 221, 2009.

- 5- BRUIL, A.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J. & VAN AKEN, W.G. – **The mechanisms of leukocyte removal by filtration.** Transfus. Med. Rev., 9: 145 – 66, 1995.
- 6- CARTER H. B.; COFFEY D. S. – **Cell-surface charge in predicting metastatic potential of aspirated cells from the dunning rat prostatic adenocarcinoma model.** J. Urol., 140: 173–175, 1988.
- 7- CHELIDZE, T. – **Dielectric spectroscopy of blood.** J. Non-Cryst. Solids, 305: 285–294, 2002.
- 8- DINU, C.; Z.; CHAKRABARTY, T.; LUNSFORD, E.; MAUER, C.; PLEWA, J.; DORDICK, J. S & CHRISEY, D. B. – **Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly.** Soft Matter, 5: 3818–3822, 2009.
- 9- EYLAR, E. H.; MADOFF M. A.; BRODY, O. V. & ONCLEY, J. L. – **The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte.** J. Biol. Chem., 237: 1992 – 2000, 1962.
- 10-FONTES, A.; FERNANDES H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA L. C.; BARJA-CASTRO, M. L & CÉSAR C. L. – **Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers.** J. Biomed. Optics, 13: 014001.1 – 014001.6, 2008.
- 11-GIRELLO, A. L. & KUHN, T. I. B. B. - **Fundamentos da Imuno - Hematologia Eritrocitária.** 2 Ed. Brasil. Senac Editora, 2007, 208 p.
- 12- GUTKOWSKI, R. F.; DWORKIN, H. J.; PORTER W. C.; ROHWER H. Jr.- **Radiolabeling of Red Blood Cells.** The Journal of Nuclear Medicine, 17 (12): 1113 – 1114, 1976.
- 13- HURUTA, R. R.; BARJA-CASTRO, M. L.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; FONTES, A.; BARBOSA, L. C., & CESAR, C. L. – **Mechanical Properties of Stored Red Blood Cells Using Optical Tweezers.** Blood, 92: 2975 – 2977, 1998.
- 14- LALIBERTE, M.; BORDELEAU F.; MARCEAU, N & SHENG, Y. – **Antigen detection at atomolar concentration using optical tweezers.** Proc. SPIE, 7386: 09, 2009.
- 15- NASCIMENTO, J. M.; SHI, L.; MEYERS S.; GAGNEUX, P.; LOSKUTOFF, N. M.; BOTVINICK E. L. & BERNIS, M. W. – **The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates.** J. R. Soc. Interface, 5 (20): 297–302, 2008.
- 16- PERKINS T. T. – **Optical traps for single molecule biophysics: a primer.** Laser & Photon. Rev. 3: 203–220, 2009.
- 17- POLLACK, W. & RECKEL, R. P. – **A reappraisal of the forces involved in Hemagglutination.** Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 54: 29–42, 1977.
- 18- POZZO L.; FONTES A.; THOMAZ A. A.; SANTOS B. S.; FARIAS P. M. A.; COPI D.; GIORGIO S. & CESAR C. L. – **Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for Leishmania amazonensis parasites.** Micron, 40: 617–620, 2009.

- 19- SAKATA, S. K.; KURACHI M & SOGAWA K. – **Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions.** Eur. Biophys. J. Biophys., 27: 55–61, 1998.
- 20- SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L. & LI, D. – **Zeta-potential measurements using Smoluchowski equation and slope of the current-time relationship in electroosmotic flow.** J. Colloid Interface Sci, 261: 402–410, 2003.
- 21- WANG, S. K.; CHIU, J. J.; CHEN, L. J.; LI, M. R.; CHOU, S. C. & HWANG, N. H. C. – **Optical tweezers measurements of leukocyte-endothelium adhesion force.** Asaio Journal, 50 (2): 166, 2004.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSÃO:

Através das pinças ópticas foram estabelecidas metodologias sensíveis capazes de quantificar parâmetros importantes de hemácias armazenadas em bancos de sangue, as quais poderão contribuir não só para a compreensão dos efeitos do armazenamento nas cargas de membrana e na elasticidade das hemácias (em diferentes e variadas situações), como também para a investigação da ação das substâncias potencializadoras nos testes imunohematológicos.

5.2 PERSPECTIVAS:

Sabendo que essas metodologias podem ser estendidas para outras células, por exemplo, trabalhos recentes indicam que as propriedades elástica e de carga de membrana são relevantes para a compreensão da biologia celular associada a migração e ao potencial metastático de células neoplásicas. Compreender os mecanismos associados a doenças pode ajudar a desenvolver novos protocolos de tratamento e diagnóstico. Por essa razão algumas perspectivas associadas a esse trabalho são: (1) investigar a ação de outras substâncias potencializadoras, tais como bromelina, LISS e dextran através de medidas de potencial Zeta e (2) estudar a elasticidade das hemácias em hemoglobinopatias como a talassemia e a ação da hidroxiuréia sobre a deformabilidade dessas células.

ANEXOS

ANEXO I:
NORMA DA REVISTA BRASILEIRA DE
ANÁLISES CLÍNICAS



REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

AOS COLABORADORES

A REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades em laboratórios de análises clínicas.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

INSTRUÇÕES INICIAIS

A Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) é uma publicação trimestral da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) indexada no ISSN 0370 – 369 x.

LILACS – www.bireme.br

Portão periódicos – www.periodicos.capes.gov.br

Classificação CAPES: Nacional B – Engenharias III e IV, Interdisciplinar, Odontologia, Ciências Biológicas III, Medicina I, II e III, Medicina Veterinária e Saúde Coletiva

www.capes.gov.br

<http://www.qualis.capes.gov.br/webqualis/ConsultaPeriodicos.faces>

Ao submeter o original do trabalho, os autores assumem a responsabilidade do trabalho não ter sido previamente publicado e nem estar sendo analisado por outra revista. Todas as contribuições científicas são avaliadas pelos Editores da Revista. Só serão encaminhados aos consultores científicos os artigos que estejam rigorosamente de acordo com as normas especificadas. A aceitação será feita em função da sua originalidade, importância e contribuição científica para o conhecimento da área.

Os artigos para publicação enquadram-se nas seguintes categorias:

Artigos Originais: A Revista Brasileira de Análises Clínicas aceita todos os tipos de pesquisa original nas diferentes áreas de atividade em análises clínicas, incluindo pesquisas em seres humanos e pesquisa experimental. Todos os artigos são avaliados para publicação

no menor prazo possível; porém, se você acredita que seu trabalho merece uma avaliação especial para publicação imediata ("fasttrack"), indique isso na sua carta aos Editores. Se os Editores concordarem com sua solicitação, todos os esforços serão realizados para revisar o trabalho em menos de 30 dias, e publicar no volume próximo da Revista.

O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Summary; Keywords; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados, Discussão, Conclusão; Agradecimento(s); Fontes de Aquisição, quando houver, e Referências Bibliográficas. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

Artigos de Revisão: Os Editores formulam convites para a maioria das revisões. No entanto, trabalhos de alto nível, realizados por autores ou grupos com histórico de publicações na área serão bem-vindos.

Editoriais: Os Editoriais da Revista Brasileira de Análises Clínicas são feitos através de convite. Os editoriais enviados espontaneamente, serão analisados pelos editores sobre a importância do seu conteúdo e pertinência de sua publicação.

Comunicações Breves: Experiências originais, cuja relevância para o conhecimento do tema justifique a apresentação de dados iniciais de pequenas séries, ou dados parciais de pesquisas ou ensaios laboratoriais, serão aceitos para avaliação.

