



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

THIAGO DE MELO SANTIAGO

**ESTUDO DE PROPRIEDADES MECÂNICAS E MORFOLÓGICAS
DE HEMÁCIAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

FORTALEZA

2012

THIAGO DE MELO SANTIAGO

**ESTUDO DE PROPRIEDADES MECÂNICAS E MORFOLÓGICAS
DE HEMÁCIAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa

Co-Orientador: Dra. Luciana Magalhães Rebelo

FORTALEZA

2012

THIAGO DE MELO SANTIAGO

ESTUDO DE PROPRIEDADES MECÂNICAS E MORFOLÓGICAS
DE HEMÁCIAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física.

Aprovada em: 16/02/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebelo (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. André Luiz Herzog Cardoso
Universidade Estadual do Ceará

A minha esposa, Luciana Sena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, à maneira de Newton, humildemente me sinto como um menino brincando na praia, diante de um oceano do desconhecido.

A minha amada esposa, Luciana Sena, pela sua dedicação a minha pessoa e principalmente por sua compreensão; tão necessária para entender os percalços da vida experimental no meio acadêmico.

Aos meus queridos familiares que sempre acreditaram em mim e me ajudaram nos momentos difíceis. Agradeço, em especial, à Tia Lurdinha, Tia Mazé, ao meu sogro Alex Bezerra e à minha sogra Pompéia Sena, a João Luiz de Santiago Filho (Tio Luizinho) e sua linda família. Vocês foram essenciais!

Aos meus pais, pois não esqueço de onde vim.

Ao meu amigo M.Sc. Diego Rabelo que foi como um irmão para mim não só durante o mestrado, mas na vida extra-Pici. Sua ajuda foi fundamental na realização de cada etapa deste trabalho, desde a coleta das amostras até a escrita do texto. Seus ensinamentos foram imprescindíveis nessa empreitada.

Ao meu compadre e amigo de longa data, Pedro, pela atenção e pelo incentivo durante o mestrado.

Ao meu amigo prof. M.Sc. Jorge André pelas discussões sobre mecânica do contato e seus ensinamentos que acabaram permeando todo esse texto.

A minha co-orientadora, Dra. Luciana Magalhães Rebêlo, pelo meu reconhecimento profissional, pela concepção deste trabalho e pelos seus ensinamentos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa, pela confiança depositada em mim e pelos seus ensinamentos.

Ao prof. Dr. André Herzog, por ter aceito o convite para compor a banca e pelas suas sugestões que vieram a complementar e melhorar este trabalho.

Ao prof. Dr. Andrey Chaves, pela grande ajuda com o programa da análise de curvatura e pela atenção a mim dispensada em inúmeras conversas.

Ao chefe do laboratório, prof. Dr. Eduardo Bedê, pela atenção e por suas sugestões.

A profa. Dra. Lucidalva Pinheiro (Luci), por ter acreditado em mim e reconhecido meu trabalho. Seus ensinamentos foram de grande valia.

Ao chefe do Departamento de Física, prof. Dr. Josué Mendes Filho, por proporcionar grandes experiências profissionais para mim e meus colegas.

Ao futuro físico, Vinnie, por me fazer aprender ao ensinar e pelas lições de vida.

À futura bióloga, Angélica, que me ajudou no árduo trabalho experimental e pelos seus ensinamentos de Biologia.

Ao M.Sc. Vagner Bessa, pela companhia nas noites de listas de exercícios e pela ajuda com o abstract.

Aos profissionais do HEMOCE, Dra. Fanca, Dra. Vânia Barreto, Dra. Andréa Alcântara, à Rosane, Michele e Kátia.

Ao Doutores Adilson (lab. do prof. Válder) e Flávio (LACAM) pelos grandes favores concedidos.

Aos queridos colegas e amigos, Heitor Alves, Marcelo Montanha, Estefferson, Gadelha, Dilton, Joel, Roner, Ariel, Daniel Gomes, Leandro Jáder, Jorge Luís, Capuã, Phillipe, Manuela, Carol Fontenele, Priscilla, Francisco Leandro, Abraão, Wellery, Júlio César, Rodrigo, Jota J, Josias pela companhia nas disciplinas, no laboratório e pelos valorosos préstimos.

Aos funcionários do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Life... is a relationship between molecules.

Linus Pauling

RESUMO

Nesse trabalho, propomos o uso da Microscopia de Força Atômica para a investigação das propriedades mecânicas e morfológicas dos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, visando propor que parâmetros físicos tais como curvatura, rugosidade, elasticidade e viscosidade, possam ser utilizados na investigação laboratorial dessa doença. Em cada etapa experimental, foram medidas as propriedades mecânicas de cinco células por indivíduo. Nessa pesquisa analisamos o sangue de cinco pacientes em tratamento no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE) e, como controle, cinco doadores sadios voluntários. Os resultados indicam a diminuição da rugosidade da superfície citoplasmática da membrana eritrocitária dos doadores com a doença. A análise de elasticidade das hemácias dos pacientes com anemia indica que módulo de Young, em média, são cerca de três vezes maior do que o módulo encontrado nas hemácias de doadores sadios. A análise da histerese de curvas de forças sobre os eritrócitos revela que as hemácias contendo a hemoglobina anormal dissipam menos energia e, portanto, são mais viscosas que as hemácias advindas de doadores sadios.

Palavras-chave: Eritrócitos. Anemia Falciforme. Microscopia de Força Atômica. Biofísica.

ABSTRACT

In this work, we propose the use of atomic force microscopy to investigate the mechanical and morphological properties of erythrocytes from patients with sickle cell anemia, to propose that physical parameters such as curvature, roughness, elasticity and viscosity, can be used in laboratory research of that disease. In each experimental step, the mechanical properties of five cells per individual were measured. In this study we analyzed the blood of five patients at the Center for Hematology and Hemotherapy of Ceará (Hemoce) and, as a control, five healthy volunteer donors. We observed a decrease in surface roughness of the membrane cytoplasmic of the donors with the disease. The analysis of elasticity of the erythrocytes of patients with anemia indicates that the Young's modulus on average is about three times greater than the modulus found in red cells of healthy donors. Analysis of the hysteresis curves of forces over the erythrocytes shows that the erythrocytes containing the abnormal hemoglobin dissipate less energy and therefore are more viscous than the red blood cells resulting from healthy donors.

key words:

red blood cell. sickle cell anemia. atomic force microscopy. biophysics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura em dupla-hélice da molécula de DNA. Essa estrutura foi proposta por Crick e Watson em 1953. O retângulo em vermelho destaca a ligação exclusiva entre as bases timina e adenina, enquanto o retângulo azul destaca a ligação entre citosina e guanina. Extraído e adaptado de Murray et al. (2003). 22
- Figura 2 Padrão de difração de raios X em fibras constituídas por moléculas de DNA. A localização dos máximos (regiões claras) e dos mínimos (regiões escuras) de intensidade desses raios é utilizada para a determinação da posição de cada átomo ou centro dipensor da molécula. Assim, consegue-se determinar a estrutura da molécula. Extraído de Neidle (1999). 23
- Figura 3 Deformações elásticas de um sólido: (a) sob tração. (b) sob cisalhamento. . . 28
- Figura 4 Fluido escoando entre placas paralelas móveis. A intensidade do gradiente de velocidade na direção y é inversamente proporcional a viscosidade do fluido. 29
- Figura 5 Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de uma sonda de AFM contendo três cantilevers. Um retangular (mais abaixo) e dois triangulares ou em "v". As respectivas *tips* ou pontas situam-se nas regiões destacadas em vermelho. Imagem extraída e adaptada do site nanotechweb. 32
- Figura 6 Representação esquemática dos componentes básicos de um microscópio de força atômica. Um feixe de laser é direcionado para a superfície refletora de um cantilever e daí segue para um fotodiodo. À medida em que toca a superfície, o cantilever se deforma e o feixe de laser sofre deslocamentos sobre os quadrantes A, B, C e D do fotodiodo. O fotodiodo converte esses deslocamentos em sinais elétricos que serão utilizados para monitorar e controlar o

	posicionamento relativo sonda-amostra. Adaptado de Bhushan et al. (2007).	32
Figura 7	Representação do processo de indentação. (a) Diagrama do contato entre indentador com a superfície da amostra. (b) Curva de força por indentação. . .	35
Figura 8	Curva de força obtida sobre uma amostra rígida através de um microscópio de força atômica operando em ar. Adaptado de Bhushan et al. (2007).	36
Figura 9	Imagem tridimensional obtida por AFM de uma hemácia fixada.	39
Figura 10	Estrutura da hemoglobina. Suas quatro cadeias α_1 , β_1 , α_2 e β_2 se enovelam formando um tetrâmero. Cada íon de ferro (esferas vermelhas) fica localizado em uma das cadeias, aprisionado em uma estrutura chamada heme. O quarto íon não é mostrado pois está oculto na cadeia α_2 . Adaptado de Provan e Gribben (2010).	40
Figura 11	Alteração estrutural da hemoglobina na anemia falciforme. Uma simples troca de nucleotídeo (adenina por timina) na região do DNA que é responsável pela síntese da hemoglobina, ocasiona uma síntese da hemoglobina anormal S. Adaptado de Provan e Gribben (2010).	42
Figura 12	Imagem tridimensional de AFM em modo contato de uma célula com alteração morfológica devido à anemia falciforme. Imagem gentilmente cedida por Rebelo (2010).	43
Figura 13	A problemática da hemoglobina anormal. (a) Ilustração do processo de polimerização de HbS. (b) Mudança de <i>shape</i> . (c) Vaso-oclusão. Extraído e adaptado de Barabino et al. (2010).	45
Figura 14	Reconstrução idealizada de uma hemácia em equilíbrio estrutural. A superfície está aberta nas bordas. Extraído de Ikai (2008).	48

Figura 15	Diagrama esquemático do citoesqueleto da membrana eritrocitária. Uma rede complexa de proteínas está sob a bicamada lipídica da RBC. A proteína anquirina liga o citoesqueleto à membrana, formando uma ponte entre a espectrina e uma proteína intrínseca da membrana, a banda 3. A actina e a proteína 4.2 são também constituintes importantes do citoesqueleto. Adaptado de Bridges e Pearson (2008).	49
Figura 16	Citoesqueleto eritrocitário. Imagem AFM obtida em nosso laboratório com o microscópio operando em modo contato.	50
Figura 17	Disposição de rede de proteínas do citoesqueleto no estado (a) relaxado (b) tensionado	51
Figura 18	Representação gráfica de um fragmento membranário com exposição da face citoplasmática. Extraído e adaptado de Gompper e Schick (2008).	53
Figura 19	Representação gráfica do processo de confecção de <i>ghosts</i> . Extraído e adaptado de Bhushan e Fuchs (2006).	53
Figura 20	(a) Imagem AFM tridimensional de uma hemácia. A medida foi realizada em modo tapping em ar. (b) Seção transversal da célula mostrada em (a).	54
Figura 21	Imagem AFM tridimensional de uma hemácia fixada com metanol PA. A medida foi realizada em modo tapping em ar. A hemácia apresenta uma forma conhecida como célula em alvo e observam-se partículas aderidas à membrana. (b) Seção transversal da célula mostrada em (a)	55
Figura 22	Imagem AFM tridimensional de hemácias em meio líquido com solução PBS + EDTA (0,2 mM) com pH=7,4. A medida foi realizada em modo contato. As membranas das hemácias se apresentam fortemente aderidas ao substrato em virtude do grande tempo de adesão das células com o substrato.	56

Figura 23	(a) Curvatura de uma curva plana. (b) Curvaturas principais em uma esfera.	57
Figura 24	(a) Coleta de sangue por punção digital. (b) Preparação da suspensão e (c) lavagem das células. (d) Concentrado de hemácias centrifugadas.	60
Figura 25	Confecção dos fragmentos membranários. (a) Adesão das hemácias nas lamí-nulas de vidro modificadas. (b) Jato de solução tampão para romper a parte da membrana não aderida. (c) Imersão em solução de baixa salinidade. (d) Fixação dos fragmentos afim de preservar a sua estrutura.	61
Figura 26	Imagem de AFM ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) indicando a presença de vários fragmentos membranários (<i>ghosts</i>) de eritrócitos de um indivíduo (a) sadio e (b) falcê-mico.	63
Figura 27	Análise de seção transversal de uma imagem de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) indicando a medida da espessura da membrana próximo à extremidade do fragmento. O gráfico da seção transversal localizado na parte superior indica que a espessura se mantém no intervalo de 0-20 nm para a maioria dos pontos.	64
Figura 28	Imagem de AFM com área ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) sobre fragmento membranário de um indivíduo (a) sadio e (b) falcêmico.	65
Figura 29	Imagem de AFM de $4 \mu\text{m}^2$ onde a rugosidade é calculada. <i>Ghost</i> de um indi-víduo (a) sadio e (b) falcêmico.	65
Figura 30	Histograma de distribuição de rugosidade média R_a da face citoplasmática da membrana eritrocitária para os doadores (a) sadios (b) doentes.	66
Figura 31	Superfície artificial contendo um hemisfério com raio de 4000 nm.	68
Figura 32	Distribuição de curvatura Gaussiana para uma superfície artificial contendo um	

	hemisfério com raio de 4000 nm.	69
Figura 33	Campo de orientação de uma hemácia. Os segmentos em vermelho são vetores unitários normais à superfície eritrocitária.	69
Figura 34	Imagem tridimensional obtida por AFM de uma hemácia com <i>shape</i> em um formato semelhante ao de um toróide.	70
Figura 35	Distribuição de curvatura Gaussiana para a hemácia da fig. 34	70
Figura 36	Imagem de uma hemácia com <i>shape</i> achatado devido à caracterização em ar, sem fixação prévia.	71
Figura 37	Distribuição de curvatura Gaussiana para uma hemácia apresentando achatamento.	71
Figura 38	Imagem da mesma hemácia contida na fig. 34 após a redução do número de pixels.	72
Figura 39	Imagem de parte da hemácia achatada vista na fig. 36 após a redução do número de pixels.	72
Figura 40	Distribuição de K para a imagem da fig. 38.	73
Figura 41	Distribuição de K para a imagem da fig. 39.	73
Figura 42	Curva de força obtida via AFM em um substrato rígido. A curva acima resultou de uma indentação em meio líquido de uma lamínula de vidro. A curva de extensão e retração coincidem e não é observada adesão significativa já que a curva foi obtida em meio líquido.	77
Figura 43	Curvas de força obtidas via AFM. Comparação entre o ponto de contato da	

	curvas de calibração (em azul) e a curva sobre um corpo deformável (em vermelho).	78
Figura 44	Disposição das curvas de força após a detecção do ponto de contato.	78
Figura 45	Metodologia para fixação de microesferas de sílica a <i>tips</i> de AFM. (a) Deposição por gota da solução diluída de microesferas sobre uma lamínula de vidro. (b) Secagem das lamínulas ao ar. (c) Preparação do adesivo epóxi sobre a lamínula contendo as <i>beads</i> . (d) Raspagem do excesso de adesivo com um capilar de vidro.	82
Figura 46	Metodologia para a obtenção de curvas de força em meio líquido. (a) Preenchimento da célula líquida com solução tamponada. (b) e (c) Fixação da lamínula de vidro ao porta-amostra com adesivo epóxi. (d) Extração de alíquota de sangue total. (e) Diluição da alíquota. (f) Deposição de uma gota da suspensão de hemácias sobre o vidro. (g) Posicionamento no microscópio. (h) Visualização das células em suspensão na gota. (i) Posicionamento da célula líquida sobre a gota.	83
Figura 47	Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura das <i>beads</i> sobre a lamínula de vidro. Panorâmica com magnificação de 1000X.	85
Figura 48	Micrografia com magnificação de 6000X de um aglomerado de <i>beads</i> . Aglomerados como esse impedem que uma única micro-esfera seja aderida à <i>tip</i>	86
Figura 49	Micrografia com magnificação de 3000X de um cantilever de nitreto de silício.	87
Figura 50	Micrografia com magnificação de 10000X da <i>tip</i> modificada. Na superfície da micro-esfera observa-se um pequeno achatamento, possivelmente ocasionado pela concentração de cargas elétricas provenientes do feixe eletrônico do microscópio.	88

Figura 51	Histograma de distribuição do módulo de Young E para as hemácias de doadores (a) sadios (b) doentes.	89
Figura 52	Curvas de força obtidas em diferentes frequências sobre a hemácia de um doador sadio. Observa-se o aumento da histerese com a frequência.	91
Figura 53	Distribuição da dissipação de energia durante o processo de indentação das hemácias de doadores: (a) sadios (b) doentes.	93
Figura 54	Histograma de distribuição da viscosidade aparente η de hemácias contendo hemoglobina (a) normal (b) anormal.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Hemoglobinas observadas durante o desenvolvimento ontogenético humano .	41
Tabela 2	Rugosidade dos <i>ghost</i> eritrocitários de doadores sadios	64
Tabela 3	Rugosidade dos <i>ghost</i> eritrocitários de pacientes com anemia falciforme ...	65
Tabela 4	Medida dos diâmetros das <i>beads</i>	86
Tabela 5	Módulo de Young das hemácias de doadores sadios	88
Tabela 6	Módulo de Young das hemácias de pacientes com anemia falciforme	88
Tabela 7	Área da histerese nas curvas de força em hemácias de doadores sadios	91
Tabela 8	Área da histerese nas curvas de força em hemácias de pacientes com anemia falciforme	92
Tabela 9	Viscosidade aparente de hemácias em indivíduos sadios	92
Tabela 10	Viscosidade aparente de hemácias em indivíduos com anemia falciforme ...	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 19
1.1 A Física e a Biologia: um breve comentário.....	p. 19
1.2 Propriedades Mecânicas de Células e Patologias.....	p. 25
1.3 Elasticidade, viscosidade e <i>shape</i>	p. 27
1.4 A Microscopia de Força Atômica e sua aplicação à investigação de propriedades mecânicas de células.....	p. 31
1.5 Hemácias, Hemoglobinas e Anemia Falciforme.....	p. 39
1.6 Hematologia Física: estudo via AFM das propriedades mecânicas de hemácias em anemia falciforme.....	p. 46
2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ERITRÓCITOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME	p. 48
2.1 A estrutura dos eritrócitos.....	p. 48
2.2 A rugosidade da membrana eritrocitária.....	p. 51
2.3 A importância do <i>shape</i> na funcionalidade dos eritrócitos e as dificuldades experimentais.....	p. 54
2.4 Conceitos de geometria diferencial.....	p. 56
2.5 Materiais e Métodos.....	p. 59
2.5.1 Análise de rugosidade da face citoplasmática da membrana eritrocitária.....	p. 59
2.5.2 Análise de curvatura dos eritrócitos.....	p. 61
2.6 Resultados e discussões.....	p. 62
2.6.1 Análise da rugosidade da face citoplasmática da membrana eritrocitária.....	p. 62
2.6.2 Análise de curvatura dos eritrócitos.....	p. 67

2.7	Conclusões	p. 74
3	ESTUDOS DE VISCOELASTICIDADE DE ERITRÓCITOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME	p. 75
3.1	Curvas de Força vs Indentação e algumas considerações sobre o modelo de Hertz .	p. 75
3.2	Obtenção de parâmetros viscosos a partir de curvas de força vs indentação obtidas por AFM	p. 79
3.3	Modificação da geometria de <i>tips</i> de AFM	p. 81
3.4	Materiais e Métodos	p. 81
3.4.1	Caracterização e Fixação de <i>beads</i>	p. 81
3.4.2	Obtenção de curvas de força	p. 82
3.5	Resultados e discussões	p. 85
3.5.1	Caracterização e Fixação de <i>beads</i>	p. 85
3.5.2	Análise da elasticidade aparente dos eritrócitos	p. 87
3.5.3	Análise da viscosidade aparente dos eritrócitos	p. 90
3.6	Conclusões	p. 95
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	p. 96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 99
	APÊNDICE A	p. 106
	APÊNDICE B	p. 107
	APÊNDICE C	p. 110
	APÊNDICE D	p. 111
	APÊNDICE E	p. 114

1 INTRODUÇÃO

Nesse capítulo traçamos um caminho para o estudo de propriedades mecânicas de células e apresentamos o escopo de nosso trabalho. Partindo de um breve histórico da Biofísica e definindo seu objeto de estudo, conduzimos o leitor por uma revisão de vários trabalhos científicos que estudam a biomecânica celular. Definiremos as grandezas que caracterizam tais propriedades e explicaremos como elas são obtidas a partir da técnica de Microscopia de Força Atômica. Dedicamos uma atenção especial aos trabalhos que estudam as propriedades mecânicas de hemácias, nosso objeto de estudo.

1.1 A Física e a Biologia: um breve comentário

Os esforços em aplicar conhecimentos da área que hoje conhecemos como Física em outras áreas da Ciência não são tão recentes como poderíamos ser levados a pensar. Apesar da primeira divisão moderna da Ciência em disciplinas tais como a Física e a Biologia datar do século XIX ¹, ao se analisar alguns trabalhos de filósofos naturais ou de cientistas (na acepção moderna) de séculos anteriores, conclui-se que certos fenômenos associados aos seres vivos eram investigados segundo uma abordagem que atualmente receberia o título de interdisciplinar. Durante a Renascença, por exemplo, podemos observar uma certa tendência na descrição mecanicista dos seres vivos. Leonardo da Vinci (1452-1519) investigou o princípio mecânico do voo dos pássaros para aplicá-lo à engenharia enquanto, no século XVII, Alfonso Borelli (1698-1679) fez uma descrição biomecânica da mobilidade dos membros em movimentos natatórios e de voo dos pássaros (Glaser, 2001, p. 1).

Na Idade Moderna registra-se o interesse pela eletricidade nos organismos. Durante o século XVIII, Luigi Galvani (1737-1798) realizou experimentos com pernas de rãs que se contraíam ao serem submetidas a descargas elétricas. Segundo Bogdanov (2000, p. 2), Galvani foi pioneiro em descobrir os efeitos de um campo elétrico em um organismo vivo e a propor a

¹Uma das primeiras tentativas de sistematização da Ciência na Idade Moderna é atribuída ao filósofo francês Auguste Comte em sua obra *Cours de philosophie positive*. O leitor pode consultar a tradução desta obra em Comte (1978).

condução elétrica nos nervos como causa das contrações musculares. Alessandro Volta (1745-1827), repetindo os experimentos de Galvani, seu contemporâneo, obteve os mesmos resultados, mas discordava que a eletricidade fosse produzida pelo próprio organismo. Tentando refutar essa idéia, Volta acabou chegando na invenção da pilha eletrolítica. Mas pouco depois, Galvani provou de forma mais contundente que um músculo, no momento da contração, funcionava como uma fonte de corrente elétrica (Bodagnov, 2000, p. 3).

Em seu livro, Glaser (2001) destaca mais estudos interdisciplinares. O fragmento abaixo foi retirado de seu livro *Biophysics* e traduzido afim de ilustrar alguns exemplos da conexão existente entre as leis físicas e os fenômenos observados nos seres vivos.

É bem estabelecido o fato de que observações médicas realizadas por J. R. Mayer (1814-1878) exerceram um papel na descoberta da primeira lei da termodinâmica. Estudos calorimétricos da produção de calor em mamíferos foram conduzidos em Paris por A. L. Lavoisier (1743-1794) e P. S. Laplace (1749-1827) por volta de 1780. Também deve ser citado, neste contexto, as investigações de Thomas Young (1773- 1829) e Hermann v. Helmholtz (1821-1894) sobre os aspectos ópticos do olho humano e sobre a audição (GLASER, 2001, p. 2).

Estes exemplos levam-nos a crer que a compreensão física dos seres vivos é uma iniciativa tão antiga quanto os outros ramos da Física.

De acordo com Cotterill (2002, p. 1), à aplicação da Física em Biologia dá-se o nome de Biofísica e seu objetivo é promover um maior entendimento dos sistemas biológicos. Glaser (2001, p. 1) complementa essa definição afirmando que a Biofísica é uma ciência interdisciplinar situada entre a Física e a Biologia e que também está conectada com a Matemática, Físico-Química e a Bioquímica.

Goldfarb (2011, p. 1) torna mais claro o grau de entendimento mencionado por Coterril no parágrafo anterior. Ele explica que, como a Física é o estudo da matéria e da energia, a Biofísica tenta entender como as leis que regem a matéria e a energia se manifestam nos sistemas vivos e, em seguida, completa: "a Biofísica usa os princípios, as teorias e os métodos da Física para entender a Biologia".

Todavia, a fusão de conhecimentos decorrentes de duas ou mais ciências não basta para se chegar a uma nova ciência; é preciso um objeto de estudo, uma preocupação. Segundo Glaser (2001, p. 1), o objeto de estudo da Biofísica são os princípios físicos adjacentes a todos os processos em sistemas vivos; o que inclui a explicação da influência de vários fatores físicos nas funções fisiológicas desses sistemas.

De acordo com Glaser (2001, p. 1), o termo Biofísica foi usado pela primeira em 1892 por Karl Pearson em seu livro "*The Grammar of Science*" e, embora encontremos na história da Ciência vários estudos físicos de sistemas biológicos, a Biofísica como uma disciplina isolada é relativamente nova, datando de 60 a 100 anos atrás (Goldfarb, 2011, p. 4).

Segundo Cotterill (2002, p. 1), a Biofísica tende a ser desenvolvida por cientistas com formação em Física, porém os biólogos vem adquirindo conhecimentos de Física afim de solucionarem problemas específicos em sua área de atuação. Autores como Patabhi e Gauthan (2002, p. 1) afirmam que a Biologia está deixando de ser uma ciência descritiva e se tornando mais exata. Tais autores sustentam essa afirmação indicando a aplicação da Física à Fisiologia² e o advento de sub-áreas como a Biologia Molecular e a Biofísica Molecular.

A partir do século XX, com a elucidação da estrutura atômica e o desenvolvimento da Física quântica, o ambiente para o crescimento da Biofísica se tornou mais favorável. A grande aplicação de métodos da Física "moderna" às investigações do campo da Biologia possibilitou estudar os fenômenos biológicos em nível molecular. Importantes trabalhos de físicos, bioquímicos, fisiologistas, biofísicos e cristalógrafos ajudaram a esclarecer o nosso entendimento acerca da estrutura de várias moléculas de grande importância biológica como o ácido desoxirribonucleico (DNA), por exemplo (Davydov, 1982, p. 1).

O DNA é a molécula da vida. Ela é responsável pela transmissão dos caracteres hereditários e pela manutenção da vida de todos os tipos de seres vivos (Sadava et al, 2006, p. 57). A molécula de DNA é constituída de quatro bases nitrogenadas principais, sendo duas purínicas, *adenina* (A) e *guanina* (G) e duas bases pirimidínicas, a *citosina* (C) e a *timina* (T). Em meados do século XX, apesar de já serem reconhecidas a natureza química do DNA, sua função na transmissão das informações genéticas e suas mutações, a estrutura da molécula desse ácido nucleico ainda não havia sido elucidada até então.

Pesquisando sobre mutações genéticas induzidas por radiação eletromagnética, o físico Max Delbruck, trabalhando em colaboração com biólogos, estudou o efeito das radiações de ondas curtas no material genético das células. Utilizando as palavras de Brody e Brody (2001, p. 354), Delbruck e seus colegas "demonstraram que a Física do próprio átomo determina os processos biológicos mais básicos".

Influenciado pelo trabalho de Delbruck em 1944, o físico austríaco, Erwin Schrödinger (1887-1961), expôs em seu livro, *What is Life?*, uma explicação da mecânica quântica para a estabilidade das moléculas na estrutura genética das células. Nesse período, o livro de

²Parte da Biologia que investiga as funções orgânicas, processos ou atividades vitais, como o crescimento, a nutrição, a respiração e etc.

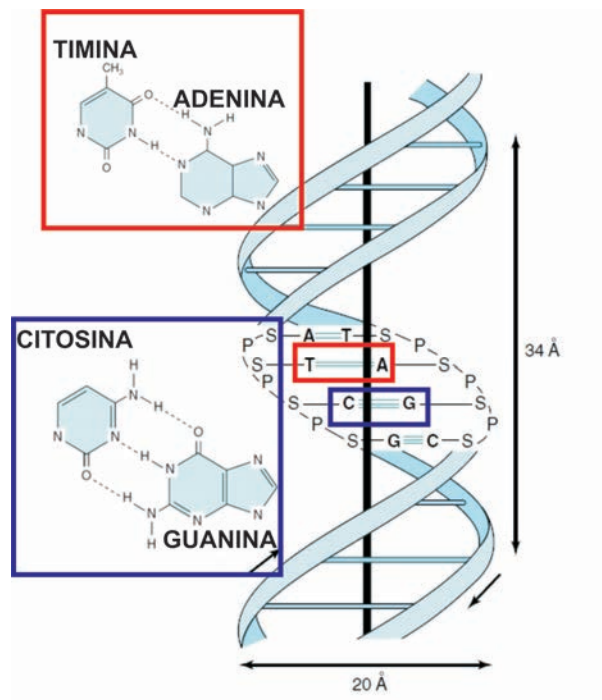


Figura 1: Estrutura em dupla-hélice da molécula de DNA. Essa estrutura foi proposta por Crick e Watson em 1953. O retângulo em vermelho destaca a ligação exclusiva entre as bases timina e adenina, enquanto o retângulo azul destaca a ligação entre citosina e guanina. Extraído e adaptado de Murray et al. (2003).

Schrodinger teve grande impacto sobre vários outros físicos que trabalhavam com Biologia, os quais posteriormente reconheceram a relação entre os cálculos de Schrödinger e a estrutura da molécula de DNA (Brody e Brody, 2001, p. 354).

A descoberta da estrutura da dupla hélice do DNA (fig. 1) só foi possível através da utilização de técnicas e conhecimentos advindos da Física e deve-se a um grupo de vários pesquisadores, entre eles, Rosalind E. Franklin (1920-1958), Raymond Gosling (1926-) (Watson e Crick, 1953). Tal descoberta fez com que, em 1962, eles fossem agraciados com o Nobel em Fisiologia/Medicina. Dentre os agraciados, destacam-se o físico Francis Harry Compton Crick (1916-) e o biólogo molecular James D. Watson (1928-) que se dispuseram a analisar os padrões de difração de raios X das fibras de DNA semelhantes aquele encontrado na figura 2 .

Ainda sobre investigação de Crick e Watson, Brody e Brody (2001, p. 362 e 363) destacam o papel que a Física, mais especificamente, a Mecânica Quântica, exerceu na orientação desses dois cientistas para que chegassem a uma correta concepção da estrutura do DNA:



Figura 2: Padrão de difração de raios X em fibras constituídas por moléculas de DNA. A localização dos máximos (regiões claras) e dos mínimos (regiões escuras) de intensidade desses raios é utilizada para a determinação da posição de cada átomo ou centro dipersor da molécula. Assim, consegue-se determinar a estrutura da molécula. Extraído de Neidle (1999).

O cristalógrafo americano Ferry Donahue convenceu a Crick e a Watson sobre um argumento da mecânica quântica acerca da ligação do hidrogênio e do emparelhamento da adenina somente com a timina e da guanina apenas com a citosina; isso os colocou na direção teórica certa. Em fins de fevereiro de 1953, no dia seguinte ao da conversa com Donahue, Watson subitamente percebeu que "um par adenina-timina mantido junto por duas ligações de hidrogênio apresentava forma idêntica a de um par guanina-citosina". Essa ligação e esse emparelhamento resolveram o último problema que eles enfrentavam, pois explicavam por que os dois tipos de pares de bases eram idênticos na forma, de modo que a estrutura da dupla hélice seria composta de ângulos e rotações uniformes.

É interessante frizar que uma descoberta (a dupla-hélice do DNA) realizada por uma equipe interdisciplinar envolvendo físicos, biólogos e químicos favoreceu para que o código genético fosse totalmente elucidado e que, com isso, muitas doenças genéticas pudessem ter suas origens conhecidas.

A difração de raios X também foi aplicada ao estudo da estrutura de proteínas como a hemoglobina, por exemplo. Max Perutz (1914-2002) e seus colaboradores utilizaram essa técnica para determinarem a estrutura da hemoglobina humana, proteína que está associada ao transporte de oxigênio e gás carbônico no sangue (Perutz, 1964). Conforme veremos adiante, uma síndrome hematológica está associada a um defeito estrutural da hemoglobina e o primeiro

a fazer essa associação foi Linus Pauling (1901-1994) e seus colaboradores (Pauling et al., 1949).

Introduzir nesta seção alguns fatos sobre a descoberta da estrutura do DNA e da hemoglobina seria uma digressão se não fossem eles frutos da pesquisa interdisciplinar, envolvendo a Física, a Biologia e a Química.

Semelhantes à matéria inanimada, os organismos vivos são constituídos de átomos e moléculas. Portanto, só é possível explicar os mecanismos dos processos biológicos, em nível molecular, através de uma teoria que forneça uma descrição satisfatória para essas estruturas, a Mecânica Quântica.

Autores como Davydov (1982, p. 1), assumem postura semelhante no que diz respeito à suposta diferença entre a matéria inanimada e a viva. Para esse autor, é um erro afirmar que há uma diferença fundamental entre esses dois tipos de matéria senão, a complexidade e a variedade de propriedades específicas que aquela última possui. Davydov acredita que não restam dúvidas de que a vida é uma manifestação especial de processos físicos e químicos ocorrendo em sistemas moleculares complexos que interagem com outros sistemas através do intercâmbio de energia e matéria.

A complexidade dos sistemas "vivos" pode se manifestar em muitos aspectos, a começar pelo grande número de átomos envolvidos. Quando se pretende descrever sistemas com esse tipo de característica, as leis da Mecânica Clássica podem ser aplicadas sem prejuízo (Anjos e Vieira, 2008, p. 149). Alguns autores afirmam que a Mecânica Quântica rege os fenômenos do mundo "microscópico", enquanto a Mecânica Clássica descreve corretamente os fenômenos macroscópicos de baixas energias (Nussenzveig, 1998, p. 245). O termo microscópico aí empregado, no entanto, refere-se a sistemas com dimensões abaixo da real escala microscópica (10^{-6}m).

No âmbito das células, sistemas microscópicos de fato, muitas propriedades físicas podem ser obtidas através de modelos clássicos, onde conceitos como o de força, por exemplo, nos parece bem mais definido. Esse foi o legado de Isaac Newton e outros.

Embora a estrutura e as propriedades físico-químicas de células devam ser fundamentalmente descritas pelas leis da Química e da Física, existem diferenças importantes entre a matéria inanimada e a matéria viva que fazem com que essas leis sejam aplicadas diferentemente para esses materiais. Safran et al. (2005) justifica essa diferença afirmando que mesmo que o objeto de estudo se concentre somente na estrutura física e na dinâmica dos componentes celulares, não considerando, portanto, problemas mais complexos de genética e desenvolvimento, é

necessário considerar a função da célula ao se descrever a sua estrutura.

1.2 Propriedades Mecânicas de Células e Patologias

Nas últimas décadas do século passado e do atual, muitas evidências bioquímicas e biofísicas vem sendo acumuladas produzindo uma complexa e detalhada representação sobre a composição da membrana, a microestrutura e a deformabilidade de células. Apesar do grau de detalhamento, tal representação ainda possui alguns elementos conflitantes e muitos trabalhos estão consolidando uma ponte entre o que se sabe sobre a bioquímica da membrana e o conhecimento de propriedades físicas *in situ* (Mohandas e Evans, 1994). Dentre as propriedades físicas utilizadas no estudo de células, destacam-se as propriedades mecânicas.

As propriedades mecânicas de células vivas são de grande importância para um bom funcionamento fisiológico dos organismos, porém o conhecimento a cerca das mesmas ainda é considerado limitado. Bhushan e Fuchs (2006, p. 19) justificam tal limitação afirmando que não há um total entendimento sobre o processo de resposta estrutural da célula à tensões externas, bem como do papel que a micromecânica exerce em várias condições fisiológicas e patológicas e sobre como a elasticidade de um certo tipo de células se altera em processos patológicos.

Discher et al. (2009) relatam que quando um paciente procura um consultório médico geralmente é por causa de um "defeito mecânico" em um tecido ou órgão; seja por um caroço ou um inchaço, seja por uma dor acompanhada de uma rigidez muscular. Baseado nisso, esses autores afirmam que para entender os aspectos relacionados com o estado normal ou patológico dos sistemas vivos deve-se, primeiramente, explicar como as forças físicas e as estruturas mecânicas contribuem para ativar as propriedades materiais de células e tecidos.

Segundo Discher et al. (2009), inicialmente se reconhecia somente a importância que as forças físicas exerciam na fisiologia de sistemas, como o respiratório, circulatório e de locomoção, mas nos últimos anos vem se reconhecendo o papel destas forças em fenômenos que ocorrem em escalas menores, como nas células e em macromoléculas. Este é o campo da biomecânica. Nesse área de estudo, analisa-se o efeito de forças que podem ser de origem externa à estrutura celular onde atuam ou resultantes da ação de vários dos seus componentes estruturais (Durán, 2003, p. 40).

Apesar da biomecânica constituir um campo de pesquisa relativamente novo dentro da Biofísica, Pelling e Horton (2007) afirmam que muitos conceitos atuais desse campo investigativo estão relacionados com observações realizadas há cerca de 300 anos. No início do século XVIII, por exemplo, Antony van Leeuwenhoek, ao observar o interior de uma célula, perce-

beu que pequenos corpúsculos ali se movimentavam aleatoriamente. Hoje sabemos que tais corpúsculos são organelas e outras partículas que podem executar movimento Browniano³ no citoplasma. Esse fato demonstra que muitos fenômenos previamente observados aguardariam por explicações à luz da ciência moderna. Além dos conhecimentos modernos, devemos ressaltar o papel das técnicas modernas.

Para Pelling e Horton (2007), no início das investigações de propriedades mecânicas celulares, além de uma teoria do contato, era necessário a utilização de técnicas que pudessem explorar o contato de estruturas microscópicas. Algumas dessas técnicas começaram a ser desenvolvidas e aplicadas a esse tipo de estudo ainda no século XX, como é o caso da técnica de aspiração por micropipeta (Evans e Rawicz, 1990).

Nos últimos anos, a mecânica celular tem sido estudada por várias técnicas. Dentre elas, encontra-se o procedimento de *cell poker*, onde se estuda a deformabilidade celular baseada na sua resistência à indentação com uma fibra de vidro de extremidade achatada (Peterson et al., 1982; Zahalak et al., 1990 apud Hassan et al., 1998). Outras técnicas incluem: a aspiração por micropipeta, como observado nos trabalhos de Young and Evans, 1989; Shao e Hochmuth, 1996, a espectroscopia *flicker* (Zilcker et al., 1987; Zeman et al., 1990), a microscopia de varredura acústica (Luers et al., 1991; Bereiter-hahn et al., 1995), pinças óticas (Ashkin e Dziedzic, 1989; Svoboda et al., 1992; Brandão et al., 2003), microscopia de desfocalização (Agero et al., 2003; Neto et al., 2006) e a microscopia de força atômica (Radmacher et al., 1996; Mahaffy et al., 2004).

Dentre essas técnicas, aquelas que necessitam do contato físico para sondar a mecânica celular o fazem através de dois tipos de abordagem. Na primeira delas, a *single cell*, estuda-se a mecânica considerando a célula como um todo. Na segunda abordagem, a mecânica dos componentes estruturais da célula é analisada de forma individual (Kuznetsova et al., 2007).

Na literatura encontram-se numerosos trabalhos que exploram essas técnicas para correlacionar as alterações das propriedades mecânicas celulares com certas doenças. Isso pode ser observado no trabalhos de Mohandas e Evans (1994) e Ketene et al. (2011). Mohandas e Evans estudam o impacto estrutural de doenças genéticas nas células vermelhas do sangue, enquanto Ketene et al. investigam o efeito do câncer na estrutura de células ovarianas. Ambos autores, observam alterações nas propriedades mecânicas dessas células.