Envio do Trabalho

Os originais do trabalho deverão ser enviados via internet seguindo as instruções disponíveis no item RBAC do portal da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas www.sbac.org.br

Os textos deverão ser editados em "Word", tamanho de fonte 12, letras

Arial ou Times New Roman, espaçamento simples. As figuras, fotos, tabelas e ilustrações devem vir após o texto, ou em arquivos separados. Figuras devem ter extensão JPEG e resolução mínima de 300 Dpi's. Todos os artigos devem vir acompanhados por uma carta de submissão ao Editor, declaração do autor de que todos os co-autores estão de acordo com o conteúdo expresso no trabalho, explicitando ou não conflitos de interesse e a inexistência de problemas éticos relacionados.

SEÇÕES DOS ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO:

Os artigos deverão seguir a seguinte ordem:

Título* (Em português e inglês)

Nome do autor ou autores (dados pessoais no rodapé – somente da 1ª página)

Resumo em português – Palavras – chave

Resumo em inglês – summary / keywords

Introdução

Material e métodos

Resultados

Discussão

Conclusões

Agradecimentos

Referências

* Um asterisco após o título é colocado com o objetivo de mencionar o local (Universidade, Departamento, Laboratório, etc.) em que se realizou a pesquisa e, se for o caso as fontes financiadoras.

TÍTULO – Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho (em português e inglês).

RESUMO – Deverá ser conciso e claro, pondo em relevo de forma precisa os fatos essenciais encontrados e as conclusões obtidas; ser redigido de forma impessoal e conter no máximo 200 palavras.

INTRODUÇÃO – Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos do mesmo setor. Extensas revisões da literatura devem ser evitadas, devendo ser substituídas por referências aos trabalhos ou fontes mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

MATERIAL E MÉTODOS – Deverão ser descritos de modo breve, porém o suficiente para possibilitar a repetição do trabalho; métodos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido modificados substancialmente, deverão ser apenas referidos por citação.

RESULTADOS – Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, etc. simples e ilustrativos.

DISCUSSÃO – Deve ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se hipóteses não baseadas nos mesmos.

CONCLUSÕES – Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, pode ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

AGRADECIMENTOS – Devem ser inseridos no final do trabalho, antes das referências bibliográficas.

INFORMAÇÕES GERAIS

O estilo editorial da Revista segue, em linhas gerais, o "Style Manual for Biological Journals" (Conference of Biological Editors, Committee on form and style. Style manual of Biological Journals, 2. ed. Washington, American Institute of Biological Sciences, 1974). As nomenclaturas, abreviações e unidades bioquímicas e físico-química devem seguir as adotadas pelo "Handbook of Biochemistry" (Sober, H. A – Handbook of Biochemistry, 2. ed. Cleveland, Chemical Rubber Co., 1997, Sec.A4 – A100); "Handbook of Chemistry Physics" (West, R. C. – Handbook of Chemistry and Physics, 53. ed.

Rua Vicente Licínio, 99 -Tel.: 0XX(21)2187-0800 - Fax: 0XX(21)2187-0805 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-902

Home page: www.sbac.org.br - e-mail: rbac@sbac.org.br

FILIAÇÃO:

IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE
COLABIOCLI - CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE

AMN - ASOCIACION MERCOSUR DE NORMALIZACION

ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

Cleveland Chemical Rubber Co., 1972 – 1973), e, essencialmente, o recomendado pela WHO através da: "Resolution WHA 30.30 adopted by thirtieth World Health Assembly, May 1977). Systeme International d'Unites; use of SI units in medicine", e da publicação: "The SI for Health Professions. WHO, 1977".

As atividades enzimáticas devem ser expressas em unidades internacionais e seguir o adotado em "Enzyme Nomenclature" (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publishing Co., 1965).

A nomenclatura dos micro-organismos deve obedecer os critérios adotados pelo Manual de Bergey (Breed, R. S.; Murray, E. G. D & Smith, N. R. – Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins Co., última edição).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – Deverão ser apresentados somente os trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas.

No texto – As referências no texto devem ser citadas assim:

VALLADA¹ ou (1); Correspondente ao número da lista de referência bibliográfica.

MENDES & CARVALHO (2)

SOUZA, CABRAL & MACHADO (3)

GONTIJO, FILHO *et al* (4) ou GONTIJO FILHO & cols (4)

VALLADA; MENDES & CARVALHO^{1,2} ou (1,2)

Na bibliografia – A relação das referências bibliográficas deve ser numerada e colocada em ordem alfabética dos sobrenomes dos autores, e seguir o disposto abaixo para artigos ou livros.

- a) **Para artigos** – SOBRENOME(S) DO(S) AUTOR(ES), SEGUIDO DO(S) PRENOME(S) (abreviado ou não desde que haja padronização deste procedimento, separados entre si por ponto e vírgula seguidos de espaço, segundo NBR 6023) – Título do trabalho (em itálico ou negrito). Título do periódico (abreviaturas de acordo com o "Word Scientific Periodicals"), volume e número do volume: número da página inicial e final, ano de publicação.

Exemplos:

1- VALLADA, E. P. – Cultura de urina. Rev. Bras. Anál. Clín., 1 (1): 21-23, 1969.

2- MENDES, M. Q. & CARVALHO, M. A. – Padrão múltiplo para

2- MENDES, M. Q. & CARVALHO, M. A. – Padrão múltiplo para dosagem de lipídeos séricos, triglicérides e lipídeos totais e colesterol ("Trilícol"). Rev. Bras. Anál. Clín., 9 (1): 1-3, 1977.

3- SOUZA, M. M.; CABRAL, M. C. & MACHADO, R. D. – Técnica de fixação de complemento aplicado ao estudo da raiva. Rev. Bras. Anál. Clín., 8 (2): 17-24, 1976.

4- Colocar todos os autores.

- b) **Para livros** – SOBRENOME(S) DO(S) AUTOR(ES), SEGUIDO DO(S) PRENOME(S) (abreviado ou não desde que haja padronização deste procedimento, separados entre si por ponto e vírgula seguidos de espaço, segundo NBR 6023). Título do livro (em itálico ou negrito): subtítulo (se houver). Número da edição (tradução se for o caso). Local de publicação: Editor, ano de publicação. Número de páginas ou volume. Se particulares páginas são conspurcadas, então citá-las.

Exemplos:

1 – MENDES, M. Q & LOPES, H. J. J. – Atualização em bioquímica clínica. 1 ed. Belo Horizonte, Mal Editora S.ª, 1973, 305 p.

2 – HENRY, R. J. – Química clínica. Bases e princípios. 1. ed. Espanhola. Barcelona, Editorial Jims, 1969, 2 v.

3 – BURNET, G. W.; SCHERP, H. W. & SCHUSTER, G. S. – Microbiologia Oral e Doenças Infecciosas. 4. ed. (1. ed. Brasileira). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1978, 756 p.

4- VERONESI, R. – Doenças Infecciosas e parasitárias. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1995 p.

5- CARVALHO, I. – Antibióticos e antibioticoterapia. In: VERONESI, R. – Doenças Infecciosas e parasitárias, 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1969, pt. 9. p. 1017 – 1072.

- c) **Para Tese:** NOME DO AUTOR, SEGUIDO DO PRENOME (abreviado ou não). Título da Tese (em itálico): subtítulo (se houver). Ano de apresentação. Número de folhas. Categoria (grau e área de concentração) – Instituição, local.

Exemplo:

CIRIBELLI GUIMARÃES, J. – *Febre Amarela Silvestre*. 1975. 80 p. Tese de Docência Livre – Instituto de Microbiologia da UFRJ. Rio de Janeiro.

- d) **Para Norma:** NOME DO ÓRGÃO NORMALIZADOR. Título: subtítulo (em itálico ou negrito), Número da norma. Local, ano, volume ou páginas.