Trabalhos como o de Lim et al. (2008) e Rebelo et al. (2011) investigam a relação entre a malignidade de certos tipos de câncer com a capacidade de deformação das células can-

³Movimento aleatório de partículas macroscópicas num fluido como consequência dos choques das moléculas do fluido com essas partículas.

cerígenas. Rebelo e seus colaboradores analisaram diferentes tipos de câncer que afetam as células epiteliais renais, concluindo que as células do tipo de câncer que apresenta maior agressividade, ou seja, maior potencial metastático, são mais "deformáveis". Além disso, as células cancerígenas, em geral, se mostraram mais deformáveis que as células não-tumorigênicas.

Até aqui, não discutimos o assunto de forma quantitativa, uma vez que as propriedades mecânicas utilizadas pelos autores mencionados não foram definidas. Nos restringimos ao termo "grau de deformabilidade", para qualificar a diferença existente entre as células em circunstâncias normais e aquelas em casos patológicos. Tais propriedades serão definidas na próxima seção e, a partir delas, quantificaremos a deformabilidade celular.

1.3 Elasticidade, viscosidade e *shape*

No estudo de propriedades mecânicas de materiais em geral, destacamos três grandezas: o módulo de elasticidade ou de Young (E), o módulo de cisalhamento (G) e a viscosidade (η). Quando um sólido está submetido a tensões (força por unidade de área), ele pode estar sendo comprimido, tracionado e/ou cisalhado, dependendo da direção e do sentido que tensão resultante se apresenta. Em cada um desses fenômenos, o corpo apresenta uma certa resistência para se deformar.

O módulo de Young (E) é a grandeza física que caracteriza a elasticidade de um material e a resistência que o mesmo oferece em se deformar sob ação de tensões normais ao plano de aplicação. Essa grandeza é definida pela eq. 1.1:

$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L} \quad (1.1)$$

onde F é o módulo da força aplicada sobre uma área A e $\Delta L/L$ é a deformação relativa do material (Resnick et al., 1996, p. 284). Observamos então que, nesse caso, a tensão é linear com a deformação.

O módulo de cisalhamento (G) é a resistência à deformação imposta por uma tensão que se aplica tangencialmente à superfície do sólido, obedecendo a uma equação similar a eq. 1.1 dada por:

$$\frac{F}{A} = G \frac{\Delta L}{L} \quad (1.2)$$

Podemos perceber que esses dois módulos, exceto pelas unidades ($N.m^{-2}$), são análogos à

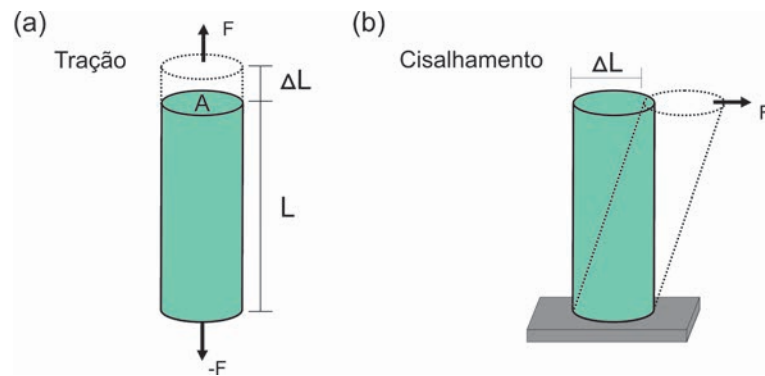


Figura 3: Deformações elásticas de um sólido: (a) sob tração. (b) sob cisalhamento.

constante elástica ou de mola (k) encontrada na lei de Hooke unidimensional (em módulo):

$$F = k\Delta x \quad (1.3)$$

Da mesma forma, a constante de mola é uma resistência a deformação, ou seja, para uma dada deformação Δx ou $\Delta L/L$, quanto maior o valor de k , E ou G , maior será a força F ou a tensão que deverá ser aplicada ao sólido.

Ambas equações se aplicam ao regime elástico dos sólidos, ou seja, aquele em que as deformações cessam na ausência de tensões ou forças. O leitor deve ser advertido que as equações acima têm natureza vetorial, mas como indicamos sempre a direção em que a força estava sendo aplicada, achamos conveniente omitir a notação vetorial. Na figura 3, ilustramos as deformações elásticas discutidas acima.

No caso dos líquidos, a propriedade mecânica cabível é a viscosidade (η) que pode ser analisada pela equação de Newton (eq. 1.4). Analisando a eq. 1.4, percebemos que a viscosidade é um fator de proporcionalidade e que, novamente, pode ser pensada como uma espécie de resistência; nesse caso ao escoamento.

$$\tau_{yx} = \eta \frac{dv_x}{dy} \quad (1.4)$$

A figura 4 nos dá uma idéia de como a eq. 1.4 pode ser aplicada. Considere um fluido aprisionado entre as placas paralelas de área A . Quando as placas se movem relativamente sob ação de um força F ou tensão τ_{yx} , por exemplo, parte do movimento é compartilhado com o fluido. Se imaginarmos o fluido constituído de várias camadas horizontais, uma sobre a outra, veremos que para o fluido escoar, tais camadas deverão apresentar um movimento relativo entre si.

As camadas mais próximas da placa superior, ou seja, próximas ao ponto de aplica-

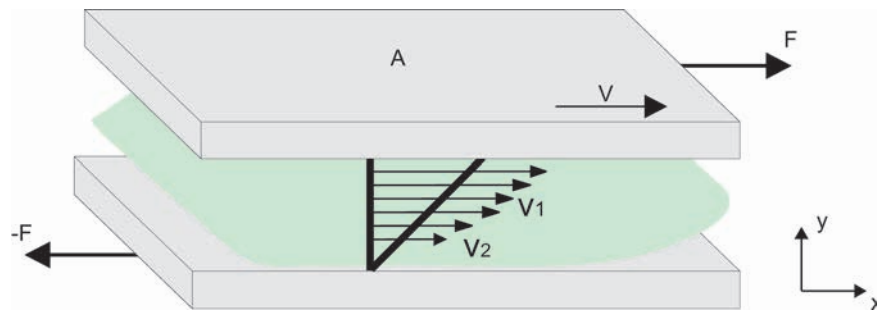


Figura 4: Fluido escoando entre placas paralelas móveis. A intensidade do gradiente de velocidade na direção y é inversamente proporcional a viscosidade do fluido.

ção da força, movem-se com velocidade maior do que as camadas inferiores o fazem. Esse comportamento é ditado pela viscosidade. Quanto menos viscoso o fluido for, as suas camadas terão mais facilidade para se moverem relativamente e dissiparem a energia cinética fornecida. Assim, por conta dessa dissipação, a velocidade na camada superior (v_1) não será totalmente comunicada à camada mais inferior que passa a se mover com velocidade menor v_2 , ocasionando um gradiente de velocidade no interior do fluido (Barnes et al., 1993, p. 2).

Na figura 4, o movimento das camadas se dá na direção do eixo x , enquanto o gradiente de velocidade está orientado na direção perpendicular y . Concluímos que para uma mesma tensão τ_{yx} , quanto maior a viscosidade, menor será o gradiente de velocidade no fluido. Assim, quando a viscosidade aumenta, a resistência para as camadas se movimentarem também aumenta e o movimento das placas é bem mais comunicado a todas as partes do fluido, havendo, portanto, menor dissipação de energia (Makosko, 1994).

As células nem são totalmente sólidas, nem totalmente líquidas, apresentando portanto as duas características. Materiais em geral que apresentam o mesmo comportamento que as células, são chamados de viscoelásticos.

Apesar de se observar um grande variedade de células com diversos formatos e funções, os elementos estruturais básicos da grande maioria são os mesmos: fluidos preenchendo seus interiores, enquanto uma rede de filamentos protéicos mantém o formato das mesmas (Boal, 2002, p. 1). Obviamente, são estes constituintes que conferem o comportamento viscoelástico das células.

Na descrição de propriedades mecânicas de células, além das grandezas já mencionadas, utiliza-se o *shape*. O *shape*⁴ nada mais é do que o formato ou a conformação geral da célula. Ele pode ser associado com um parâmetro ou grandeza física que, por sua vez, descreve

⁴Durante todo o texto adotaremos o uso deste termo em inglês com o intuito de manter a uniformidade com nomenclatura técnica internacional, embora o leitor possa traduzir para o português sem perda de generalidade.

uma propriedade mecânica celular. Segundo Kamm e Mofrad (2006), a capacidade de uma célula para realizar sua função depende do seu *shape* e ele é mantido através de sua rigidez estrutural e de sua atividade metabólica.

A curvatura gaussiana (K) é um objeto matemático que caracteriza superfícies em geral. Tal objeto é estudado pela Geometria Diferencial de superfícies e mede o quanto uma superfície S se afasta de um plano tangente à S , passando por um ponto P , pertencente a S (do Carmo, 2008, p. 172). A curvatura gaussiana é uma função de ponto, ou seja, para cada ponto de uma superfície existe um valor para K .

A distribuição de curvatura gaussiana pode trazer uma informação global da superfície, ou seja, o quão curva ou plana é a superfície estudada. Uma esfera de raio R , por exemplo, tem curvatura gaussiana constante e igual $1/R^2$. Assim, a distribuição de curvatura gaussiana de todos os pontos sobre a esfera é dada por um pico no valor $K = 1/R^2$. Para um plano, obviamente, a curvatura gaussiana é constante e igual a zero.

A relação entre a curvatura K e as propriedades mecânicas de uma célula pode ser estabelecida pela energia de curvatura. Modelos como o de Peterson (1992), calculam a energia de curvatura para hemácias e conseguem prever suas mudanças de *shape* para formas observadas em muitos casos patológicos.

Da mesma forma, Gompper e Schick (2008, p. 110) estabelecem um funcional ($F_{pm}[S]$) para a energia livre que descreve a tendência da membrana plasmática em se curvar:

$$F_{pm}[S] = F_{sc}[S] + F_g[S] + F_{ad}[S] \quad (1.5)$$

onde os termos à direita são, respectivamente, funcionais que se referem a curvatura espontânea, a curvatura gaussiana e da diferença de área de uma superfície S . Destaca-se o funcional da curvatura gaussiana:

$$F_g[S] = \kappa_g \oint_S dA K(\vec{r}) \quad (1.6)$$

Esses fatos demonstram que a distribuição de curvatura é um dado adicional no estudo de propriedades mecânica de células. Nosso trabalho não discute os modelos que levam em consideração essa curvatura, pois isso exige um grande detalhamento matemático que foge ao escopo deste texto. Assim, não obteremos a energia de curvatura como propriedade mecânica. Faremos uma sugestão para a determinação da distribuição de curvatura gaussiana a partir das imagens de Microscopia de Força Atômica.

1.4 A Microscopia de Força Atômica e sua aplicação à investigação de propriedades mecânicas de células

Nos últimos 25 anos, com o advento da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), foi possível estudar as propriedades mecânicas em níveis macro e microscópicos da estrutura celular, bem como a distribuição espacial dessas propriedades em uma única célula (Hansma, 2001 apud Kuznetsova et al., 2007).

A técnica de AFM é um método relativamente novo para a obtenção de imagens de vários tipos de superfície, incluindo aquelas encontradas em células vivas e fixadas⁵ (Bischoff e Hein apud Kuznetsova et al., 2007). Essa técnica faz parte de um grupo de técnicas de microscopia, denominado *Scanning Probe Microscopy* (SPM), pelas quais a produção de imagens e outros tipos de propriedades físicas são obtidas através da análise de interações entre uma sonda e a amostra.

A sonda consiste de uma ponta (*tip*) com dimensões nano e micrométricas, acoplada a um suporte denominado *cantilever* que, por sua vez, tem uma ou mais de suas extremidades fixas a um substrato com dimensões de alguns milímetros. Na figura 5 observa-se a micrografia de um sonda com dois tipos de cantilevers: um retangular e dois triangulares. Destacamos as extremidades para indicar a localização das *tips*. Uma ampliação sobressaltada revela a geometria usual de uma *tip*.

Como AFM é uma técnica de microscopia de varredura, é imprescindível a utilização de um dispositivo que promova o movimento relativo entre sonda e amostra afim de que as interações possam ser detectadas em vários pontos de uma mesma região de interesse. Tal dispositivo é chamado de *scanner* (Zanette, 1997).

Salvo algumas alterações, o microscópio de força atômica consiste basicamente de um arranjo como mostrado na figura 6:

Para se monitorar a interação sonda-amostra, utiliza-se um laser que, ao se refletir na superfície do cantilever, atinge um fotodetector. A variação da posição do laser no fotodetector será utilizada para monitorar as deflexões do cantilever (ocasionadas pelas forças de interação) e também para produzir sinais elétricos que serão utilizados no mecanismo de *feedback* (Zanette,

⁵O termo aqui empregado refere-se às células que foram submetidas ao processo de fixação estrutural, e não a uma imobilização sobre uma determinada superfície. Em muitos estudos que envolvem a observação da morfologia das células fora do seu meio natural, faz-se necessária a utilização de certas substâncias químicas (os fixadores) que interagem com os constituintes celulares de forma a manterem a morfologia estável. Geralmente o uso de fixadores acaba interrompendo o metabolismo da célula e a mesma acaba morrendo. Poderíamos dizer que a fixação é uma espécie de "embalsamamento" celular.

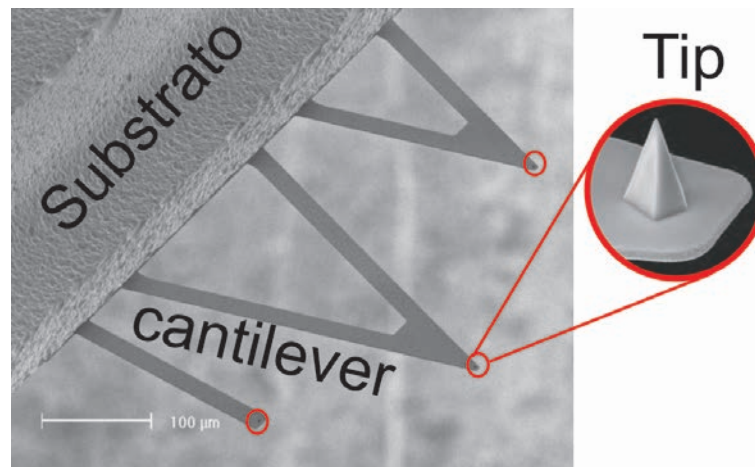


Figura 5: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de uma sonda de AFM contendo três cantilevers. Um retangular (mais abaixo) e dois triangulares ou em "v". As respectivas *tips* ou pontas situam-se nas regiões destacadas em vermelho. Imagem extraída e adaptada do site nanotechweb.

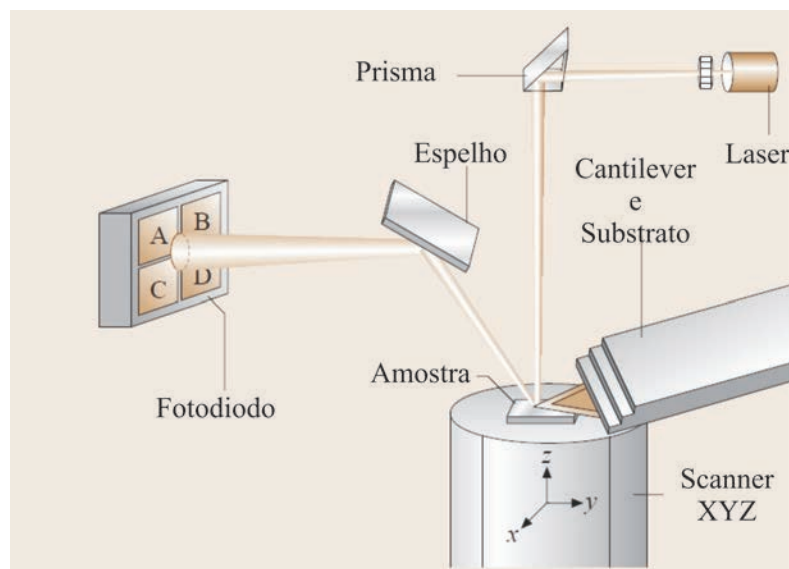


Figura 6: Representação esquemática dos componentes básicos de um microscópio de força atômica. Um feixe de laser é direcionado para a superfície refletora de um cantilever e daí segue para um fotodiodo. À medida em que toca a superfície, o cantilever se deflete e o feixe de laser sofre deslocamentos sobre os quadrantes A, B, C e D do fotodiodo. O fotodiodo converte esses deslocamentos em sinais elétricos que serão utilizados para monitorar e controlar o posicionamento relativo sonda-amostra. Adaptado de Bhushan et al. (2007).

1997). Este mecanismo consiste no processamento, amplificação e produção de sinais elétricos que são utilizados para manter a constância de um determinado parâmetro de referência que esteja relacionado com a interação sonda-amostra.

Para exemplificar seu funcionamento, suponha que o parâmetro de referência seja uma determinada deflexão do cantilever. À medida em que a sonda "varre" a amostra, interagindo com a mesma em pontos distintos, as forças de interação podem sofrer modificações que acarretam em mudanças na deflexão de referência do cantilever. Quando isso ocorre, o laser refletido atingirá o fotodetector em uma posição diferente da que incidia antes na deflexão de referência. Essa variação indicará ao *feedback* que o parâmetro de referência está modificado, ou seja, que a interação sonda-amostra foi alterada.

Se essa interação depender da distância (o que geralmente ocorre), o mecanismo de *feedback* produzirá um sinal elétrico que intervirá no *scanner*, fazendo com que este modifique a distância de separação entre a sonda e a amostra para que a deflexão de referência seja reestabelecida. Assim, o *feedback* detecta as mudanças na deflexão de referência e faz uma intervenção no sistema sonda-amostra para que o parâmetro de referência volte ao seu valor original. É nessa intervenção que se extrai o dado topográfico e outras propriedades da amostra.

Há três formas de se promover a interação sonda/amostra para a obtenção de imagens e de outras propriedades (modos de operação): o modo contato, também conhecido como *contact mode* ou *dc mode*, o modo de contato intermitente ou periódico (*tapping mode*) e o modo de não-contato.

No modo contato, a *tip* está fisicamente em contato com a superfície da amostra enquanto a mesma é varrida. A força de interação é repulsiva e é possível obter imagens com maior rapidez sem perda de resolução. Executado em ar (condições ambientais do laboratório) ou em meio líquido, esse modo fornece além de imagens topográficas, informações sobre as forças laterais (atrito) e as normais, de curto e longo alcance, que atuam no sistema sonda/amostra. Em ar, a *tip* fica parcialmente imersa em uma camada de fluido adsorvida sobre a superfície da amostra (camada de contaminação). Essa camada contribui para ação de forças de capilaridade que aumentam a força exercida pela *tip* sobre a amostra, podendo prejudicar a análise e danificar a amostra. No entanto, tais forças podem ser eliminadas empregando-se o modo contato em um meio líquido, onde a *tip* e a amostra estão totalmente imersas (Morris, Kirby e Gunning, 1999, p. 51).

No *tapping*, em ar, a *tip* varre a amostra fazendo contatos intermitentes enquanto oscila sobre a mesma, evitando assim, uma longa permanência na camada de contaminação. Nesse caso, utilizam-se forças atrativas de longo alcance para se monitorar a interação sonda/amostra.

As vantagens no uso do modo intermitente são: a eliminação de forças laterais na detecção, a alta resolução lateral sobre muitos tipos de amostra e a utilização de forças com baixa intensidade, preservando a integridade da amostra durante a obtenção de imagens. Além de topografia, o modo tapping pode ser utilizado para a obtenção de imagens que revelam propriedades elétricas e magnéticas de materiais. A desvantagem na aplicação desse modo de operação deve-se à baixa velocidade de varredura (Morris, Kirby e Gunning, 1999, p. 51). Já no modo não-contato, a *tip* oscila próximo à superfície da amostra sem tocá-la, ficando acima da camada de contaminação e interagindo com as forças de van der Waals que se estendem até 10 nm acima desta camada. Essas forças de interação são relativamente mais baixas, o que ocasiona uma baixa resolução lateral (condicionada pela distância sonda/amostra) e consequente limitação desse modo (Morris, Kirby e Gunning, 1999, p. 53).