Exemplo:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Informação e Documentação. Referências – Elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ILUSTRAÇÕES – Deverão ser citadas no texto como "Fig.", numeradas e vir acompanhadas de legendas explicativas após o texto ou em arquivos separados. Os desenhos, fotos e ilustrações devem ter extensão JPEG e resolução mínima de 300 dpi's.

QUADROS E TABELAS – Deverão vir numerados em algarismo arábico e apresentados após o texto ou em arquivos separados. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consultas ao texto. São permitidas notas explicativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições das experiências. Seguir, o quanto possível, as normas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:

- quando o fenômeno não existe;

- quando o fenômeno não existe;

0;0,0 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, o adotado no quadro;

... quando o dado não foi apurado, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno for mensurável, deverá ser expresso de maneira a somente figurarem os algarismos significativos.

DA PUBLICAÇÃO

1. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação dos Consultores Científicos.
2. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
3. No caso de mais de um autor deverão ser expressamente indicados os responsáveis pela publicação. Na ausência dessa informação, o primeiro será considerado o responsável.
4. Os trabalhos em língua estrangeira serão submetidos a um revisor competente (pelo que será cobrada uma taxa dos autores) e devolvidos se a redação for inadequada.
5. Para correspondência, os autores responsáveis devem fornecer os seus endereços.
6. A reprodução dos trabalhos publicados na Revista será permitida quando citada a origem da publicação.

Rua Vicente Licínio, 99 - Tel.: 0XX(21)2187-0800 - Fax: 0XX(21)2187-0805 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-902

Home page: www.sbac.org.br - e-mail: rbac@sbac.org.br

FILIAÇÃO:

IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE

COLABIOCLI - CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE

AMN - ASOCIACION MERCOSUR DE NORMALIZACION

ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO

ANEXO II:
COMPROVAÇÃO DE ACEITE



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas ®

Rio de Janeiro, 05 de agosto de 2010.

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Diego César Nunes da Silva

Prezado(a) Doutor(a),

Gostaríamos de informar que o trabalho intitulado "Uso de pinças ópticas para avaliação do potencial zeta de hemácias em EDTA, CPD-SAGM e ESTOCADAS" foi aceito para publicação na RBAC – Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol 42 – n° 04/2010.

Sem mais para o momento, firmamo-nos.

Atenciosamente,


Dr. Mateus Mandu de Souza
Diretor da RBAC

Rua Vicente Licínio, 99 - Tel.: 0XX(21)2187-0800 - Fax: 0XX(21)2187-0801 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-902
Home page: www.rbac.org.br - e-mail: rbac@rbac.org.br

FILIAÇÃO:

IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE
COLABIOCLI - CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS
CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE
AMN - ASOCIACIÓN MEXICANA DE NORMALIZACIÓN
ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO

ANEXO III:
ATIVIDADES COMPLEMENTARES E
RESUMOS DE CONGRESSOS

Neste terceiro anexo apresentaremos os estudos complementares realizados, tais como a montagem dos sistemas de pinças ópticas e as medidas com papaína. Tanto o trabalho realizado com a elasticidade, assim como o trabalho realizado com as hemácias desleucotizadas serão aqui descritos pelos resumos submetidos ao HEMO. Além disso, aqui também listaremos outros resumos aceitos ou submetidos para congressos.

1. ESTUDO DOS COMPONENTES DE UM SISTEMA DE PINÇAS ÓPTICAS, ADAPTAÇÕES E MONTAGEM:

O esquema experimental básico de uma pinça óptica está ilustrado na figura 1. Iremos aqui revisar os componentes escolhidos, os motivos pelos quais os escolhemos e acrescentar novas informações e modificações feitas ao sistema. Iremos também descrever os procedimentos para a realização da demonstração do sistema através de manipulações com células.

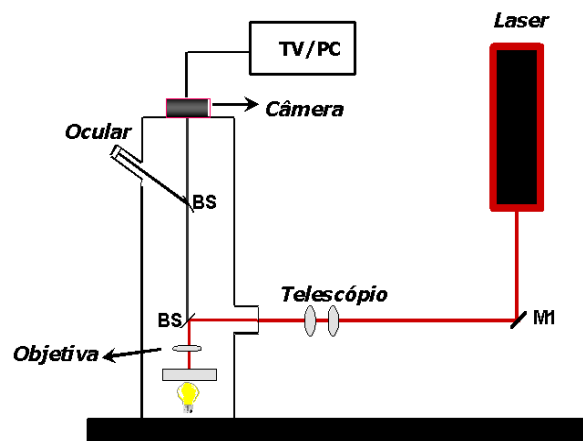


Figura 1. Montagem experimental de um sistema de pinça óptica (FONTES, 2004).

Esta etapa envolveu a escolha dos componentes que compõem a pinça óptica, o motivo pelo qual os escolhemos, realização das adaptações necessárias e a montagem em si. A etapa da escolha dos componentes envolveu estudos sobre lasers, microscópios ópticos e também espelhos e lentes.

1.1 COMPONENTES DO SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA:

1.1.1 MICROSCÓPIO ÓPTICO SIMPLES E OBJETIVA:

O microscópio utilizado foi um de fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha). Foi removida toda óptica da fluorescência e colocamos num suporte de filtro da fluorescência um espelho próprio para o laser. Esse espelho reflete bem o laser e deixa chegar até a câmera boa parte da luz visível, assim podemos visualizar o que estamos capturando.

Os parâmetros que definem a objetiva são: aumento, abertura numérica, distância de trabalho e meio de imersão (água ou óleo). O aumento é uma relação que indica o quanto de

aumento vai-se obter utilizando a objetiva. A abertura numérica é definida como o ângulo do cone de luz na saída da objetiva. De acordo com a Lei do seno de Abbe a abertura numérica (NA) é definida como: $NA = n \sin\theta$, onde θ é o ângulo indicado na figura 2 (a). Quanto maior a abertura numérica, maior é o ângulo de abertura do cone de luz formado. As objetivas de imersão a óleo são as que têm maior abertura numérica, podendo chegar a 1,4. Outro fator relacionado às aberturas numéricas é a distância de trabalho de uma objetiva, que é definida como a distância do objeto à saída da objetiva. De acordo com a Figura 2 (b), percebe-se que quanto maior o aumento, maior é a abertura numérica e menor é a distância de trabalho. A objetiva principal escolhida foi uma objetiva de aumento de 100X, abertura numérica de 1,25 (de óptica infinita).

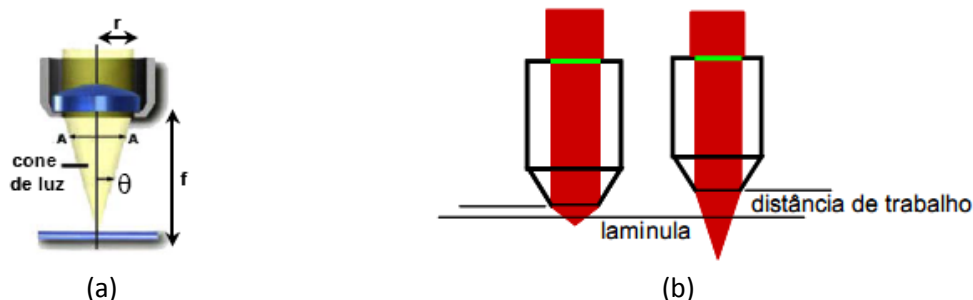


Figura 2. (a) Definição da Abertura Numérica. (b) Abertura numérica e distância de trabalho (FONTES, 2004).