A resolução vertical da técnica de AFM operando em ar é de aproximadamente 0,1-0,5 nm, enquanto na horizontal é de 1-5 nm, dependendo da rigidez da amostra. A resolução horizontal sobre a superfície de células vivas, em líquidos, tende a diminuir para algumas dezenas de nanômetros devido à "maciez" da superfície da membrana (Kuznetsova et al., 2007), dificultando o processo de medida topográfica. Segundo Alessandrini e Facci (2005), a sensibilidade e a resolução da técnica também dependem das características da *tip* e do cantilever (por exemplo, raio, formato, material e etc.).

Do ponto de vista biológico, a grande vantagem da técnica de AFM é a capacidade de obtenção de imagens de estruturas biológicas em condições fisiológicas (Morris, Kirby e Gunning, 1999). Informações topográficas e investigações de estruturas intracelulares utilizando esta técnica são relatadas em trabalhos como de Pietrasanta et al., 1994; Braet et al., 1998 apud Nowakowski e Luckham, 2002. Esta poderosa técnica é também usada para caracterização qualitativa e quantitativa de propriedades mecânicas de materiais biológicos (Kuznetsova et al., 2007).

Em geral, as propriedades mecânicas de diversos tipos de materiais, inclusive biológicos, são obtidas a partir de uma *indentação*. O teste de indentação é um método simples que consiste, essencialmente, em tocar um material em estudo cujas propriedades são desconhecidas (módulo de Young, viscosidade e etc.) com outro material de propriedades mecânicas e geométricas conhecidas. O objeto de propriedades mecânicas conhecidas que é utilizado para se fazer o contato com o material investigado recebe o nome de indentador (fig.7a). Durante esse contato, analisa-se a relação *carga-indentação* enquanto o indentador recebe incrementos de carga⁶ ΔF . Tanto a carga (F), quanto a profundidade de penetração ou indentação (δ) im-

⁶Esse termo é usualmente utilizado na *Mecânica do Contato* e pode ser entendido aqui como uma força no seu sentido físico.

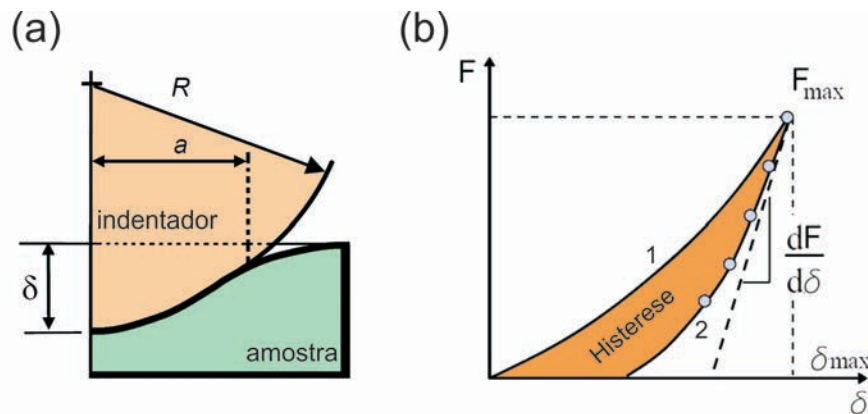


Figura 7: Representação do processo de indentação. (a) Diagrama do contato entre indentador com a superfície da amostra. (b) Curva de força por indentação.

postas pelo indentador ao material em estudo são registrados no momento em que cada um dos incrementos de carga é aplicado (fig. 7b).

Os dados obtidos da relação carga (força) versus indentação durante o movimento de aproximação ou de acréscimo de carga (curva 1 na fig. 7b) podem descrever um contato inicialmente elástico que pode se estender até o limite deste regime, passando em seguida ao escoamento plástico. Uma vez que o indentador para e inverte seu movimento (curva 2 na fig. 7b), passando a se afastar da amostra, há um decréscimo de força aplicada e novamente os dados da relação mencionada são coletados. Se durante a aproximação o indentador ultrapassa o regime elástico, a curva que descreverá a força *versus* deslocamento para o movimento de aproximação não coincidirá com a de afastamento, o que caracteriza uma histerese entre as curvas.

O conhecimento do ponto que corresponde a máxima indentação ou penetração para uma dada força aplicada, juntamente com a inclinação da curva de afastamento no respectivo ponto, possibilita a medida do módulo de Young da amostra analisada. Em alguns casos, é possível medir o módulo de Young também pela curva de afastamento.

Para materiais viscoelásticos, a relação entre a força aplicada e a indentação não é simples e depende da taxa com que a força é aplicada, bem como de sua intensidade. Para tais materiais, o processo de indentação será acompanhado de um *creep*. O *creep* é uma variação que ocorre na indentação sob ação de uma força constante aplicada. A análise da curva de *creep* fornece uma informação quantitativa sobre a elasticidade aparente da amostra e de sua viscosidade. No capítulo 3, mais detalhes sobre os processos de indentação e do estudo de propriedades mecânicas serão fornecidos.

Em suma, para se obter informações sobre as propriedades mecânicas de um dado

material, devemos indentá-lo e estudar o comportamento do seu processo de deformação através de uma curva do tipo força *versus* deslocamento ou força *versus* indentação. Já que a *tip* de uma sonda de AFM consegue tocar a superfície da amostra, ela pode então ser utilizada como um indentador e a deflexão do cantilever, causada pela deformação, pode ser utilizada para se monitorar a força aplicada.

Em AFM, as propriedades micromecânicas da superfície celular e de camadas subjacentes podem ser detectadas tanto no modo contato, quanto no modo tapping. O procedimento básico de operação em modo contato para estudos das características mecânicas de células e tecidos é a espectroscopia de força, denominada as vezes de *Force Curve* ou *Force Volume*, dependendo da abrangência espacial da medida.

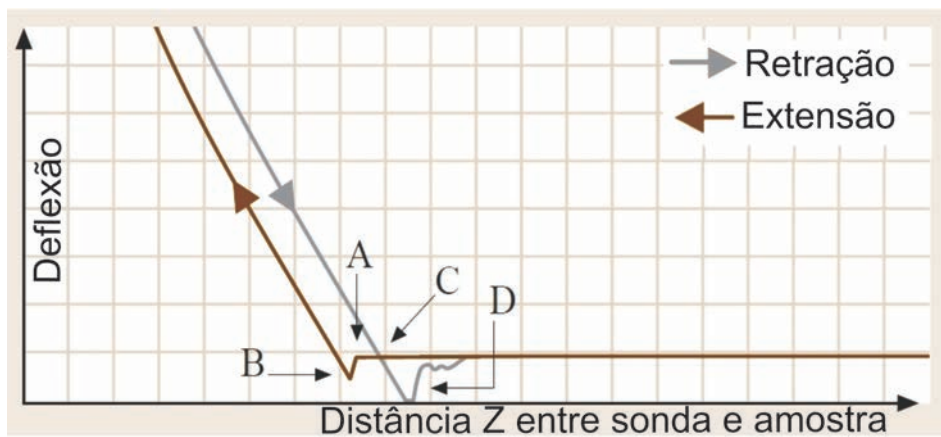


Figura 8: Curva de força obtida sobre uma amostra rígida através de um microscópio de força atômica operando em ar. Adaptado de Bhushan et al. (2007).

A curva de força (*Force Curve*) (fig. 8) contém informações sobre as interações sonda/amostra de curto e longo alcance em um determinado ponto da amostra, enquanto o *Force Volume* é uma coleção dessas curvas de força ao longo de uma determinada área de varredura. Ambas representam uma base para a estimativa de propriedades mecânicas celulares, bem como de outros tipos de materiais (Kuznetsova et al., 2007).

Na curva de força da fig. 8, destacamos quatro eventos. O evento A, situado na curva de extensão ou aproximação, indica que quando a *tip* está bem próxima da superfície da amostra ela é subitamente atraída, fazendo com que o cantilever sofra uma deflexão negativa. O evento B indica o ponto de contato, daí por diante as forças que atuarão no cantilever serão extremamente repulsivas, deflexionando o mesmo no sentido positivo. Se amostra for altamente elástica, ou seja, com altíssimo módulo de Young (equivalendo ao termo "dura" no senso comum), então a inclinação da curva a partir deste ponto será constante e igual a 1. Isso também ocorrerá na

curva de retração ou de afastamento até que seja atingido o ponto C em que as forças repulsivas deixam de agir, para darem lugar as forças atrativas. O evento D indica a adesão dessas forças atrativas de curto alcance. Uma vez que a *tip* continua se afastando, ela consegue sair dessa região atrativa e sofre outra mudança súbita em sua deflexão. Segundo Bhushan et al. (p. 604, 2007) o deslocamento horizontal entre as curvas de extensão e retração é causado pela histerese na cerâmica piezoelétrica que compõe o *scanner*.

Através de um curva de força como a da fig. 8, seja a de extensão ou de retração, é possível obter o módulo de Young. Segundo Kuznetsova et al. (2007), a estimativa de E utilizando a análise da(s) curva(s) de força obtida(s) via AFM depende do modelo mecânico utilizado. A maioria dos artigos que avaliam o módulo de Young de células utiliza modelos de contato hertziano. Tais modelos descrevem um caso simples de deformação elástica de dois corpos perfeitamente homogêneos em contato e submetidos a uma tensão.

Para a utilização do modelo de Hertz é necessário que se façam duas considerações: na primeira delas, admite-se que o indentador tenha forma esférica ou parabólica e, na segunda, que a amostra indentada seja extremamente espessa quando comparada a profundidade de indentação (Kuznetsova et al., 2007).

Adotando-se este modelo e aproximando⁷ a forma da *tip* a de uma esfera de raio R , a força $F(\delta)$ sobre o cantilever será dada por:

$$F(\delta) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E^* \delta^{3/2} \quad (1.7)$$

onde δ é a indentação e E^* é módulo efetivo do sistema *tip*/amostra. Já o módulo efetivo está relacionado com o módulo de Young da amostra (E_{sample}) pela equação 1.8

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1 - \nu_{sample}^2}{E_{sample}} \quad (1.8)$$

em que E_{tip} , ν_{tip} e E_{sample} , ν_{sample} são os módulos de Young e as razões de Poisson para o material da *tip* e da amostra, respectivamente. No caso de células, é comum a aceitação da hipótese da incompressibilidade desses materiais e, geralmente, toma-se o valor de 0,5 para ν_{sample} (Treloar, 1975, apud Radmacher, p. 72, 2002).

Os parâmetros F e δ são extraídos a partir das curvas de força e, assim, pela eq. 1.7, obtém-se o módulo efetivo. Com esse parâmetro, conhecendo-se as propriedades (E_{tip} , ν_{tip}) do material que constitui a *tip* e estimando-se a razão de Poisson da amostra, pode-se determinar o

⁷Essa aproximação é válida para o modelo de Hertz se o raio da *tip* for muito maior do que a profundidade de indentação Mahaffy et al. (2000)

módulo de Young da mesma utilizando-se a eq. 1.8.

Outra propriedade mecânica importante é a viscoelasticidade. A maioria dos materiais que não são puramente viscosos e que geralmente apresentam comportamento elástico significativo são chamados de viscoelásticos. O parâmetro chave que caracteriza a viscoelasticidade é o tempo de resposta do material deformado. Quanto menor for o tempo de resposta (tempo necessário para voltar a uma conformação original), comparado ao tempo de deformação (experimento), menos viscoso o material será (Gillies, Prestidge e Attard, 2002).

A razão entre o tempo de resposta do material τ e o tempo t do processo de deformação é definida como número de Deborah (De), conforme a eq. 1.9:

$$De = \frac{\tau}{t} \quad (1.9)$$

Assim, baixos números de Deborah caracterizam materiais viscoelásticos cuja resistência ao escoamento é menor, eles se comportam mais como líquidos do que como sólidos. Para números de Deborah maiores, ocorre o inverso. Temos então os seguintes limites: para líquidos $De \rightarrow 0$ e para sólidos $De \rightarrow \infty$. Podemos concluir também, pela análise da eq. 1.9, que os líquidos apresentam tempos de resposta pequenos, enquanto os sólidos demonstram grandes tempos de resposta para um dado período t de deformação. Devemos salientar que no limite de altíssima viscosidade, ou seja, grandes números de Deborah, os objetos se comportam como sólidos (Verdier et al., 2009).

Através de medidas dinâmicas das propriedades mecânicas é possível se analisar respostas elásticas e viscosas simultaneamente. Nessas medidas vários parâmetros que descrevem os comportamentos elásticos ou viscosos podem ser obtidos, são eles: o módulo de cisalhamento (G), o módulo complexo (G^*), o módulo de Young (E), o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''). Os dois últimos módulos relacionam, respectivamente, a habilidade do material em armazenar energia elástica e de dissipá-la (Macosko, 1994).

Verifica-se um grande número de publicações que estudam a mecânica de células do sangue via AFM. Mais especificamente, observa-se um grande interesse pelas células vermelhas. Elas tem sido bastante estudadas pela técnica de AFM devido à sua relativa simplicidade estrutural e à facilidade de seu isolamento para análise (Swihart, 2001). Isso pode ser verificado nos trabalhos de Garcia et al. (1997); Safran et al. (2005); Sen et al. (2005); Dulinska et al. (2006); Wu et al. (2009).

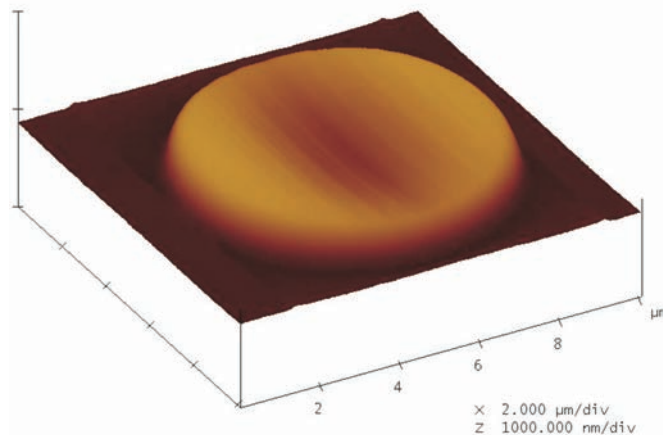


Figura 9: Imagem tridimensional obtida por AFM de uma hemácia fixada.

1.5 Hemácias, Hemoglobinas e Anemia Falciforme

As células vermelhas, também chamadas de hemácias, eritrócitos e/ou de RBCs⁸, são células anucleadas constituídas somente por membrana plasmática e citoplasma. Essas células que tem origem na medula óssea e que, em condições normais, constituem a maior população de células do sangue, possuem formato homogêneo de corpúsculos circulares, bicôncavos com diâmetro médio de 8 μm (Zago et al., 2001, p. 5). Essas características podem ser visualizadas na figura 9.

Segundo Safran (2005), as RBCs tem grande capacidade de adaptar seu formato para que possam transpor vasos capilares de diversos tamanhos, o que indica que as propriedades mecânicas a elas conferidas desempenham um papel fundamental na realização de sua função, o transporte de oxigênio. Na verdade, as RBCs transportam o oxigênio através da *hemoglobina*.

A hemoglobina (figura 10) é a proteína mais abundante nessas células, constituindo 34% da massa do citosol e consiste, aproximadamente, de seiscentos aminoácidos em quatro longas cadeias, enoveladas formando uma estrutura globular de 5,5 nm de diâmetro (figura 10). A capacidade de transporte de oxigênio dessa molécula é proporcionada por quatro íons de ferro que representam apenas 0,3 % de sua massa (Nelson e Cox, 2006, p. 10 e 13).

As hemoglobinas humanas são heterogêneas em todas as fases da vida. A tabela 1 indica cada tipo de hemoglobina que pode ser encontrada de acordo com o período de desenvolvimento:

As hemoglobinas embrionárias (Gower 1, Gower 2 e Portland) são unicamente expres-

⁸Sigla em inglês para red blood cell

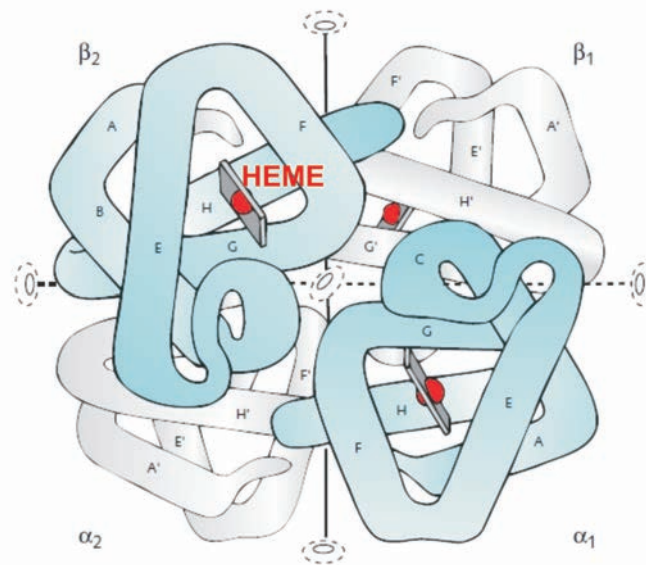


Figura 10: Estrutura da hemoglobina. Suas quatro cadeias α_1 , β_1 , α_2 e β_2 se enovelam formando um tetrâmero. Cada íon de ferro (esferas vermelhas) fica localizado em uma das cadeias, aprisionado em uma estrutura chamada heme. O quarto íon não é mostrado pois está oculto na cadeia α_2 . Adaptado de Provan e Gribben (2010).

sas nesse período e sua síntese não é mais reativada durante o crescimento. Já a hemoglobina fetal (HbF), que coexiste com a hemoglobina (HbA), predomina na fase fetal. Próximo ao nascimento, a síntese de HbA é ativada e a produção de HbF vai decaindo. Na idade adulta, a HbA predomina e há uma pequena produção (menos de 1%) de HbF nos indivíduos normais (Zago et al., 2001, p. 276).

Através do coração, o sangue arterial segue para os tecidos periféricos contendo hemoglobina que está cerca de 96% saturada com oxigênio. No sangue venoso, que retorna ao coração, a hemoglobina apresenta apenas 64% de saturação. Assim, em cada 100 mL de sangue arterial que flui há uma redução de quase um terço em virtude da oxigenação dos tecidos (Nelson e Cox, p. 162).

Conforme foi dito no início dessa seção, as hemácias contêm no seu citoplasma moléculas de hemoglobina. Assim, somos levados a concluir que o transporte de oxigênio para os tecidos, além de depender da molécula de hemoglobina, depende do fluxo sanguíneo, onde este último é influenciado pelas propriedades mecânicas das RBCs.

Kuznetsova et al. (2007) afirmando que as funções de uma célula são essencialmente determinadas pela sua estrutura que, por sua vez, é caracterizada por certas propriedades mecânicas, conclui que tais propriedades sejam afetadas por uma grande variedade de processos fisiológicos e patogênicos. De fato, a alteração da mecânica na membrana de RBCs geralmente

Tabela 1: Hemoglobinas observadas durante o desenvolvimento ontogenético humano

Período	Hemoglobina
Embrionário	Hb Gower 1
	Hb Gower 2
	Hb Portland
Fetal	HbF
Adulto	HbA
	HbA ₂

Extraído e adaptado de Zago et al. (2001)

indica processos de patogênese de muitas doenças (Miller et al., 2002 apud Khan, 2009). As anemias hemolíticas constituem um exemplo clássico de doenças caracterizadas por alterações na estrutura das RBCs (Mohandas e Evans, 1994).

As anemias hemolíticas compreendem um grupo de doenças em que a sobrevivência das RBCs em circulação está muito reduzida e a medula óssea não é capaz de compensar esse problema, mesmo elevando sua produção. Como a quantidade de RBCs destruídas é maior do que aquela produzida, o volume de RBCs circulantes torna-se menor, caracterizando o estado anêmico (Zago et al., 2001, p. 244).