Armadilhas em 3 dimensões só são obtidas com aberturas numéricas da ordem de 1, tipicamente com aumentos acima de 60X. Qualquer movimento horizontal observado com objetivas de 40X ou menos são, na realidade, de falsa armadilha, usualmente de partículas no fundo da lâmina que não podem se mover na direção vertical. Quanto maior a abertura numérica, maior a força na direção vertical às custas de uma força menor na direção horizontal, conforme esquematizado na figura 3. Na pinça óptica então as forças são anisotrópicas, a força em z é sempre menor que as forças no plano. Quando então uma célula que se movimenta é capturada, ela tem mais facilidade para escapar pela direção z.

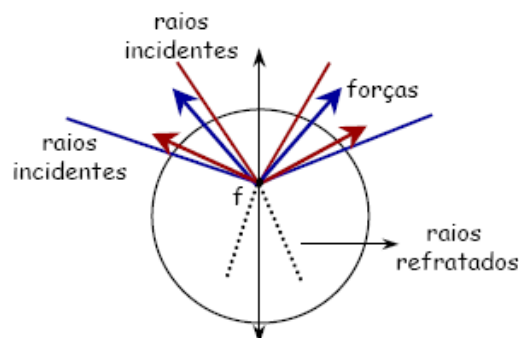


Figura 3. Forças e a abertura numérica (FONTES, 2004).

1.1.2 ESPELHOS:

Os espelhos que usamos são específicos para o laser, ou seja, específicos para o comprimento de onda de 1064 nm emitido pelo mesmo. Eles são espelhos dicróicos, ou seja, são transparentes ao visível, com filme refletor para esse comprimento de onda.

1.1.3 LASER:

Utilizamos um laser no $\lambda = 1064$ nm (IPG Photonics, EUA), pois a maioria das substâncias que compõem os seres vivos são transparentes ao infravermelho, sendo a absorção pequena, não causando danos as estruturas biológicas estudadas, assim como apresentamos na seção 1 da revisão bibliográfica.

1.1.4 TELESCÓPIO:

Duas lentes que funcionam como um telescópio, devendo estar uma no foco da outra. Apresentam a função de possibilitar que capturemos a imagem no plano de visão das lentes oculares do microscópio e não da objetiva. Se as mesmas não estivesse presente, o foco do laser iria coincidir com o plano focal da objetiva e não nos permitiria observar a captura das estruturas analisadas. Esta mudança de planos focais (da lente objetiva para as oculares) é feita através do ajuste da distância entre as duas lentes do telescópio, como exemplificado nas figura 4. Outra função do telescópio é regular a largura do feixe de laser que vai entrar no microscópio. Escolhemos as distâncias focais para que o feixe preencha bem a objetiva, conforme ilustrado na figura 5. Inicialmente havíamos escolhido duas lentes de distâncias focais iguais (5 cm), ou seja, $f_1 = f_2$. Entretanto, posteriormente, para otimizar o nosso sistema, escolhemos uma lente com distância focal de 6 cm (f_1) e outra de 5 cm (f_2). Ou seja, quisemos aumentar o feixe, pois verificamos que o mesmo não estava preenchendo bem a objetiva. Com as lentes de 6 cm e 5 cm observamos os sistemas sendo capturados mais eficientemente. Se não preenchermos a objetiva adequadamente é como se tivéssemos uma objetiva de menor aumento e não se poderia capturar a partícula tridimensionalmente.

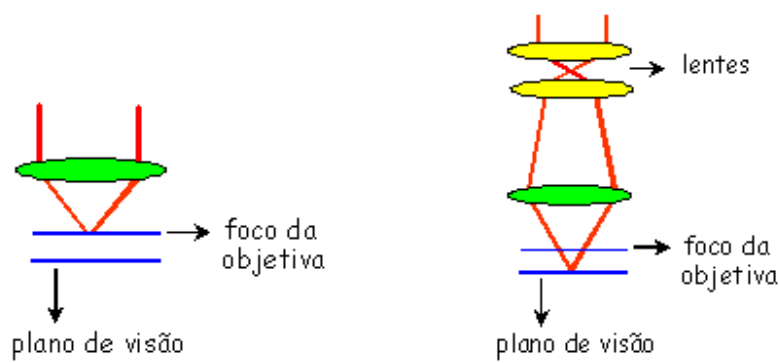


Figura 4. Função do telescópio na pinça óptica, exemplificando como o mesmo pode deslocar a formação da imagem do foco da objetiva para o plano de visão da ocular, possibilitando assim que possamos visualizar a partícula capturada (FONTES, 2004).

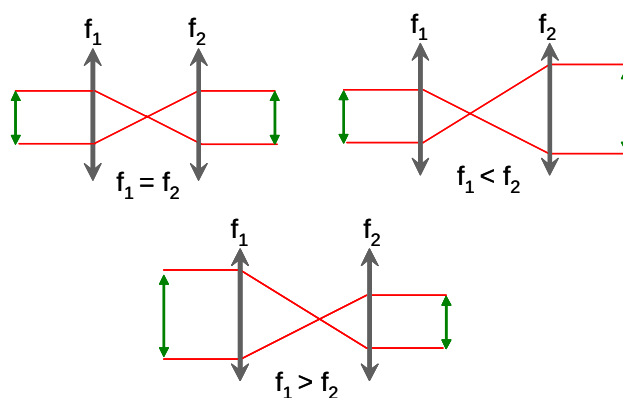


Figura 5. Representações de como as lentes do telescópio podem mudar o tamanho do feixe, f_1 e f_2 são as distâncias focais.

1.1.5 SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGEM

O pinça óptica apresenta um sistema de captura de imagem em tempo real constituído de uma câmera de vídeo (SDC-415ND, Samsung, Japão) e uma placa de vídeo (Pinnacle Systems, EUA) acoplada a um computador. A câmera foi acoplada ao microscópio através de uma “junção” que foi fabricada no departamento de física, da UFPE. O sinal recebido pela câmera é enviado a um computador através de uma placa de captura de vídeo. As CCD’s das câmeras possuem detectores de silício que são capazes de detectar sinais de até 1100 nm. Contudo, para não apresentarem objetos que o olho humano não enxerga essas câmeras vêm com filtros que só deixam passar a região do visível. Este filtro foi retirado (pois será necessária a visualização do laser no processo de alinhamento da pinça – descrito posteriormente), e foi construída uma “adaptação” que permite a colocação de um filtro azul na câmera (interessante na hora da manipulação para não visualizarmos o feixe do laser, e sim a partícula que estamos capturando). Este sistema de captura de imagem além de nos permitir acompanhar as manipulações em tempo real, também é essencial para o processo de calibração do sistema óptico da pinça, pois só através dele poderemos observar se o feixe do laser está incidindo perpendicularmente na amostra, se ele está bem focado e onde está incidindo.

1.2 ALINHAMENTO DO SISTEMA DE PINÇA ÓPTICA

O procedimento de alinhamento de uma pinça óptica consiste fazer com que o laser incida de forma perpendicular na objetiva e garante que haja o aprisionamento em três dimensões. Como não podemos visualizar o feixe do laser no infravermelho fizemos todo o processo de alinhamento com o feixe no visível da seguinte maneira:

- (1) Sem as duas lentes que constituem o telescópio, obrigamos o laser visível a incidir

perpendicularmente na objetiva do microscópio. Para isso é muito importante a visualização do feixe no monitor do computador. Quando o laser estiver perpendicular veremos no monitor um círculo concêntrico de laser simétrico que irá abrir e fechar uniformemente conforme movemos o parafuso de ajuste focal do microscópio (figura 6). Se o laser não estiver perpendicular, não conseguiremos posteriormente mover a partícula nas três direções x , y e z . Essa “perpendicularização” é feita movimentando alternadamente os espelhos descritos acima, de forma que encontremos um círculo perfeito no monitor, como ilustra a figura I.

- (2) A etapa mais crítica do processo de alinhamento é quando introduzimos as lentes para o telescópio. Primeiramente colocamos apenas uma delas, a mais perto em relação ao laser. Agora, movendo apenas a lente que acabamos de introduzir obrigamos o foco do laser a estar no mesmo ponto em que estava antes da lente ser colocada e de maneira vertical, obedecendo à condição ilustrada anteriormente na figura 7. Garantida que a primeira lente está centralizada, colocamos a segunda lente. Repetimos o procedimento anterior.
- (3) Agora, o procedimento para colocar o laser no plano de visão. Nesse ponto é bom usar como referência uma câmara Neubauer (dispositivo utilizado para a contagem de glóbulos vermelhos do sangue – ilustrado na figura 8). A câmara de Neubauer é ideal para manipulações com pinças ópticas, pois permite a captura em movimentação tridimensional da amostra, já que tem uma profundidade de $100\ \mu\text{m}$. Preparamos a Neubauer com água, fechamos com a lamínula e colocamos óleo de imersão sobre a mesma para usar a objetiva de $100\times$. Focalizamos a imagem até enxergar bem as ranhuras de $50\ \mu\text{m}$ da Neubauer, nos certificando assim que estamos no plano de visão do microscópio. Liberamos o laser. Já deve ser possível visualizar o laser nesse estágio se as etapas anteriores foram bem feitas. Agora, movendo a segunda lente apenas na direção z ajustamos para que a captura das partículas ocorra bem próxima do plano de visão do microscópio.

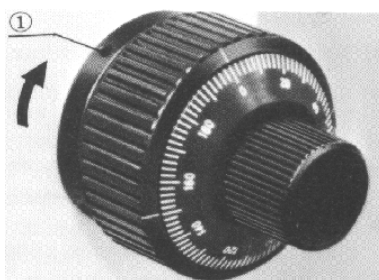


Figura 6. Parafuso de ajuste focal (FONTES, 1999).

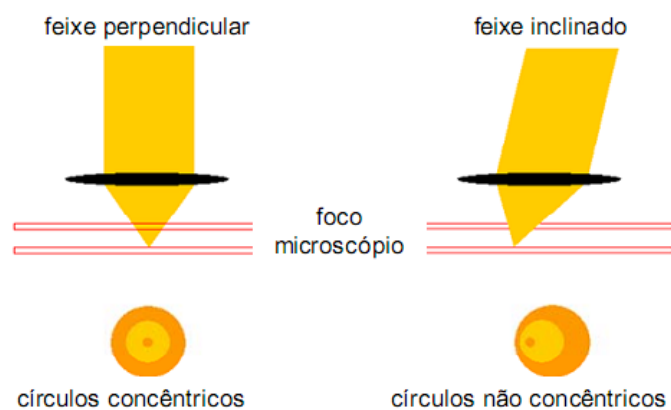


Figura 7. Alinhamento do sistema (FONTES, 2004).

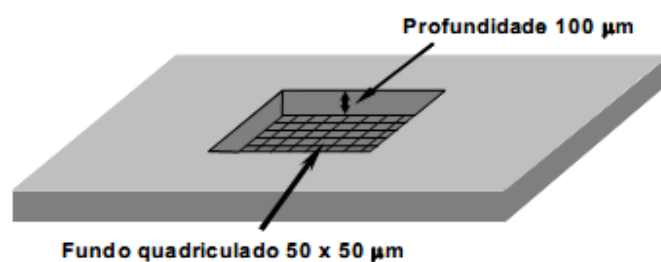


Figura 8. Ilustração de uma câmara Neubauer (FONTES, 2004).

1.3 MONTAGEM DA PINÇA ÓPTICA

A montagem da pinça óptica está ilustrada nas fotografias da figura 9 tiradas no laboratório de Nanoestruturas e Interfaces Biológicas.

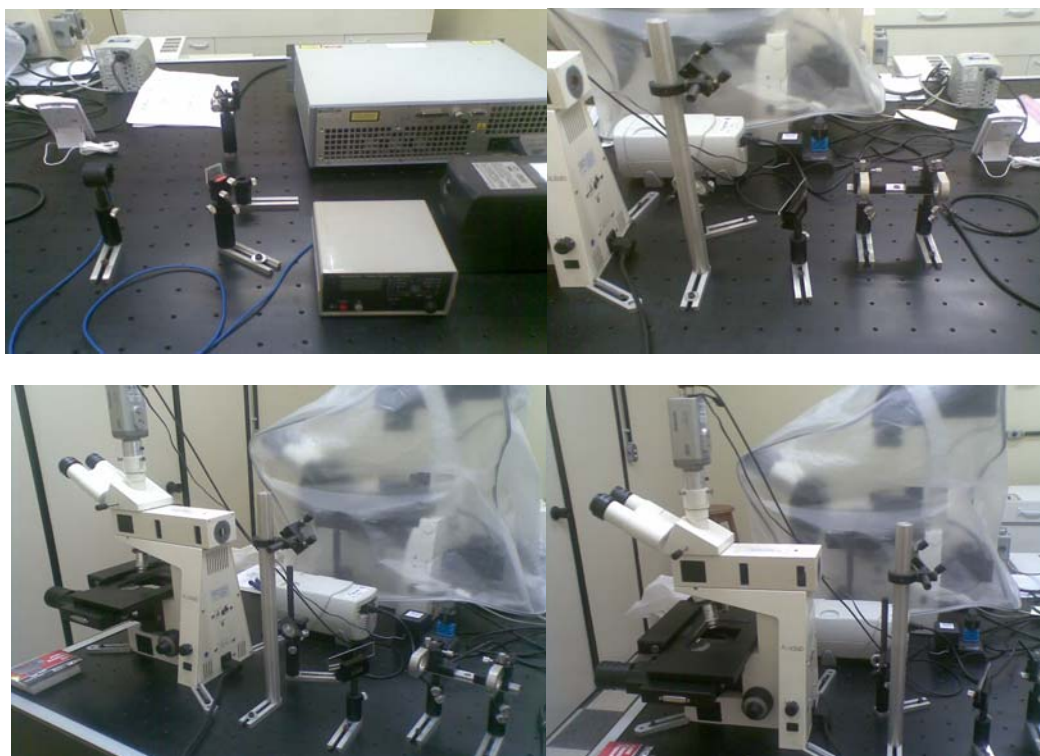


Figura 9. Fotos tiradas da pinça óptica montada no laboratório na UFPE.

1.4 FUNCIONAMENTO DA PINÇA ÓPTICA:

Terminados os processos de estudo e escolha dos componentes e montagem do sistema de pinça óptica, realizamos alguns experimentos para verificar o seu funcionamento. No período em questão, realizamos três experimentos: (1) Captura de microesferas de sílica (2) Captura de hemácias e (3) Captura de *Trypanossoma cruzi* (*T. cruzi*).

(a) CAPTURA DE MICROESFERAS:

Na figura 10 mostramos uma seqüência de quadros referentes à captura de uma microesfera marcada por uma seta.