Em condições normais, os eritrócitos humanos tem sobrevivência média de 120 dias a partir da saída da medula óssea para o sangue. Desde que deixam a medula óssea na forma de reticulócitos e completam sua maturação no baço, os eritrócitos começam a exercer suas funções. À medida que envelhecem, as RBCs perdem atividade enzimática, tornam-se densas e menos deformáveis, sofrendo alterações em sua superfície. Tais alterações são detectadas por certos tipos de leucócitos (macrófagos) que fagocitam e destroem as RBCs, retirando-as da circulação sanguínea (Zago et al., 2001, p. 108).

No entanto, alguns fatores favorecem o encurtamento da sobrevivência das RBCs, são eles: anormalidades da membrana eritrocitária, na hemoglobina, nas enzimas de vias metabólicas e agressões diretas. Com a sobrevivência reduzida, as RBCs apresentam rigidez precoce e/ou substâncias em sua membrana que sinalizam positivamente a fagocitose aos macrófagos (Zago et al., 2001, p. 109).

As anemias hemolíticas podem ser hereditárias ou adquiridas, crônicas ou de aparecimento abrupto. Tais anemias também podem ser classificadas segundo os dois tipos de defeitos estruturais; os intrínsecos e os extrínsecos. Os defeitos intrínsecos aos eritrócitos são: alterações da estrutura ou função da membrana, anormalidades da hemoglobina e anormalidades

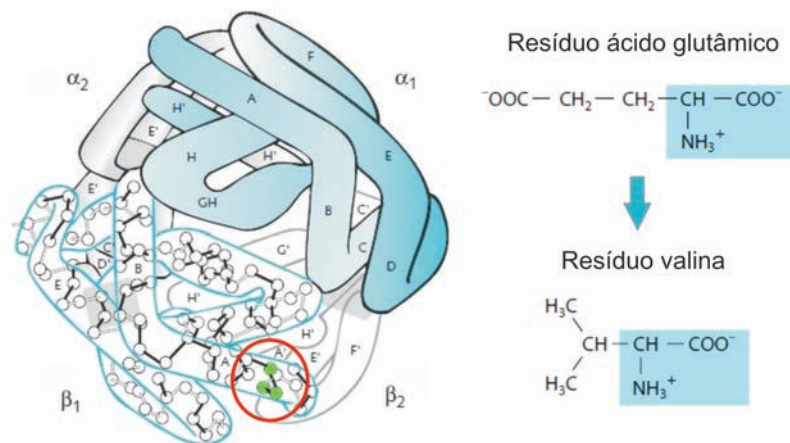


Figura 11: Alteração estrutural da hemoglobina na anemia falciforme. Uma simples troca de nucleotídeo (adenina por timina) na região do DNA que é responsável pela síntese da hemoglobina, ocasiona uma síntese da hemoglobina anormal S. Adaptado de Provan e Gribben (2010).

das enzima eritrocitárias. Já os defeitos extrínsecos devem-se a processos de ruptura mecânica das hemácias, a agentes químicos, biológicos, a processos imunes e auto-imunes, por exemplo (Zago et al., 2001, p. 247).

A *anemia falciforme* é um tipo de anemia hemolítica ocasionada por um defeito intrínseco ao eritrócito, mais especificamente, por uma alteração na estrutura da hemoglobina, caracterizando uma *hemoglobinopatia estrutural*. Já havíamos dito na seção 1.1 que um defeito genético no DNA era responsável pela anemia falciforme. Na verdade, a mutação genética desencadeia a hemoglobinopatia que, por sua vez, ocasiona a anemia falciforme.

Essa hemoglobinopatia decorre de um defeito molecular primário; uma substituição de um nucleotídeo ou base nitrogenada na região do DNA responsável pela expressão da globina β . A adenina que deveria constituir o códon 6 do gene da globina é substituída por uma timina e, em consequência disso, a globina passa a apresentar um resíduo valil, não-polar, ao invés do glutamyl, polar. Tal substituição resulta em uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS), com forte predisposição para se polimerizar (Zago et al., 2001, p. 282 e 290).

Na figura 11, destaca-se com um círculo em vermelho um aminoácido localizado na região A da cadeia β_1 da molécula de HbA. Trata-se do ácido glutâmico. Com a alteração genética, outro aminoácido é sintetizado (valina) e passa ocupar aquela posição. O mesmo ocorrendo para a outra cadeia β .

Quando a HbS está na sua forma oxidada, ela apresenta estrutura semelhante à hemoglobina normal (HbA) o que sugere que a substituição do resíduo glutamyl pelo valil, não altera a estrutura global da hemoglobina. No entanto, quando a HbS está desoxidada e em altas con-

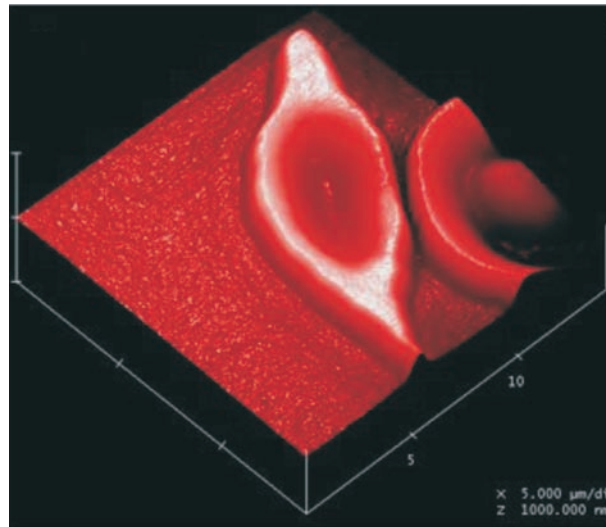


Figura 12: Imagem tridimensional de AFM em modo contato de uma célula com alteração morfológica devido à anemia falciforme. Imagem gentilmente cedida por Rebelo (2010).

centrações suas propriedades físicas diferem daquelas da HbA. A HbS desoxigenada *in vitro*, sob condições quase fisiológicas, torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em polímeros (Zago et al., 2001, p. 291).

Segundo Provan e Gribben (2010, p. 185), essa polimerização induz ao processo de *falcização* das RBCs. A falcização se caracteriza por mudanças irreversíveis no *shape* e na deformabilidade dessas células, levando a uma diminuição da elasticidade e demais propriedades reológicas, bem como à hemólise.

O início da polimerização da HbS é conhecido como nucleação e envolve a agregação de pequenos particulados de HbS na sua forma desoxidada. Uma vez constituído um núcleo de crescimento, a propagação do polímero cresce exponencialmente. A associação dessas moléculas para formar o núcleo é um processo estocástico e, por isso, existe um atraso entre a formação do núcleo e a polimerização completa. O produto final desse processo, é um fibra composta por várias moléculas de HbS que, dependendo da orientação no interior celular, deformam a célula (Provan e Gribben, 2010, p. 185).

As hemácias deformadas são chamadas de drepanócitos. Nem sempre o processo de falcização induz a RBC ao formato de foice, sendo também possível encontrar drepanócitos alongados como o que se observa na figura 12.

O processo de oxidação/desoxidação não ocorre uma única vez para uma dada célula, pelo contrário, uma vez em circulação, as hemácias contendo HbS desoxidada passarão várias vezes pelos alvéolos e lá se oxidarão repetidas vezes, reassumindo seu formato normal (Bridges e Pearson, 2008, p. 263).

Esses repetidos episódios da distorção eritrocitária pelos polímeros de HbS durante a circulação danifica a membrana celular e compromete sua integridade. Segundo Bridges e Pearson (2008, p. 263) uma consequência disso se reflete na oxidação da membrana caracterizada pelas ligações cruzadas (*cross-links*) entre as proteínas da membrana e a camada lipídica. Como exemplo, citamos os casos em que estruturas moleculares contendo o grupo heme deslocam-se da hemoglobina e aderem à membrana. Essas estruturas são chamadas de *hemichromes*.

Segundo Barabino et al. (2010), vários trabalhos na literatura atestam a capacidade adesiva das células falcizadas ao endotélio e tal fato está altamente associado à gravidade da doença. Barabino afirma que as numerosas interações célula-célula e célula-proteína são ocasionadas pela adesividade anormal que, por sua vez, resulta dos danos causados à membrana celular pela polimerização de HbS.

As membranas danificadas tornam-se permanentemente rígidas e não conseguem reassumir seu formato normal, mesmo na ausência de moléculas de HbS desoxidadas. São essas as células visualizadas nos esfregaços sanguíneos rotineiros realizados nos hemocentros e/ou laboratórios de análises clínicas.

Zago destaca a problemática da polimerização e suas consequências para a estrutura das RBCs e para a saúde dos indivíduos:

A polimerização da hemoglobina S é o evento fundamental na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade. As células rígidas, com formas aberrantes (classicamente conhecidas são as células em forma de foice), são responsáveis pela oclusão vascular (fig. 13) e lesão de tecidos que representam os fenômenos principais da doença. (Zago et al., 2001, p. 291).

Dentre as manifestações clínicas e complicações resultantes principalmente da vaso-occlusão e secundariamente da anemia, destacam-se a esplenomegalia crônica (crescimento do baço), distúrbios osteoarticulares como a necrose asséptica da cabeça do fêmur e dores osteoarticulares, problemas oculares como o glaucoma e a hemorragia retiniana, complicações no sistema nervoso central, urogenital, gastrointestinal dentre outros (Zago et al., 2001, p. 297).

No Brasil, estima-se que existam entre 25 e 30.000 casos de anemia falciforme e que, a cada ano, há um aumento de 3.500 novos casos (Cançado e Jesus, 2007). No estado do Ceará, o acompanhamento médico desses pacientes se dá no hemocentro do estado do Ceará (HEMOCE), uma referência no estudo e tratamento de hemoglobinopatias nesse estado.

Por se tratar de uma doença genética, a anemia falciforme ainda não tem cura e o

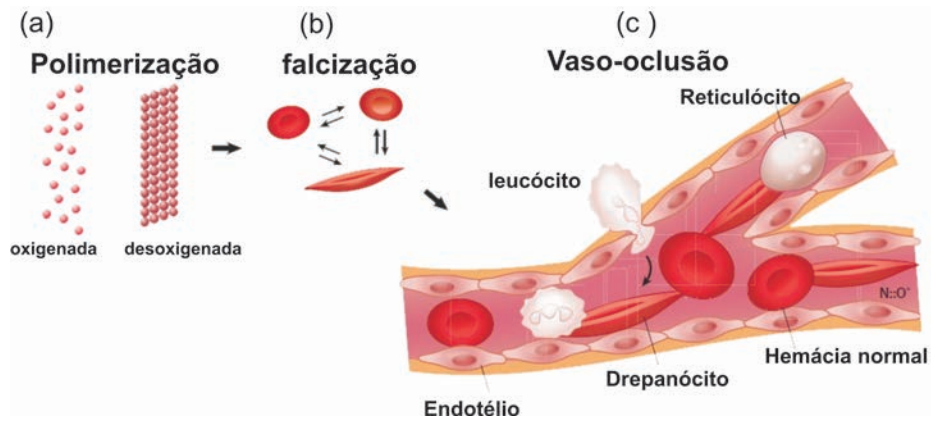


Figura 13: A problemática da hemoglobina anormal. (a) Ilustração do processo de polimerização de HbS. (b) Mudança de *shape*. (c) Vaso-oclusão. Extraído e adaptado de Barabino et al. (2010).

tratamento de longo prazo envolve a suplementação de ácido fólico na dieta dos pacientes, o uso de medicamentos que promovem o aumento da hemoglobina fetal (HbF), como a hidroxiuréia e derivado do butirato, profilaxia de infecções, tratamento de crises dolorosas vaso-oclusivas e, em casos especiais, a transfusão sanguínea. Além disso, os pacientes devem, sempre que possível, ser acompanhados por equipes multidisciplinares de profissionais com os médicos, enfermeiros, psicólogos, assistentes sociais e fisioterapeutas (Zago et al., 2001, p. 304).

O diagnóstico da anemia falciforme depende fundamentalmente da comprovação da existência da hemoglobina S e isso é obtido através da *eletroforese*⁹. Também utiliza-se a cromatografia líquida de alta pressão ou a eletroforese com focalização isoelétrica (Petersen e Mohammad, p. 145, 2001), mas é quase sempre indispensável para o diagnóstico correto das síndromes falciformes o estudo de todos os familiares, se possível (Zago et al., 2001, p. 295).

O fato de que essa doença afeta a estrutura física e bioquímica das hemácias faz com que se tenha o interesse em estudar as propriedades mecânicas dessas células. Nesse contexto, é necessário o uso de técnicas que possibilitem a análise das hemácias em condições fisiológicas, a fim de minimizar os danos causados às células por fatores externos, seja na preparação da amostra ou durante o experimento. AFM é uma delas.

⁹Técnica de caracterização de proteínas onde se aplica um campo elétrico para separar proteínas distintas devido à diferença de dispersão em um gel.

1.6 Hematologia Física: estudo via AFM das propriedades mecânicas de hemácias em anemia falciforme

Ao expandirmos a aplicação dos métodos da Física ao campo da Medicina, mais especificamente à especialidade médica denominada Hematologia, tomamos a liberdade de cunhar o termo "Hematologia Física" para representar uma abordagem de estudos hematológicos na qual se utilizam propriedades ou grandezas físicas para se estudar o sangue, mais especificamente, um tipo de célula sanguínea, as hemácias.

As propriedades elásticas da membrana das hemácias influenciam tanto o formato dessa célula, quanto a sua resposta a várias tensões ou seja, na sua deformabilidade (Stevina et al., 2004). A membrana da RBC consiste de uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas integrais de membrana e um esqueleto de membrana subjacente. Em seu trabalho, Stevina et al. (2004) demonstram que estes dois constituintes da membrana da RBC afetam seu comportamento elástico de maneira cooperativa.

Um entendimento acerca da estrutura dos constituintes da membrana eritrocitária, organização e sua microelasticidade são relatados nos trabalhos de McGouth, 1999 e Discher, 2000.

A membrana das hemácias tem propriedades viscoelásticas singulares, que em alguns aspectos ora assemelham-se aos fluidos, ora aproximam-se daquelas concernentes aos sólidos. A base estrutural da membrana das RBC's ainda é muito discutida (Sleep et al., 1999).

A alta resistência da membrana a mudanças na sua área superficial é uma característica das bicamadas fosfolipídicas, enquanto sua resposta ao cisalhamento depende da rede de proteínas do citoesqueleto que reveste a superfície citoplasmática (Evans and Hochmuth, 1978; Berck et al., 1989; Mohandas and Evans, 1994 apud Sleep, 1999).

Nos trabalhos citados, as propriedades mecânicas de RBCs vem sendo estudadas por várias técnicas e em alguns deles, percebe-se uma busca por uma caracterização mecânica das patologias que se associam a estas células. Com a execução deste trabalho, esperamos contribuir de forma significativa para a consolidação da ponte entre os conhecimentos bioquímicos já estabelecidos e as propriedades mecânicas de RBCs contendo HbS.

Investigações através de AFM podem ser úteis no estudo de patologias celulares, haja vista que qualquer fator influenciando as estruturas celulares pode causar alterações em suas propriedades mecânicas (Garcia et al., 1997). Corroborando com essa idéia, Dulinska et al. (2006) afirma que a determinação de propriedades elásticas de células via AFM possibilita

uma medida da influência de diferentes fatores na mecânica celular, fato este que justifica a perspectiva de que essa técnica venha a ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para diferentes patologias.

Assim, propomos o uso de AFM para se investigar propriedades morfológicas e mecânicas tais como curvatura, rugosidade, módulo de Young, viscosidade de hemácias de indivíduos com anemia falciforme.

No capítulo 2, dedicamos nossa atenção ao estudo morfológico quantitativo das hemácias. Consideramos esse estudo pertinente já que parte dos exames laboratoriais rotineiros concentra-se na análise de esfregaços sanguíneos por microscopia ótica, extraindo somente dados qualitativos a cerca da morfologia das hemácias. Adicionalmente, desenvolvemos uma metodologia, bastante reprodutível, para confecção de fragmentos membranários.

No capítulo 3 estudamos o comportamento viscoelástico das células vermelhas. Inicialmente, apresentamos uma metodologia para a fixação de microesferas de sílica afim de mudar a geometria de *tips* de AFM. Em seguida, utilizamos essas *tips* para indentar as células, obtendo curvas de força-indentação, afim de se obter as propriedades mecânicas mencionadas.

2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ERITRÓCITOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Neste capítulo abordaremos o aspecto da morfologia das células vermelhas. Investigou-se a relação entre a hemoglobinopatia em questão com a rugosidade da face citoplasmática da membrana eritrocitária. Considerando a importância do *shape* para o desempenho da função dessas células e a sua modificação em decorrência da anemia falciforme, propomos uma forma de se extrair a distribuição de curvatura gaussiana na superfície das hemácias via AFM.

2.1 A estrutura dos eritrócitos

Como já foi dito, as RBCs de indivíduos sadios em condições fisiológicas se apresentam em um formato circular e bicôncavo (fig. 14), contendo algumas pequenas irregularidades (Angelov and Mladenov, 2000).

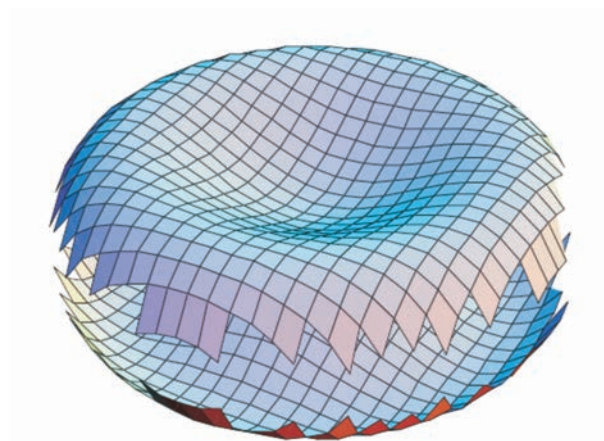


Figura 14: Reconstrução idealizada de uma hemácia em equilíbrio estrutural. A superfície está aberta nas bordas. Extraído de Ikai (2008).

Na ausência de forças externas, essas células possuem um formato discóide bicôncavo com diâmetro de $7,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$, espessura central de $1,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e espessura na periferia

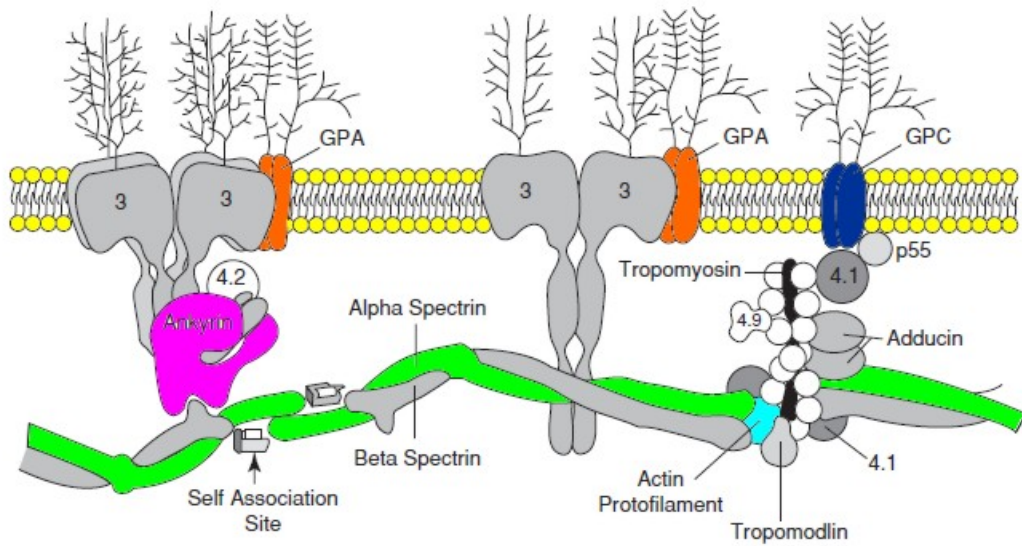


Figura 15: Diagrama esquemático do citoesqueleto da membrana eritrocitária. Uma rede complexa de proteínas está sob a bicamada lipídica da RBC. A proteína anquirina liga o citoesqueleto à membrana, formando uma ponte entre a espectrina e uma proteína intrínseca da membrana, a banda 3. A actina e a proteína 4.2 são também constituintes importantes do citoesqueleto. Adaptado de Bridges e Pearson (2008).

medindo $2,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$. A área superficial das hemácias é de aproximadamente $140 \mu\text{m}^2$ e engloba um volume de aproximadamente $90 \mu\text{m}^3$. A membrana eritrocitária, por sua vez, possui cerca de $0,02 \mu\text{m}$ de espessura (Thiriet, 2008, p. 278).