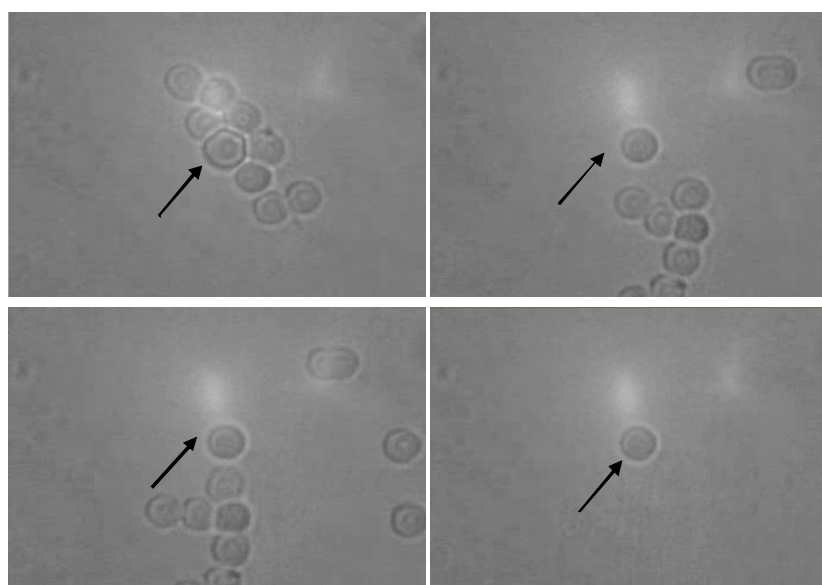


Figura 10. Aprisionamento de microesferas de sílica.

(b) CAPTURA DE HEMÁCIA E *Trypanossoma cruzi*:

Na figura 11 (a) mostramos uma hemácia capturada pela pinça óptica, onde observamos a sua deformabilidade. Para a captura de hemácias, tivemos que usar um atenuador de potência para o laser, pois as hemácias são células frágeis e mesmo o laser no infravermelho (dependendo da potência) pode danificar a amostra. Nas figuras 11 (b) e 12 observamos os parasitas capturados pela pinça óptica. Aqui destaca-se que na figura 12 observamos bem a morfologia da célula, pois o parasita está mais próximo ao fundo da Neubauer. Enquanto que na figura 11 (b), o parasita está a cerca de 20 μm do fundo da Neubauer, projetando seu corpo para baixo.

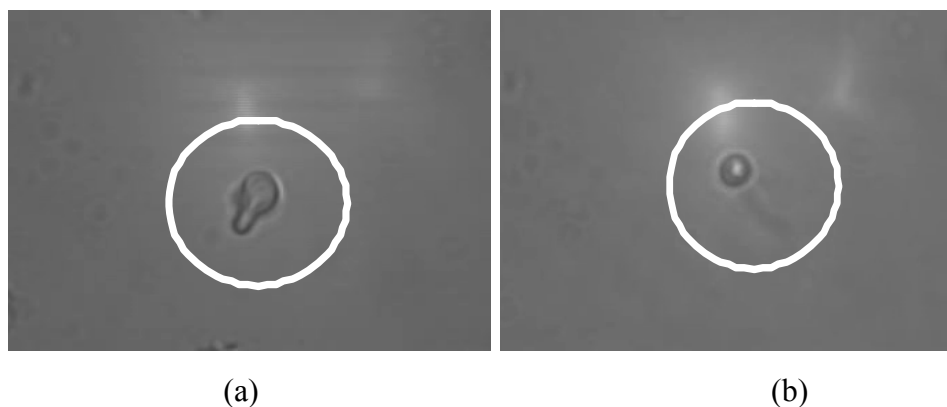


Figura 11. (a) hemácia e (b) *T. cruzi* capturados pela pinça óptica.

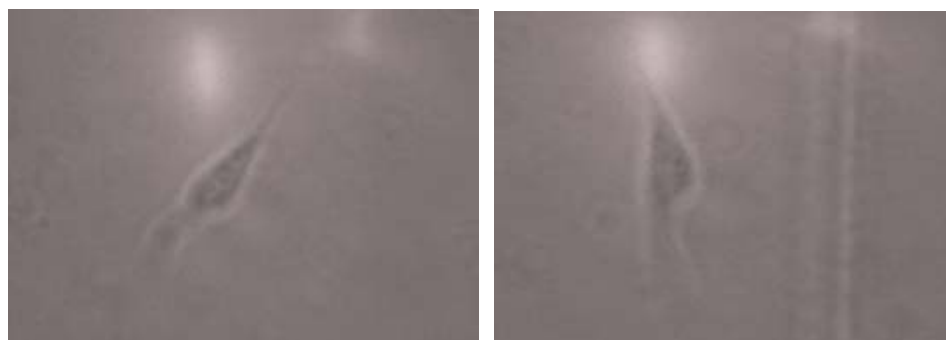


Figura 12. Captura de *T. cruzi* pela pinça óptica.

2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE HEMÁCIAS COLETADAS EM EDTA E CPD/SAG-M TRATADAS COM A ENZIMA PAPAÍNA:

Apesar de fisiologicamente o potencial Zeta diminuir a aglutinação intravascular, a maioria dos testes imunohematológicos de reação antígeno-anticorpo, realizados em bancos de sangue, são baseados no princípio de aglutinação e necessitam da diminuição do potencial Zeta para que a reação ocorra. Substâncias potencializadoras como a papaína, que atuam diminuindo este potencial Zeta são empregadas rotineiramente nestes centros. Como esses testes podem ser realizados em hemácias coletadas em EDTA ou em bolsas de doação e sabendo que hemácias coletadas em EDTA apresentaram valores menores do potencial Zeta em relação às em CPD/SAG-M (CPD/SAG-M = $-14,5$ mV e em EDTA = $-7,9$ mV), avaliamos o potencial Zeta de hemácias papainizadas coletadas nestes dois meios.

2.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:

2.1.1 COLETA:

Vinte células foram analisadas em CPD/SAG-M (Citrato, Fosfato, Dextrose, Solução Salina, Adenina, Glicose e Manitol) obtidas do tubo conector da bolsa do concentrado de hemácias e dezesseis células de tubos de coleta o vácuo com EDTA (K₃). Todas as amostras foram obtidas de doadores da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), pertencentes ao grupo O Rh (D) positivo. As amostras assim que coletadas eram devidamente acondicionadas e transportadas ao laboratório da pinça óptica, no menor tempo possível, não ultrapassando 2 horas entre a coleta e as análises.

2.1.2 TRATAMENTO DAS HEMÁCIAS COM A ENZIMA PAPAÍNA:

As amostras em CPD/SAG-M e EDTA foram tratadas através do kit ID-Papain da Diamed, através do procedimento de utilização para tratamento enzimático prévio das hemácias (técnica em 2 estágios), da seguinte maneira:

- (1) Lavar o concentrado de hemácias 3 vezes com solução salina isotônica a 0,9%.
- (2) Remover completamente o sobrenadante após a ultima lavagem.
- (3) Preparar uma suspensão de hemácias a 5% com salina isotônica, como descrito abaixo:
 - Colocar 1,0 mL de salina isotônica em tubo de vidro limpo.
 - Adicionar 50 mL do concentrado de hemácias lavadas.
- (4) Adicionar 1,0 mL de “ID-Papain”.
- (5) Homogeneizar cuidadosamente e incubar 5 minutos em temperatura ambiente (18 – 25°C).
- (6) Lavar 2 vezes com “ID-CellWash P”.
- (7) Remover completamente o sobrenadante.

Após a remoção do sobrenadante descrito no item 7 as hemácias papainizadas era diluídas em soro do grupo AB Rh (D) positivo (0,5:500 µL) e adicionadas na câmara de medida e em seguida avaliada o potencial Zeta segundo a metodologia descrita na seção 2.2.

2.1.3 RESULTADOS

Os potenciais Zetas foram em módulo 3,2 (EDTA) e 4,0 mV (CDP/SAG-M). Esses resultados mostram que mesmo que o potencial Zeta seja diferente inicialmente em EDTA e CPD/SAG-M, em ambos os casos ocorre à redução necessária para a que haja a aglutinação. Além

disso, observamos que após o tratamento com papaína, algumas hemácias se tornam carregadas positivamente em ambos os grupos, mas o potencial Zeta continua reduzido em módulo.

3. RESUMO APRESENTADO NO 2º CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE BIOMEDICINA, 6º CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA E 2º EREMBIOM.

AValiação da carga elétrica de hemácias através de pinças ópticas: aplicações em imunohematologia.

D. C. N. Silva^{(1)*}, H. P. Fernandes⁽³⁾, A. D. P. R. Oliveira⁽¹⁾, P. M. A. Farias⁽¹⁾, B. S. Santos⁽²⁾, C. L. Cesar⁽⁴⁾, M. L. Barjas-Castro⁽³⁾, A. Fontes⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, Brasil.

⁽²⁾ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, Brasil.

⁽³⁾ Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, Brasil.

⁽⁴⁾ Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, Brasil.

* Apresentador é aluno da pós-graduação em Ciências Biológicas - UFPE. E-mail: diego.bio.cesar@bol.com.br

Grupo de Nanoestruturas e Interfaces Biológicas - Laboratório de Biofísica Química – CCB – UFPE.

Algumas glicoproteínas presentes na membrana eritrocitária contêm ácido siálico, principal responsável pela carga negativa na superfície das hemácias, este, quando em solução, cria um potencial elétrico repulsivo chamado Potencial Zeta (ζ) que impede a aglutinação intravascular. No entanto, a maioria dos testes imunohematológicos de reação antígeno-anticorpo realizados em bancos de sangue são baseados em aglutinação, por isso utiliza-se substâncias potencializadoras, como a papaína, para diminuir o ζ , permitindo a reação. A pinça óptica é uma ferramenta fotônica que pode ser utilizada para uma melhor compreensão da ação destas substâncias potencializadoras nas cargas elétricas da membrana eritrocitária, assim como a mensuração do ζ . O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para quantificar o ζ de hemácias na ausência e presença

da papaína. A pinça óptica consiste de um laser no infravermelho focalizado através de uma objetiva de 100x de um microscópio equipado com uma câmera, que registra a imagem de células capturadas em tempo real. Estas imagens foram analisadas utilizando o software Image Pro Plus. O ζ foi obtido através da medição da velocidade terminal das hemácias após serem libertadas da armadilha óptica, sob diferentes voltagens. Foram analisadas 20 hemácias para cada situação. O ζ para as hemácias não tratadas foi de $-14,5$ mV e para as tratadas de $+7,3$ mV. Observamos uma inversão de cargas na membrana de hemácias na presença da papaína. Um resultado, até onde sabemos, não relatado na literatura. Concluindo, com este trabalho fomos capazes de estabelecer uma metodologia para avaliar o ζ e quantificá-lo na presença e ausência da papaína. Esta análise poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação na rotina transfusional e possibilitar a associação de substâncias potencializadoras melhorando a sensibilidade da reação sem perda significativa da especificidade.

4. RESUMO APRESENTADO NO 37º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E 10º CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA

USO DE PINÇAS ÓPTICAS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE HEMÁCIAS EM EDTA, CPD-SAGM E ESTOCADAS

D. C. N. Silva^{(1)*}, H. P. Fernandes⁽²⁾, C. N. Jovino⁽¹⁾, M. M. Filho⁽¹⁾, A. F. M. Filho⁽¹⁾, A. D. P. R. Oliveira⁽¹⁾, P. M. A. Farias⁽¹⁾, B. S. Santos⁽¹⁾, C. L. Cesar⁽²⁾, M. L. Barjas-Castro⁽²⁾, A. Fontes⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco - ⁽²⁾Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO: A superfície eritrocitária é carregada negativamente, principalmente devido ao ácido siálico de suas glicoproteínas, o que leva à formação de um potencial elétrico repulsivo denominado Potencial Zeta (Z), o qual impede a aglutinação intravascular. No entanto, a maioria dos testes imunohematológicos são baseados em aglutinação e necessitam da diminuição do Z para maior sensibilidade. Através das Pinças Ópticas (PO), ferramenta capaz de capturar células utilizando a luz, propomos uma metodologia para quantificar o Z e a aplicamos para medidas em hemácias recém coletadas com EDTA e células de concentrado de hemácias (CH) coletadas com CPD/SAG-M e armazenadas por períodos variados, visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas à lesão oxidativa do armazenamento, podendo ser um parâmetro de

qualidade transfusional. **METODOLOGIA:** A PO consiste de um laser no infravermelho, direcionado a um microscópio, que captura as hemácias. O Z é obtido através da velocidade terminal das células após serem liberadas da armadilha óptica, sob diferentes voltagens. Foram analisadas 30 células (1º dia) em EDTA e CPD/SAG-M. Dez hemácias estocadas foram analisadas a cada 5 dias até o 25º dia, através de amostras do fragmento de CH. **RESULTADOS:** O Z em CPD/SAG-M foi - 14,5 mV e em EDTA: - 8,0 mV. Já para hemácias estocadas obteve-se, 5º dia: - 13,5 mV, 10º dia: - 9,0 mV, 15º dia: - 7,5 mV, 20º dia: - 7,5mV e 25º dia: - 7,8 mV. Houve uma diminuição de cargas na presença do EDTA. As hemácias do CH apresentaram valores de Z decrescentes nas primeiras semanas, estabilizando-se a partir da 3ª. Provavelmente, enzimas liberadas de leucócitos lisados durante o armazenamento tenham alterado as glicoproteínas da membrana eritrocitária levando a uma redução das cargas negativas. **CONCLUSÃO:** Foi estabelecida uma metodologia para avaliar o Z de hemácias em diferentes condições, a qual poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação na rotina transfusional e no monitoramento da qualidade dessas células com a estocagem. **APOIO:** HEMOPE, HEMOCENTRO (UNICAMP), L'oreal, ABC, UNESCO, CAPES, CNPq e FACEPE.

5. RESUMOS SUBMETIDOS AO CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (HEMO 2010).

5.1 MENSURAÇÃO TEMPORAL DO POTENCIAL ZETA EM HEMÁCIAS ARMAZENADAS UTILIZANDO PINÇAS ÓPTICAS

D. C. N. Silva^{1*}, C. N. Jovino², C. A. L. Silva³, S. C. A. Lucena³, A. M. N. Costa³, H. P. Fernandes⁴, C. L. Cesar⁵, P. M. A. Farias¹, B. S. Santos², M. L. Barjas-Castro⁴, A. Fontes¹