De acordo com Evans e Fung (1972) apud Ikai (p. 186, 2008) a expressão analítica que reproduz a superfície da figura 14 é dada, em coordenadas cartesianas, pela eq. 2.1:

$$Z = \pm R_0 \left[1 - \frac{X^2 + Y^2}{R_0^2} \right]^{1/2} \left[C_0 + C_1 \frac{X^2 + Y^2}{R_0^2} + C_2 \left(\frac{X^2 + Y^2}{R_0^2} \right)^2 \right] \quad (2.1)$$

onde as constantes C_0 , C_1 e C_2 assumem os respectivos valores: 0,207161; 2,002558; -1,122762 e $2R_0$ é igual ao diâmetro médio da célula.

Segundo Murador e Deffune (2007), a membrana da RBC consiste de uma bicamada fosfolipídica protéica que é suportada por um citoesqueleto proteico subjacente. Na figura 15, observamos a existência desse conteúdo protéico na superfície superior e inferior (face citoplasmática) da membrana.

As proteínas integrais atravessam ou penetram a bicamada lipídica (Murador et al., 2007). Elas são fortemente ligadas à membrana através de interações hidrofóbicas com os lipídios da bicamada. As proteínas banda 3 e as glicoforinas A (GPA), B (GPB) e C (GPC) pertencem a esta classe e alguns grupos sanguíneos estão localizados nas terminações dessas

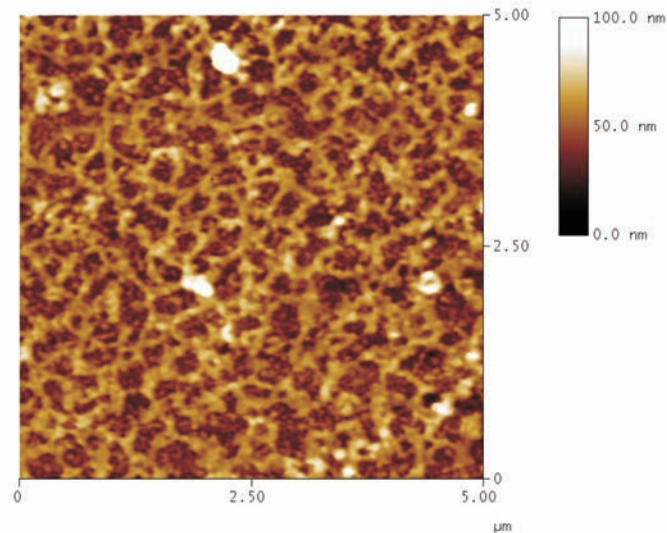


Figura 16: Citoesqueleto eritrocitário. Imagem AFM obtida em nosso laboratório com o microscópio operando em modo contato.

proteínas (Mohandas e Evans, 1994).

As glicoforinas possuem resíduos de ácido siálico que conferem à membrana das hemácias uma forte carga líquida negativa. Esta carga desempenha um papel importante na redução da interação das hemácias entre si bem como com outras células, incluído as endoteliais (Mohandas e Evans, 1994).

Na membrana eritrocitária também são encontradas proteínas intrínsecas ou periféricas que ficam na superfície citoplasmática, sendo a espectrina a mais abundante delas (Murador et al., 2007). Tais proteínas constituem o citoesqueleto eritrocitário.

O citoesqueleto (fig. 15) é constituído basicamente de espectrinas alfa e beta, anquirina (banda 2.1), filamentos curtos de actina (banda 5), trompomiosina (banda 7), aducina e proteínas 4.1, 4.2 (ou palidina), 4.9(ou dematina) e p55. Estas proteínas sustentam cerca de 60% da dupla camada lipídica pelas ligações entre: a) anquirina e banda 3; b) proteína 4.1 e glicoforinas A e C; c) interação direta da espectrina e proteína 4.1 com cargas negativas dos lípidos (Mohandas e Evans, 1994). O citoesqueleto representa 60% da massa protéica da membrana e é formado por uma rede dessas proteínas que se polimerizam em fibras microscópicas (Thiriet, 2008, p. 278). Na figura 16, vemos a estrutura do citoesqueleto eritrocitário.

No caso das hemácias, a rede de espectrina e actina é triangular e permeia toda a face citoplasmática da membrana. A figura 17, mostra como esta rede se dispõe. Note a semelhança entre os triângulos da figura 17b com as estruturas visualizadas na figura 16.

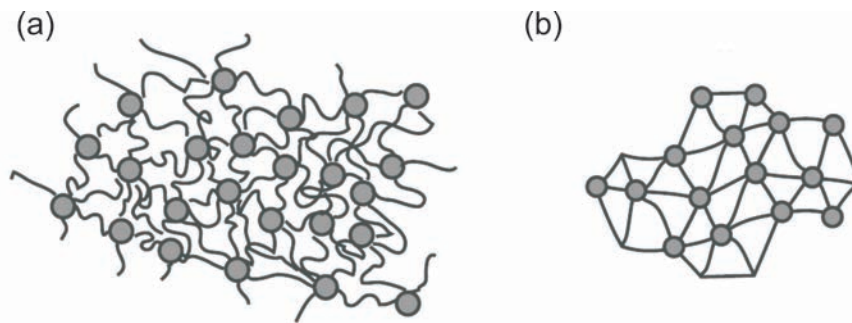


Figura 17: Disposição de rede de proteínas do citoesqueleto no estado (a) relaxado (b) tensionado

A membrana das hemácias apresenta alta resiliência¹, porém baixo módulo de curvatura. Isso significa que é muito mais fácil curvar a membrana eritrocitária do que tracioná-la ou comprimi-la em uma dada área de contato contendo um certo número de fosfolipídios. Assim, a membrana não consegue manter uma forma definida sem que exista uma estrutura de suporte, o citoesqueleto. O citoesqueleto se liga à membrana através das proteínas integrais, conferindo à célula seu *shape* e outras propriedades mecânicas (Ikai, 2008, p. 189).

Durante a circulação, através dos capilares, as hemácias submetem-se a deformações físicas significantes e então, o comportamento mecânico do esqueleto da membrana é um importante preditor da eficiência circulatória e da integridade celular (Bremmell et al., 2006).

O conteúdo citoplasmático está em contato direto com o citoesqueleto e espera-se que alterações físico-químicas no citoplasma possam vir a interferir na estrutura do citoesqueleto ou na face citoplasmática da membrana. De fato, citamos no capítulo 1 (p. 43) que estruturas moleculares desprendidas da hemoglobina anormal aderem à membrana, provocando sua oxidação. Daí, surge o interesse em analisar a rugosidade da face citoplasmática da membrana de hemácias em indivíduos com anemia falciforme.

2.2 A rugosidade da membrana eritrocitária

Segundo Girasole et al. (2007), a rugosidade de uma superfície é um parâmetro relevante para muitos estudos que envolvem a caracterização e/ou comparação de superfícies. O uso desse parâmetro tem sido incrementado através da aplicação da técnica de AFM (Bonnell, 2000; Morris, Kirby, Gunning, 1999 apud Girasole et al., 2007).

Após a obtenção da imagem de AFM, a comparação de características topográficas, em escala nanométrica, de duas ou mais superfícies, pode ser quantitativamente descrita pela

¹Capacidade que o material possui de absorver energia elástica sob tração e devolvê-la quando relaxado.

rugosidade. Nesse aspecto Girasole et al. (2007) sugerem a análise estatística da rugosidade nas imagens de AFM. A rugosidade da superfície externa da membrana eritrocitária tem sido estudada por vários autores, aqui destacaremos dois deles.

Costa (2006) diferenciou grupos sanguíneos através da análise de rugosidade da membrana externa. Esse autor verificou que a rugosidade da membrana das células de doadores pertencentes ao grupo sanguíneo AB+ é maior do a encontrada nas hemácias de doadores do grupo O+.

Girasole et al. mostraram que a rugosidade da superfície externa da membrana das hemácias independe da sua curvatura, o que possibilita o uso da rugosidade como parâmetro comparativo de superfícies, mesmo em situações onde o *shape* das hemácias se altera.

Não encontramos dados na literatura científica a respeito da rugosidade da face citoplasmática da membrana das RBCs em casos de anemia falciforme. Swihart et al. (2001), por exemplo, utilizou a técnica de AFM para analisar a parte interna da membrana de eritrócitos, porém em situações não patológicas. Além de Swihart et al. (2001), Yamashina e Katsumata (2000) analisam em situações não-patológicas a face citoplasmática da membrana de hemácias. O objetivo destes autores é propor metodologias de preparação de amostra que sejam alternativas àquelas utilizadas para a observação dessa estrutura por microscopia eletrônica de varredura.

No entanto, Swihart et al., (2001) sugerem um metodologia que, a princípio, poderia ser utilizada para estudar essa região de interesse nas células de pacientes com anemia falciforme. A metodologia consiste em produzir *ghosts*, fragmentos membranários que expõem a face citoplasmática da membrana eritrocitária (fig. 18).

As hemácias suspensas em uma solução tamponada são lavadas e, em seguida aderidas, à lamínulas de vidro tratadas com um substância chamada poly-L-lisine. A poly-L-lisine tem terminações com polaridade positiva que atraem as cargas negativas da glicoforinas da membrana eritrocitária, fazendo com que a parte inferior da célula seja fortemente aderida ao substrato.

Em seguida, as células são submetidas a um forte jato (fig. 19) de solução tampão fosfatada (PBS). Esse jato rompe a membrana e, após sucessivos jatos, restam somente as partes da membrana que estavam aderidas ao substrato. Os fragmentos aderidos ao substrato, ficam com a face citoplasmática exposta e possibilitam o processo de imagem.

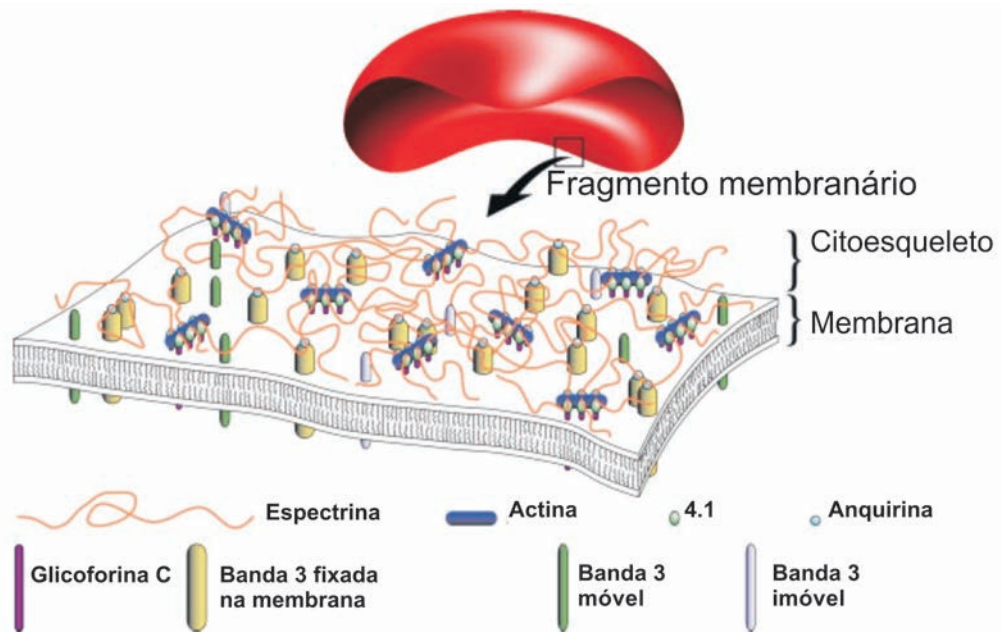


Figura 18: Representação gráfica de um fragmento membranário com exposição da face citoplasmática. Extraído e adaptado de Gompper e Schick (2008).

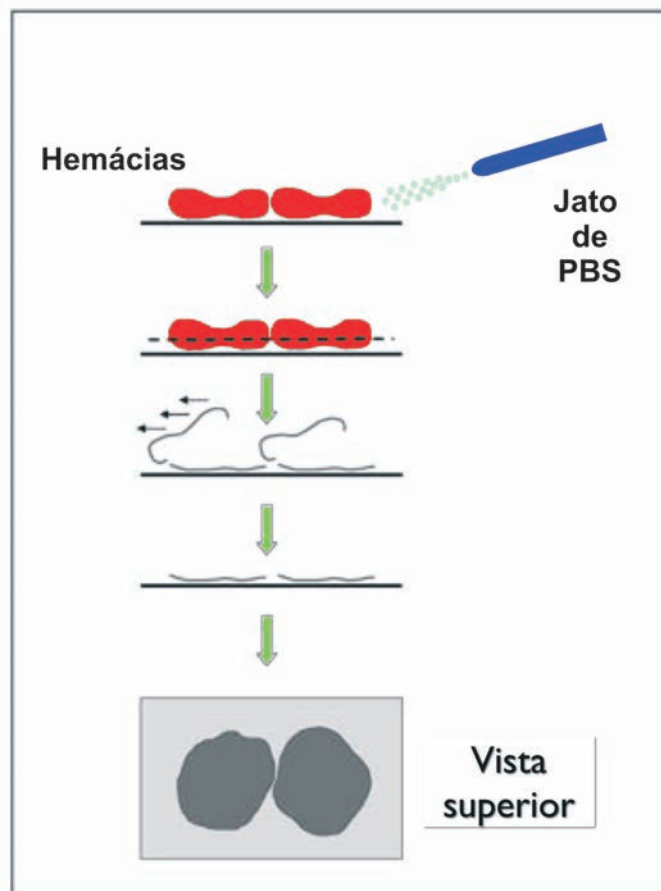


Figura 19: Representação gráfica do processo de confecção de *ghosts*. Extraído e adaptado de Bhushan e Fuchs (2006).

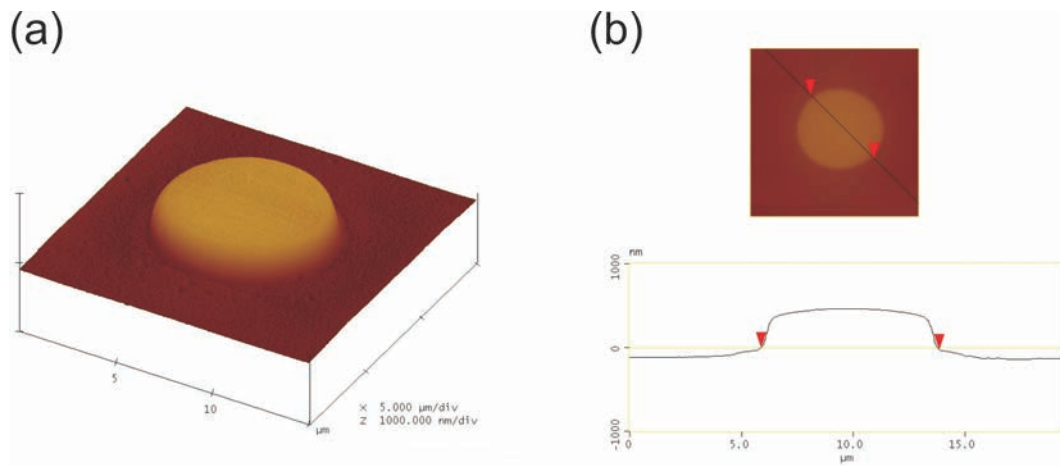


Figura 20: (a) Imagem AFM tridimensional de uma hemácia. A medida foi realizada em modo tapping em ar. (b) Seção transversal da célula mostrada em (a).

2.3 A importância do *shape* na funcionalidade dos eritrócitos e as dificuldades experimentais

O tamanho e o formato (*shape*) de eritrócitos são indicadores importantes do bem estar dos indivíduos (O'Reilly et al., 2001). A forma da RBC é fortemente determinada pelas propriedades do citoesqueleto da membrana e pela atividade da molécula de adenosina trifosfato (ATP) (Safran et al., 2005). Embora essas células sejam desprovidas de núcleo e terminantemente diferenciadas, elas podem sofrer uma variedade de mudanças na sua morfologia devido a várias doenças ou desordens clínicas.

O *shape* normal da hemácia (seção 2.1) representa uma configuração de equilíbrio que minimiza a energia de curvatura de uma superfície fechada para uma dada área superficial e volume com geometria assimétrica². Os eritrócitos respondem com alterações estruturais em meios hipotônicos e hipertônico e, portanto estudos de *shape* devem ser conduzidos em meio isotônico. A membrana das hemácias não é uma estrutura estática. Ela possui uma agitação térmica (flutuação) espontânea que também é uma consequência de suas propriedades físico-químicas. Além disso, a membrana é excitada por choques devido ao movimento browniano de moléculas, como a água (Marc Thiriet, 2008, p. 278 e 279).

A caracterização morfológica de hemácias por AFM em ar revela um achatamento dessas células e a perda da concavidade (fig. 20). O motivo do achatamento observado na figura 20 é a desidratação da célula. Isso poderia ser evitado com a fixação. O'Reilly et al. (2001) sugerem que as hemácias passem por um processo de fixação para que possam ser caracterizadas

²A assimetria é gerada pelo fato da camada fosfolípídica externa da RBC ter ligeiramente mais moléculas e maior área superficial do que a camada interna.

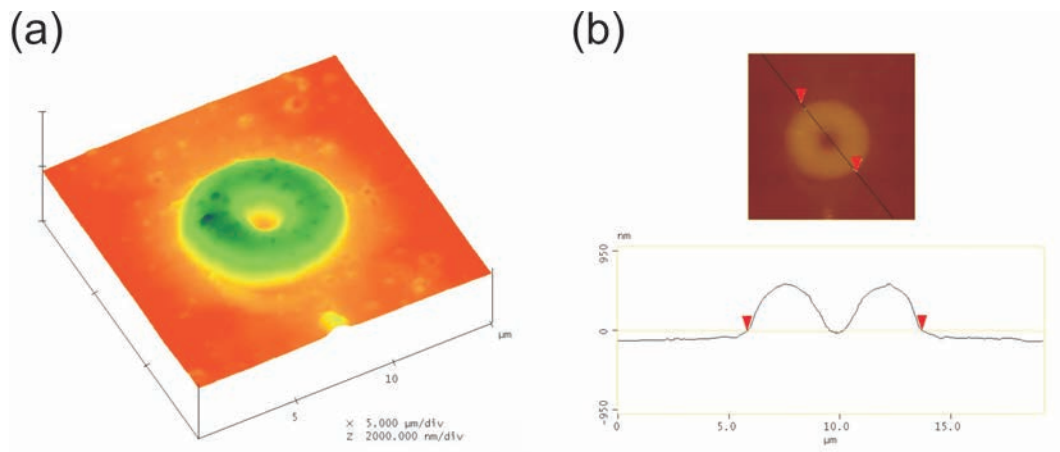


Figura 21: Imagem AFM tridimensional de uma hemácia fixada com metanol PA. A medida foi realizada em modo tapping em ar. A hemácia apresenta uma forma conhecida como célula em alvo e observam-se partículas aderidas à membrana. (b) Seção transversal da célula mostrada em (a)

em ar. Como mencionamos na nota de rodapé nº 2 da página 30, o processo de fixação interrompe o metabolismo e mantém a estrutura que a célula tinha antes de "morrer". Devemos ressaltar que esse procedimento confere rigidez adicional à estrutura celular e, embora seja interessante para estudos morfológicos, não é desejável para estudos de viscoelasticidade.

Em laboratórios de hematologia é comum o uso de fixadores à base de metanol. Segundo os profissionais da área, trata-se de um bom fixador para os esfregaços sanguíneos que serão observados por microscopia ótica. Em nossos estudos morfológicos, verificamos que o metanol coagula rapidamente o sangue e as partículas já agregadas acabam aderindo também à superfície dos eritrócitos (figura 21)

Por outro lado, as hemácias também poderiam ser analisadas via AFM em um meio líquido com características fisiológicas. Para isto se faz necessária a imobilização das células, uma vez que a sonda desloca a hemácia com maior facilidade dentro do líquido. Para a imobilização recorre-se à modificação química da superfície do substrato a partir de substâncias, como a *poly-L-lisine*, cujas moléculas apresentam polaridade positiva em suas terminações. Tais moléculas interagem fortemente com os grupamentos de carga negativa dipostos na membrana eritrocitária e proporcionam a imobilização dessas células. A concentração da substância, a duração do tratamento da superfície e o tempo dado as células para adesão são fatores chave no tipo de *shape* que será observado.

A figura 22 mostra a conformação de eritrócitos de indivíduos normais que foram imobilizados em substrato de vidro, previamente tratado com poly-L-lisine 0,1% por 5 minutos. Uma gota de 50 μL contendo uma suspensão de hemácias foi deixada interagir por 30 minutos

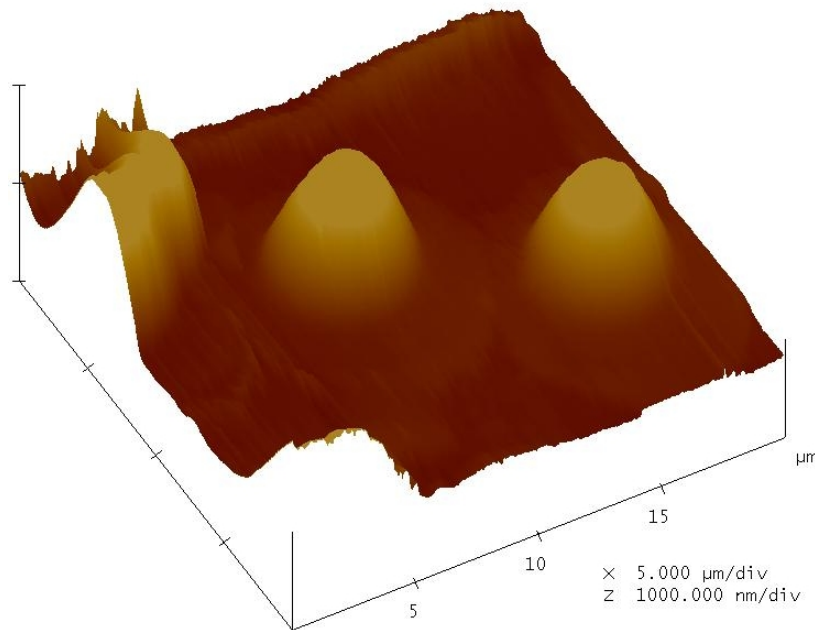


Figura 22: Imagem AFM tridimensional de hemácias em meio líquido com solução PBS + EDTA (0,2 mM) com pH=7,4. A medida foi realizada em modo contato. As membranas das hemácias se apresentam fortemente aderidas ao substrato em virtude do grande tempo de adesão das células com o substrato.

com o substrato modificado.

Outra desvantagem do processo de obtenção de imagens em meio líquido é a diminuição da resolução espacial, que também passa a depender da imobilização das células. Essas dificuldades experimentais limitam o estudo morfológico quantitativo e comparativo das hemácias de doadores sadio e doentes via AFM, uma vez que o *shape* dessas células depende de vários fatores de difícil controle.

2.4 Conceitos de geometria diferencial

Na seção 1.3 apresentamos um conceito intuitivo para a curvatura gaussiana K . Na presente seção, damos uma definição formal para este parâmetro e escrevemos a sua expressão para uma parametrização adequada. Essa expressão é utilizada para a extração da distribuição de curvatura gaussiana a partir das imagens de AFM.

Seja P um ponto da superfície S com orientação N e seja $dN_P : T_P S \rightarrow T_P S$ a diferencial da aplicação vetorial de Gauss, o determinante de dN_P é chamado curvatura Gaussiana K de S em P . A aplicação de Gauss mede o quanto um plano tangente, ou um vetor normal varia nas vizinhanças de P . A matriz que representa a diferencial dN_P é a matriz dos autovalores k_1 e k_2 .

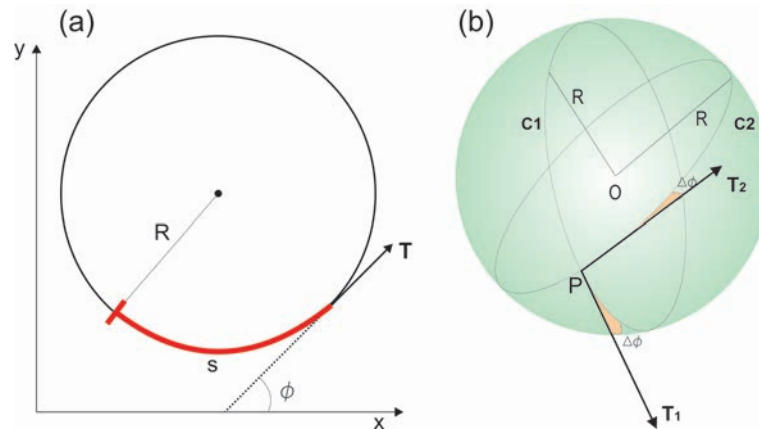


Figura 23: (a) Curvatura de uma curva plana. (b) Curvaturas principais em uma esfera.

Esses autovalores representam as curvaturas principais em duas direções linearmente independentes sobre a superfície (do Carmo, 2008, p. 172). Como os autovalores estão dispostos na diagonal principal dessa matriz, K é dada por:

$$K = k_1 k_2 \quad (2.2)$$

Na seção 1.3 havíamos falado que em um dado ponto sobre uma esfera de raio R o valor de K era igual a $1/R^2$. Demonstraremos rapidamente esse resultado afim de ilustrar a interpretação da curvatura gaussiana em termos das curvaturas principais. Considere um círculo de raio R (fig. 23). Por se tratar de uma curva plana, sua curvatura é dada pela derivada do ângulo ϕ formado pelo vetor tangente \vec{T} e um dos eixos de referência em relação ao comprimento de arco s (eq. 2.3).

$$k = \left| \frac{d\phi}{ds} \right| \quad (2.3)$$

Em coordenadas locais a curvatura k de uma curva plana (Thomas e Finney, 1985, p. 650) é dada por:

$$k = \frac{\left| \frac{d^2y}{dx^2} \right|}{\left[1 + \left(\frac{dy}{dx} \right)^2 \right]^{3/2}} \quad (2.4)$$

No caso de um círculo centrado na origem com raio R ($x^2 + y^2 = R^2$), a curvatura k é dada por:

$$k = \frac{1}{R} \quad (2.5)$$

A figura 23b mostra uma esfera e dois círculos perpendiculares em P , C_1 e C_2 . Os

respectivos vetores tangentes aos círculos no ponto P são \vec{T}_1 e \vec{T}_2 . As direções desses vetores são linearmente independentes e, portanto, são direções principais sobre a superfície esférica. Ao longo de C_1 a curvatura principal k_1 é igual a $1/R$, já que C_1 é um círculo. Da mesma forma, a curvatura principal k_2 ao longo de C_2 é igual $1/R$. Assim, pela eq. 2.2, demonstramos que a curvatura Gaussiana K de uma esfera é o inverso do quadrado de seu raio.

A expressão para K , escrita na forma da eq. 2.2, não está relacionada com as coordenadas locais do ponto P e, como estamos interessados em uma expressão que informe o valor de K em um dado ponto \vec{r} do espaço, devemos reescrevê-la em termos das coordenadas locais (r_x, r_y, r_z) . Para isso, deve-se escolher uma parametrização.

É interessante observar o fato que a curvatura Gaussiana, através das curvaturas principais, concentra em um único número a forma com que a superfície se curva em duas direções independentes.

Quando as imagens de AFM são exportadas, os dados topográficos estão em coordenadas cartesianas. Então a parametrização adequada é do tipo $z = f(x, y)$. Assim, de acordo com do Carmo (2008, p. 193), a expressão para K é dada por:

$$K = \frac{\frac{\partial^2 z}{\partial x^2} \frac{\partial^2 z}{\partial y^2} - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial x \partial y}\right)^2}{\left[1 + \left(\frac{\partial z}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y}\right)^2\right]^2} \quad (2.6)$$

Em um mesma superfície S , K pode apresentar sinais diferentes. No entanto, se em certas regiões de S o sinal de K se mantém constante, é possível associar a forma de S , nessas regiões, com superfícies conhecidas.

Analisando a eq. 2.2 percebe-se que, se $K > 0$ para todos os pontos em uma dada superfície S , as curvaturas principais k_1 e k_2 devem possuir o mesmo sinal. Tais pontos são chamados de elípticos e a forma da região se aproxima de uma superfície esférica.

Quando $K < 0$ para pontos em uma dada região de S , k_1 e k_2 possuem sinais diferentes e a superfície S se curva de forma diferente nas direções principais. Em uma direção ela se afasta do plano tangente, enquanto na outra, ela entra no plano tangente. Regiões como essa se aproximam da forma de um parabolóide hiperbólico e os pontos de S onde isso ocorre, recebem o nome de pontos hiperbólicos.

Se $K = 0$ em um dado ponto de S , existem dois casos: $k_1 = k_2 = 0$ ou somente uma das curvaturas principais é nula. No primeiro caso, a superfície se aproxima de uma superfície conhecida como "sela de macaco". Já no segundo, a superfície se aproxima de um cilindro

parabólico. Uma superfície conhecida que apresenta $K > 0$, $K = 0$ e $K < 0$ em seus pontos é a de um toro ou toróide.

2.5 Materiais e Métodos

Afim de estudarmos a distribuição espacial de curvatura gaussiana dos eritrócitos e a rugosidade da superfície citoplasmática da membrana eritrocitária, foram analisadas amostras de sangue total de 5 indivíduos sadios e 5 indivíduos com a hemoglobinopatia. Os indivíduos não pertenciam necessariamente ao mesmo grupo sanguíneo. Como os grupos sanguíneos se encontram na camada externa da membrana e estamos analisando a parte citoplasmática, portanto interna da membrana, não houve a necessidade de selecionar pacientes com o mesmo fenótipo sanguíneo.

Para as duas análises o sangue fresco de 5 doadores sadios voluntários (grupo controle) foi obtido através de punção digital (figura 24a). Também foram coletadas amostras de sangue em tubos evacuados contendo anticoagulante EDTA de 5 doadores anêmicos, pacientes do Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE). A referida coleta foi autorizada pelo HEMOCE, mediante apresentação da aprovação do comitê de ética desta universidade (ver apêndice A). O sangue foi mantido sob refrigeração e utilizado dentro de um período de 24 horas.

2.5.1 Análise de rugosidade da face citoplasmática da membrana eritrocitária

Para produzir uma suspensão de RBC's, 1 mL de solução tampão fosfatada (PBS) (NaCl; KCl; Na₂PO₄; KH₂PO₄ e pH= 7,4 a 25°C) contendo anticoagulante EDTA 0,2 mM foi colocado em um pequeno tubo, tipo *ependorf* e, em seguida, com o auxílio de um capilar de vidro, um pequeno volume de sangue, aproximadamente, 20 μ L, foi adicionado ao tubo (figura 24b).

As suspensões de RBC's foram centrifugadas a 3000 rpm durante 4 minutos por 3 vezes (figura 24c). Após cada centrifugação, o sobrenadante (figura 24d) era descartado e adicionava-se um volume idêntico da solução de PBS com EDTA 0,2mM afim de manter o volume do *ependorf* constante.

Lamínulas de vidro foram imersas em solução de 0,1% v/v *poly-L-lisine* durante 5 minutos e enxaguadas com água deionizada com condutância de 18 $\Omega.cm^{-1}$. O excesso de água foi removido com papel filtro a partir das extremidades da lamínula. Em seguida, uma

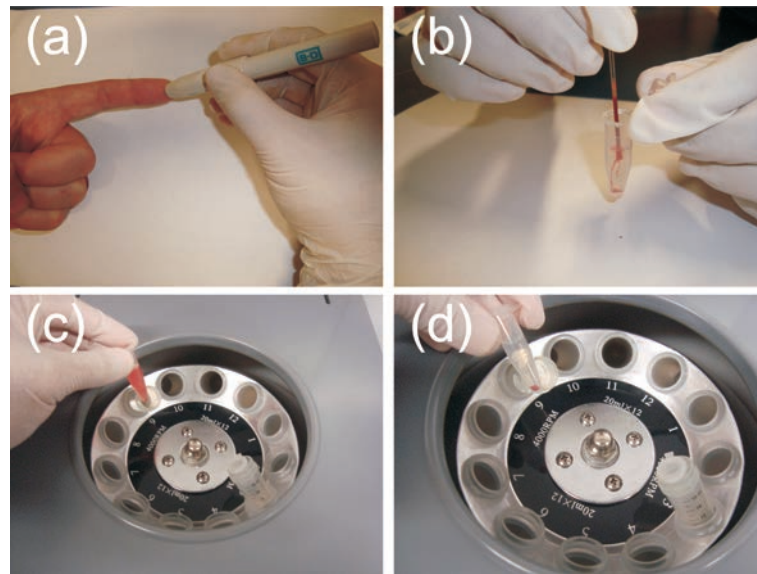


Figura 24: (a) Coleta de sangue por punção digital. (b) Preparação da suspensão e (c) lavagem das células. (d) Concentrado de hemácias centrifugadas.

gota de $50 \mu\text{L}$ da suspensão de RBC's foi depositada sobre a lamínula por 15 min (figura 25a) e, logo após, submetida a um jato de PBS (figura 25b). Como resultado, obtem-se uma lamínula com coloração levemente avermelhada. Esse procedimento produz os *ghost*, fragmentos membranários com a face citoplasmática exposta e aderidos à lamínula de vidro.

Afim de se retirar resquícios de hemoglobina e outros constituintes citoplasmáticos, faz-se necessária a imersão da lamínula em solução de baixa salinidade NaPi 0,3 mM e EDTA 0,2 mM com pH de 7,4 (figura 25c). Finalmente, a lamínula foi retirada e imersa por 35 min em solução de PBS e 4 % de paraformaldeído e, em seguida, enxaguada com solução de baixa salinidade (figura 25d). Novamente o excesso de líquido sobre a lamínula foi retirado com auxílio de papel filtro.

Os fragmentos membranários foram analisados com o microscópio operando no modo contato e em ar, utilizando-se sondas de nitreto de silício NP (Veeco Probes) com constante de mola nominal de $0,06 \text{ N.m}^{-1}$. As análises foram realizadas no período noturno, em temperatura ambiente (25°C) e umidade relativa do ar no intervalo de 45-55%. Durante o período noturno, o tráfego de pessoas e veículos nas instalações acadêmicas diminui e, conseqüentemente, as vibrações mecânicas que podem interferir no cálculo da rugosidade.

Todas as imagens topográficas foram obtidas na mesma frequência de varredura (1,0 Hz) com resolução máxima de 512×512 pixels, exceto aquelas destinadas ao cálculo da rugosidade que, apesar de apresentarem a resolução máxima, foram obtidas em baixa frequência de varredura. Uma vez localizado o *ghost*, a área de varredura é reduzida para uma área de $4 \mu\text{m}^2$

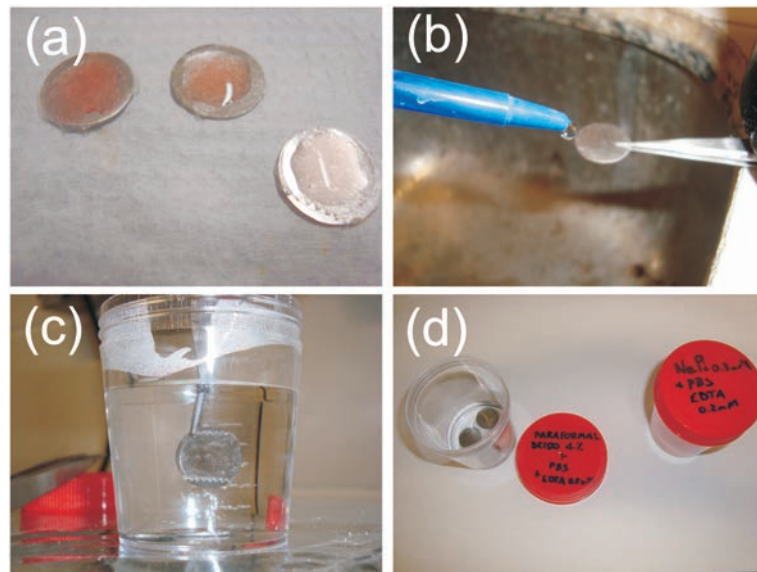


Figura 25: Confeção dos fragmentos membranários. (a) Adesão das hemácias nas lamínulas de vidro modificadas. (b) Jato de solução tampão para romper a parte da membrana não aderida. (c) Imersão em solução de baixa salinidade. (d) Fixação dos fragmentos afim de preservar a sua estrutura.

sobre o mesmo e a imagem é obtida na frequência de 0,5 Hz, afim de diminuir ainda mais a influência de ruídos. A rugosidade média (R_a) (eq. 2.7) foi padronizada nessas áreas e calculada através do software Nanoscope v5.31r1.

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n |Z_j| \quad (2.7)$$

Onde n é o número de *pixels* (pontos) da imagem, cada um deles possuindo uma informação de altura Z_j em relação a uma linha de base calculada pelo software. Assim, é possível comparar a rugosidade média de imagens com a mesma área de varredura e resolução. Para cada doador, sadio ou anêmico, foram analisados cinco fragmentos membranários.

2.5.2 Análise de curvatura dos eritrócitos

As amostras de sangue de doadores sadios foram coletadas por punção digital e depositadas sobre as lamínulas de vidros para a realização do esfregaço. Para este procedimento, utilizou-se uma gota de sangue total de aproximadamente 20 μL e após a rápida secagem do esfregaço, depositou-se sobre o mesmo uma gota de 50 μL de metanol P.A para fixação. O processo de fixação se faz importante, já que as hemácias, fora do seu meio fisiológico, têm seu formato alterado.

Para esta análise, as imagens de AFM foram obtidas no modo *tapping* em condições

ambientais do laboratório com temperatura de 25°C e umidade relativa do ar entre 48-56%. Foram utilizadas sondas de silício cristalino TESP (Veeco Probes) possuindo *cantilevers* com constante de mola nominal de 42 $N.m^{-1}$ e frequências de ressonância entre 235-257 kHz. A varredura foi realizada com frequência de 0,5 Hz, resolução de 512 x 512 pixels em áreas de 15 x 15 μm^2 .

Após a aquisição, as imagens foram tratadas com a ferramenta *flatten* de 1ª ordem do software Nanoscope v5.31r1 afim de corrigir artefatos produzidos pelo *scanner*. Em seguida, as imagens foram exportadas pelo mesmo software em arquivos no formato ASCII. Esses arquivos contém uma matriz M com os dados de altura de cada *pixel* da imagem e possibilitam o acesso e a manipulação desses dados. O tratamento de artefato consiste em corrigir a não-planaridade da varredura, conhecida como *bowl*. Esse tratamento se aplicou somente as imagens utilizadas para a análise de curvatura.

Na caracterização da distribuição de curvatura gaussiana K foi utilizada a eq. 2.6 e uma rotina computacional (ver apêndice B) que utiliza o método numérico de diferenças finitas para diferenciar o arquivo ASCII exportado. A função $Z = f(x,y)$ corresponde ao dado de altura Z_{ij} do pixel na posição M_{ij} da matriz exportada M que corresponde ao par ordenado (x,y) . O passos (DX e DY) adotados no método de diferenças finitas são iguais e dados pela razão entre a medida da lateral da imagem (L) pelo número de pixels por linha que a mesma contém. Em nosso trabalho o passo é dado por $DX = DY = 15000 \text{ nm}/512 \text{ pixels}$ que resulta em um passo de 29,3nm/*pixel*.