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

³ Fundação Hemope – Recife, PE

⁴ Hematology and Transfusion Center, UNICAMP

⁵ Instituto de Física, UNICAMP

A superfície eritrocitária possui glicoproteínas conjugadas ao ácido siálico, principal responsável pelas cargas negativas de membrana. Estas cargas influenciam a distribuição de íons ao redor da

célula, criando um potencial elétrico repulsivo denominado Potencial Zeta (ζ), que atua impedindo a agregação das hemácias na corrente sanguínea. Quanto maior a camada iônica em torno da célula, maior em módulo será o valor do ζ , dificultando assim a agregação intercelular. Alterações de cargas nos eritrócitos podem refletir lesões de membrana ocorridas durante o armazenamento. A presença de leucócitos lisados nas bolsas de concentrado de hemácias (CH) pode contribuir para a diminuição do ζ através da liberação de suas enzimas hidrolíticas que poderão atuar sobre a membrana eritrocitária, principalmente nas glicoforinas. A filtração do CH possibilita a remoção de mais de 99,99% dos leucócitos, evitando as consequências transfusionais ocasionadas pela lise celular durante o período de armazenamento do hemocomponente. A pinça óptica (PO) foi utilizada para quantificar o ζ de eritrócitos procedentes de CH e CHD (CH desleucocitado), coletados em CPD-SAGM, visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas ao armazenamento e o efeito da leucorredução sobre a preservação destas cargas. A PO é uma ferramenta capaz de capturar hemácias utilizando um laser infravermelho acoplado a um microscópio. O ζ é obtido através da velocidade terminal das células, após serem liberadas dessa armadilha óptica, sob diferentes voltagens. Foram analisadas pelo menos 30 células procedentes de 4 bolsas de CH e pelo menos 10 células de 1 bolsa de CHD, 24 horas após a coleta e no primeiro dia de cada semana durante o período de armazenamento (42 dias). A leucorredução foi realizada no período de pré-estocagem do hemocomponente utilizando bolsas plásticas quádruplas top and bottom com filtro in line (Fresenius Kabi). Os ζ das bolsas de CH, foram decrescentes a partir do 1º dia de armazenamento, apresentando valores médios de -14,5 mV, estabilizando-se no início da 2ª semana, com ζ de -10 mV até a 3ª semana, decaindo para valores mais baixos a partir da 4ª semana, estabelecendo-se assim em - 8 mV (45% menor que o valor inicial). As bolsas de CHD apresentaram o mesmo perfil de decaimento de cargas que as não desleucocitadas, mostrando que o processo de leucorredução não interfere nas propriedades elétricas da membrana dos eritrócitos durante a estocagem. Através da técnica de PO foi estabelecida uma metodologia, sensível e reprodutível, para quantificar o ζ em diferentes condições, a qual poderá contribuir na compreensão dos efeitos do armazenamento nas cargas de membrana das hemácias.

5.2 AVALIAÇÃO TEMPORAL DA ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS ARMAZENADAS EM CPD/SAG-M

C. N. Jovino¹, D. C. N. Silva², C. A. L. Silva³, S. C. A. Lucena³, D. S. Jardim², C. L. Cesar⁴, P. M. A. Farias², M. L. Barjas-castro⁵, A. Fontes², B. S. Santos¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE

³Fundação HEMOPE

⁴Instituto de Física, UNICAMP

⁵Hematology and Transfusion Center, UNICAMP

INTRODUÇÃO: O concentrado de hemácias é o hemocomponente mais utilizado na prática clínica. As hemácias quando estocadas sofrem progressiva deteriorização metabólica e celular. Assim, nos processos de fracionamento e armazenamento deste hemocomponente devem-se utilizar as chamadas soluções preservantes/aditivas, como o CPD/SAG-M, que retardam o aparecimento de lesões de estoque. Entre as lesões mais comuns destaca-se a diminuição da elasticidade ou perda da deformabilidade celular com perda também da morfologia bicôncava. As hemácias pouco deformáveis mostram-se fisiologicamente deficientes, com dificuldade de transpor capilares, sofrendo rapidamente hemocaterese. Uma ferramenta baseada na transferência de momentum de fótons de laser pode ser aplicada para aprisionar microestruturas biológicas. Este sistema funciona como uma armadilha óptica e possibilita manipulações celulares sem causar dano ao sistema orgânico. Assim, neste trabalho foi avaliada a evolução temporal da elasticidade de hemácias coletadas e estocadas em solução CPD/SAG-M utilizando pinças ópticas. **MATERIAL E MÉTODOS:** O sistema de pinça óptica utilizado consiste de um feixe de laser infravermelho focalizado no material de análise por uma objetiva de 100x de um microscópio. Os eritrócitos, provenientes de doadores saudáveis, foram coletados de concentrado de hemácias obtidos a partir de bolsa tripla (Fresenius Kabi). As medidas da elasticidade foram feitas semanalmente após a coleta, até o 35 dia de armazenamento (15 células foram analisadas em cada semana). As células aprisionadas na armadilha óptica são submetidas a velocidades progressivas e a máxima deformação é registrada. A elasticidade é obtida analisando-se a deformação da hemácia em função da velocidade. Quanto maior for valor obtido, menos elástica a hemácia. **RESULTADOS:** Após a primeira semana (sétimo dia) de armazenamento o valor médio de elasticidade obtido foi $4,1 \times 10^{-4}$ dina/cm, permanecendo este valor constante até o final da segunda semana (14 dia). Ao final da 3ª semana observou-se uma leve diminuição da elasticidade ($4,6 \times 10^{-4}$ dina/cm), acentuando-se ao término 4ª semana ($6,4 \times 10^{-4}$ dina/cm) e atingindo $9,6 \times 10^{-4}$ dina/cm na 5ª semana de armazenamento. Observa-se nesta última semana uma queda de 234% em relação à deformabilidade inicial. **CONCLUSÃO:** A técnica da pinça óptica é vantajosa por quantificar a elasticidade da célula como um todo, aproximando-se mais do real, se comparada com outras técnicas. Os valores obtidos comprovam a tendência da perda gradual de elasticidade e conseqüentemente da vitalidade pós-transfusional das hemácias.

ANEXO IV: PRÊMIOS



37º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas



SBAC
Sociedade Brasileira de
Análises Clínicas

Prêmio SBAC

Categoria "MELHOR TRABALHO DO 37º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS"

*"Uso de pinças ópticas para avaliação de potencial Zeta
de hemácias em EDTA, CPD-SAGM e estocadas."*

de autoria de

**Diego Cesar Nunes da Silva; H. P. Fernandes; C. N. Jovino; M.M. Filho; A. F. M. Filho; A. D. P. R. Oliveira;
P. M. A. Farias; B. S. Santos; C. L. Cesar; M. L. Barjas-Castro; A. Fontes.**


Dr. Elisses Tuma
Presidente da SBAC

Goiânia, 16 de maio de 2010


Dr. João Ciribelli Guimarães
Presidente da Comissão Julgadora



CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA

"DA SAÚDE DAS PESSOAS À SAÚDE DO PLANETA"



CONGRESSO DO
INSTITUTO
NACIONAL DE
BIOMEDICINA



2º EREBIOM
ENCONTRO REGIONAL DOS
ESTUDANTES DE BIOMEDICINA

CENTRO DE CONVENÇÕES DO HOTEL MACEIÓ ATLANTIC | 29 A 31 DE OUTUBRO DE 2009

INSTITUTO NACIONAL DE BIOMEDICINA - INB
DELEGACIA REGIONAL DE BIOMEDICINA DE ALAGOAS - DRBM/AL
CENTRO ACADÊMICO DR. ROBERTO FIGUEIREDO - CARF/FCBS

CERTIFICADO

Certificamos que: **SILVA, D.C.N.; FERNANDES, H.P.; OLIVEIRA, A.D.P.R.; FARIAS, P.M.A.; SANTOS, B.S.; CESAR, C.L.; BARJAS-CASTRO, M.L.; FONTES, A.**; participou expondo o trabalho científico: **AVALIAÇÃO DA CARGA ELÉTRICA DE HEMÁCIAS ATRAVÉS DE PINÇAS ÓPTICAS: APLICAÇÕES EM IMUNOHEMATOLOGIA**; no 6º CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA, 2º CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE BIOMEDICINA E 2º ENCONTRO REGIONAL DE ESTUDANTES DE BIOMEDICINA, realizado no Centro de Convenções do Hotel Maceió Atlantic no período de 29 a 31 de outubro de 2009.

COLOCAÇÃO: 3º LUGAR


Wanessa Silva Garcia Medina
Presidente do VI CALBM


Paulo José Cunha Miranda
Presidente do II CINB


Valdemir de Lima Freitas Junior
Presidente do II EREBIOM