O programa foi testado com uma superfície artificial produzida por uma rotina computacional auxiliar (apêndice C). A superfície produzida tem a mesma resolução de uma imagem de AFM, consistindo de 512 x 512 totalizando 262.144 pixels que formam uma superfície plana com um hemisfério de raio $R = 4000 \text{ nm}$ incrustado no centro.

Todas as rotinas foram escritas e executadas em MATLAB R2009a e os dados de curvatura obtidos foram analisados no software Origin Pro 7.5.

2.6 Resultados e discussões

2.6.1 Análise da rugosidade da face citoplasmática da membrana eritrocitária

A figura 26 mostra uma panorâmica dos fragmentos membranários de doadores sadios e com anemia falciforme. O aspecto dos *ghosts* aparanta ser o mesmo para ambos os casos.

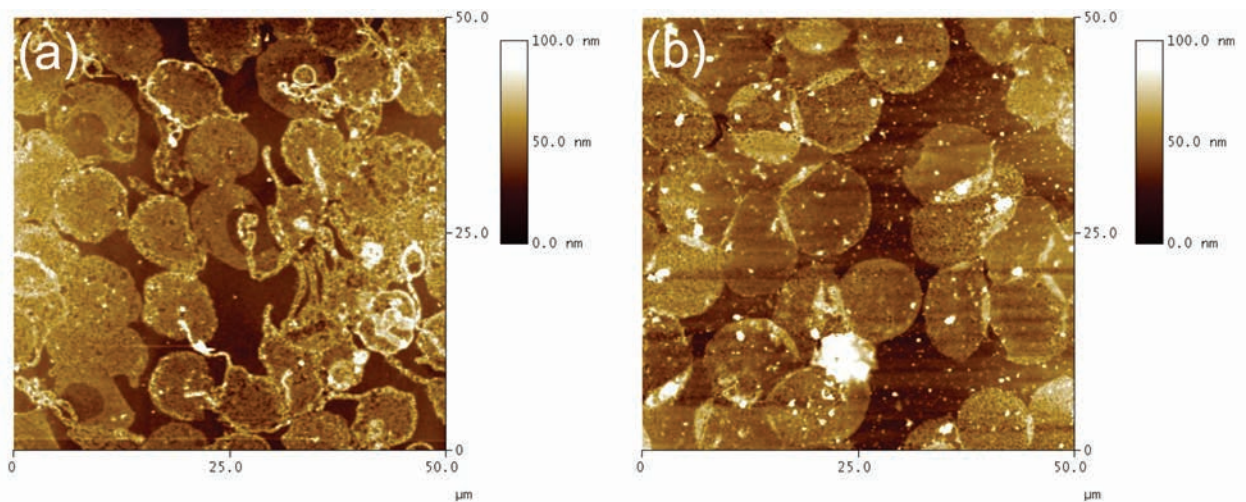


Figura 26: Imagem de AFM ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) indicando a presença de vários fragmentos membrários (*ghosts*) de eritrócitos de um indivíduo (a) sadio e (b) falcêmico.

Observa-se que a metodologia adotada proporciona um número desejável de fragmentos por área. Nas fig. 26a e 26b cerca de 25 *ghost* podem ser visualizados e distinguidos.

A análise de seção transversal de um dos *ghosts* mostra uma boa concordância com a medida de espessura da membrana eritrocitária encontrada na literatura. Na seção 2.1 deste capítulo, o valor informado foi de 20 nm. A seção transversal do *ghost* da imagem de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (canto inferior esquerdo da figura 27) apresenta o valor de 15,441 nm próximo à extremidade do fragmento. O gráfico da análise transversal (parte superior) mostra que, com pequenas exceções, a amplitude dos *pixels* para os demais pontos concentra-se no intervalo de 0-20 nm. A oscilação nesse gráfico é causada pela rugosidade da membrana.

A figura 28 revela a diferença existente entre a superfície do *ghost* eritrocitário de um doador sadio daquela que se observa em um indivíduo que possui a hemoglobinopatia. É visível a existência de grandes buracos em ambos os fragmentos, por isso procuramos diminuir ainda mais o tamanho da área que seria utilizada para a análise de rugosidade.

Na figura 29, a superfície dos fragmentos pode ser visualizada em maior ampliação. A distribuição de alturas em 29a é maior do que em 29b. Isso pode ser observado na variação de contraste das duas figuras. Em (a) a alternância entre pontos claros e pontos escuros é maior do que em (b). Esse resultado já é um indício da diferença de rugosidade entre esses fragmentos.

Os dados da análise de rugosidade de imagens como as da figura 29 encontram-se nas tabelas 2 e 3. A média dos valores de R_a seguida do desvio padrão σ são apresentados no fim da tabela. A representação gráfica destas tabelas encontra-se nos histogramas da figura 30.

A superfície citoplásmatica da membrana eritrocitária de doadores sadios se mostrou

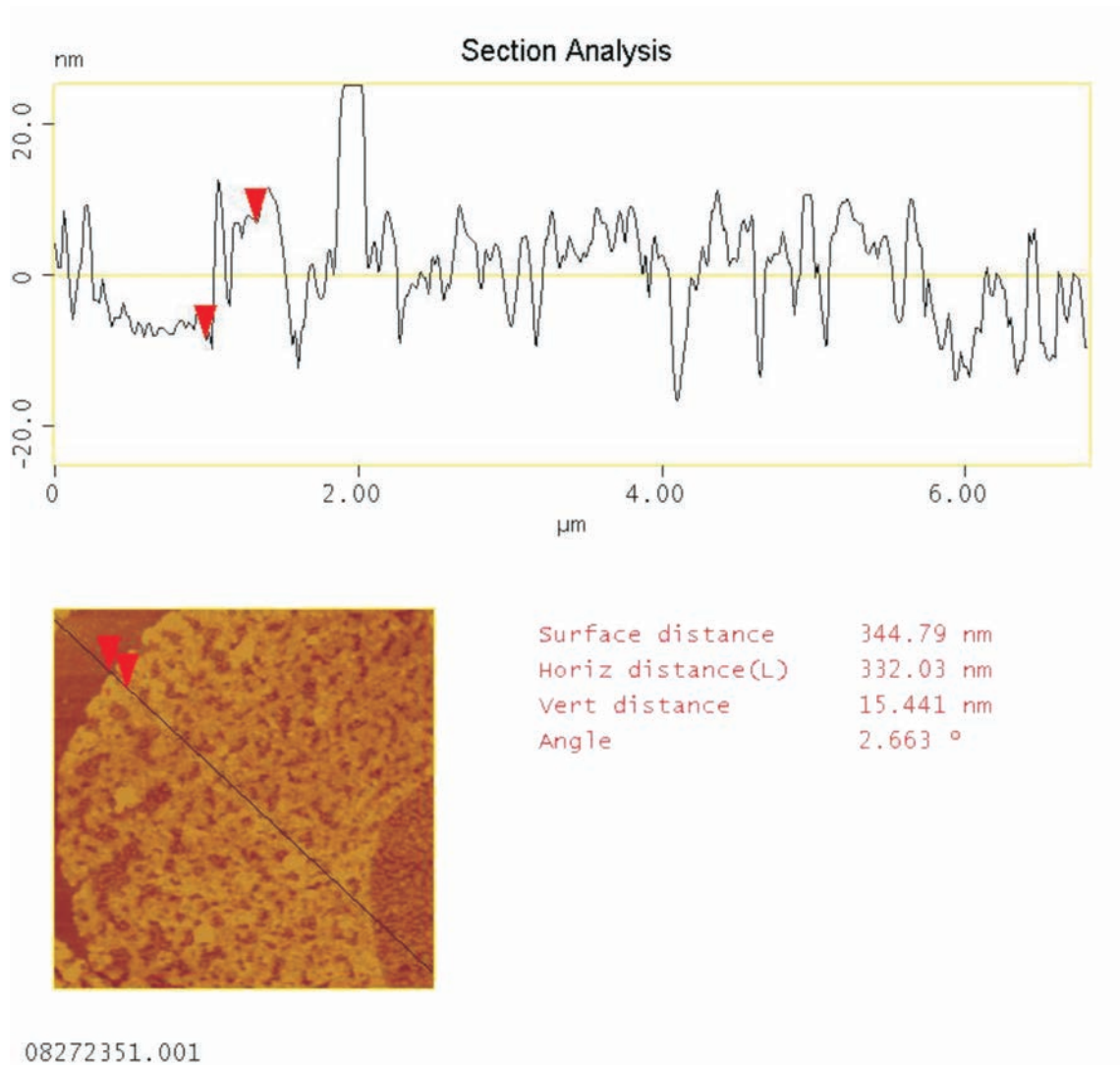


Figura 27: Análise de seção transversal de uma imagem de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) indicando a medida da espessura da membrana próximo à extremidade do fragmento. O gráfico da seção transversal localizado na parte superior indica que a espessura se mantém no intervalo de 0-20 nm para a maioria dos pontos.

Tabela 2: Rugosidade dos *ghost* eritrocitários de doadores sadios

# doador	medida 1 (nm)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	9,343	11,439	9,536	8,384	6,796
2	5,286	5,451	4,138	6,349	5,007
3	4,628	5,967	7,316	5,683	6,111
4	8,144	6,703	8,181	7,023	8,529
5	10,254	8,844	6,642	7,024	6,424
Ra ± σ:	7,157 ± 1,815 nm				

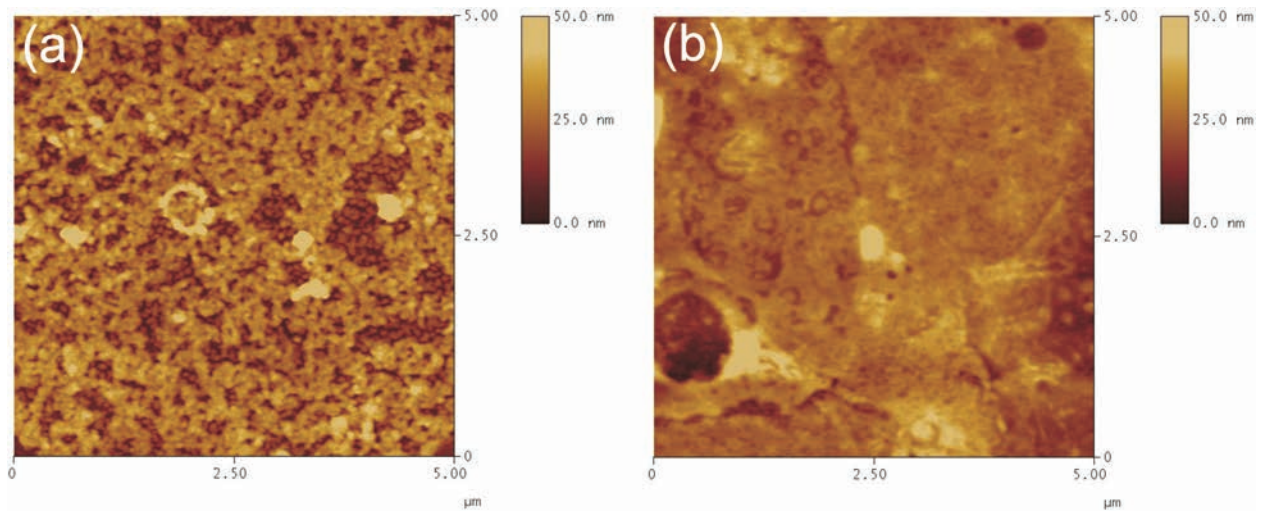


Figura 28: Imagem de AFM com área ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) sobre fragmento membranário de um indivíduo (a) sadio e (b) falcêmico.

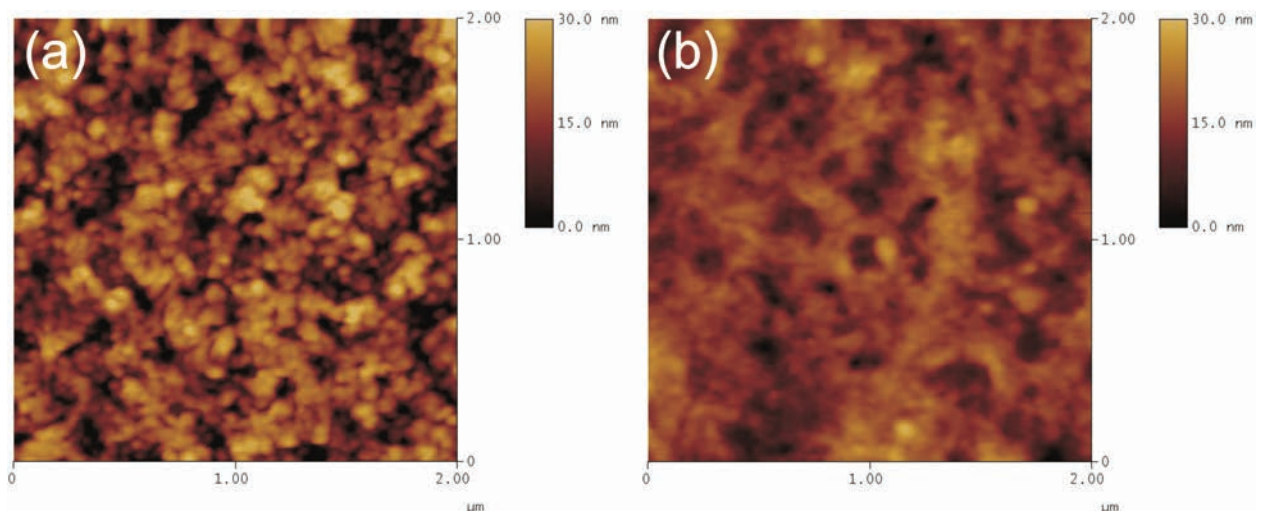


Figura 29: Imagem de AFM de $4 \mu\text{m}^2$ onde a rugosidade é calculada. *Ghost* de um indivíduo (a) sadio e (b) falcêmico.

Tabela 3: Rugosidade dos *ghost* eritrocitários de pacientes com anemia falciforme

# doador	medida 1 (nm)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	3,437	3,558	7,684	4,083	6,093
2	2,443	2,824	3,152	3,300	2,911
3	2,320	5,689	3,697	2,317	2,527
4	4,827	3,611	6,214	3,854	3,023
5	3,086	4,265	7,167	7,662	3,059
$Ra \pm \sigma$:	$4,112 \pm 1,672 \text{ nm}$				

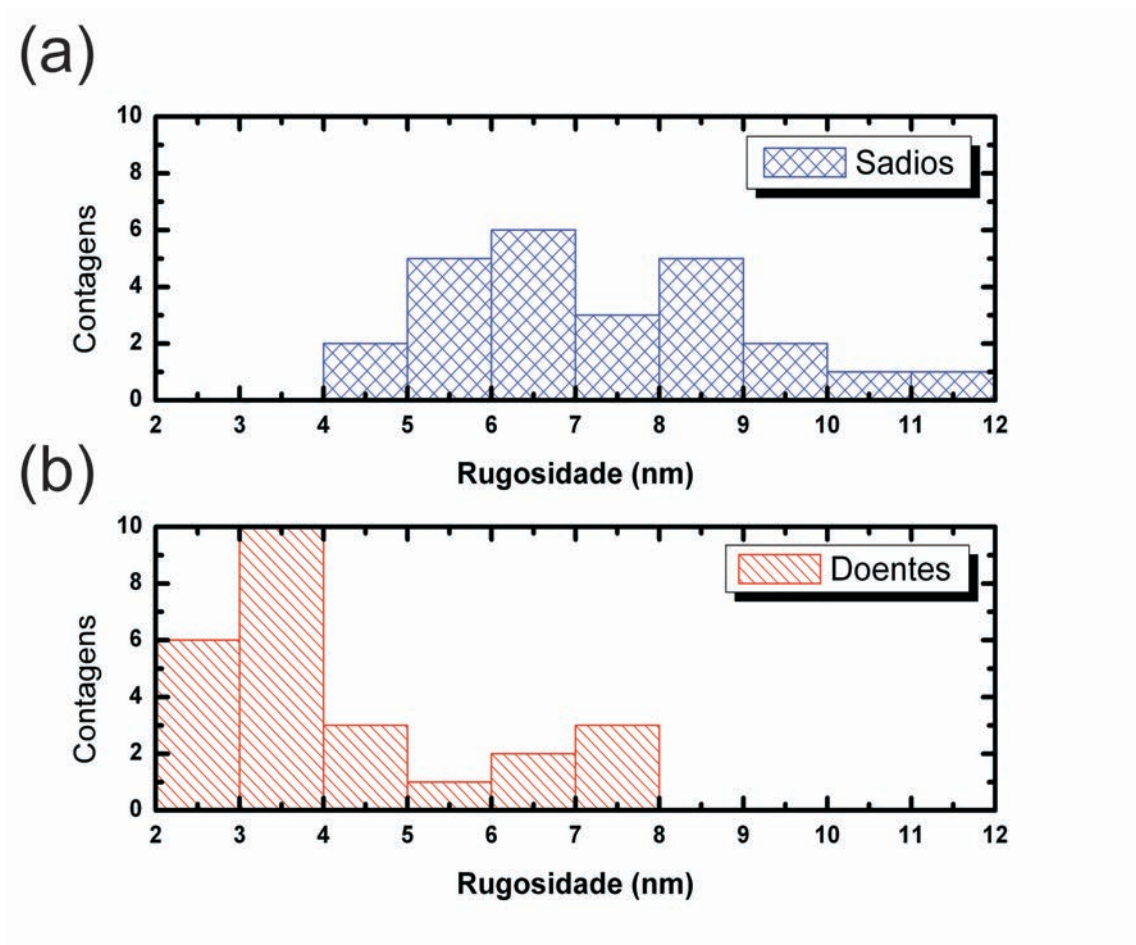


Figura 30: Histograma de distribuição de rugosidade média R_a da face citoplasmática da membrana eritrocitária para os doadores (a) sadios (b) doentes.

mais rugosa do que a de pacientes com anemia falciforme. O aumento da média do parâmetro R_a para os doadores sadios provoca o deslocamento da distribuição de rugosidade. Isso pode ser observado na figura 30a. Dos 25 fragmentos de doadores sadios que foram analisados, 19 fragmentos apresentam rugosidade entre 5-9 nm. Enquanto no mesmo intervalo, o número de fragmentos de doadores doentes que apresentam esses valores é de apenas 7.

A diminuição da rugosidade da membrana de hemácias para os indivíduos com anemia falciforme pode ser explicada pelos inúmeros danos que estas sofrem durante o processo de polimerização da hemoglobina anormal, conforme discutido na seção 1.5 do capítulo 1. Além da oxidação relatada, o desprendimento dos fosfolípidos da bicamada pode ser um dos fatores responsáveis para tal diminuição.

Ambas distribuições apresentaram desvio padrão com valor inferior a média, fato que indica que podemos utilizar a média de R_a como medida de tendência central. No entanto, o desvio padrão encontrado para essas distribuições representam cerca de 25% e 41% da média de R_a para doadores sadios e doentes, respectivamente. Assim, observa-se maior variabilidade ou dispersão na medida da rugosidade média dos *ghosts* de indivíduos com anemia falciforme.

Em parte, a variabilidade da rugosidade na membrana eritrocitária de indivíduos com anemia falciforme pode ser explicada pela presença de células em processos precoces de polimerização de HbS. Isso baseia-se no fato de que hemácias, no início do seu ciclo de atividade, passaram por um número menor de vezes no pulmão e, conseqüentemente, a hemoglobina anormal se polimerizou menos; causando menos danos à membrana. Para a constatação dessa hipótese o espaço amostral de fragmentos e indivíduos a serem analisados deve ser ampliado.

2.6.2 Análise de curvatura dos eritrócitos

O teste do funcionamento do programa com a superfície artificial (fig. 31) resultou na distribuição de curvatura Gaussiana mostrada na figura 32.

Conforme vimos na seção 2.4, a curvatura Gaussiana sobre uma esfera é constante e igual ao inverso do quadrado de seu raio. Assim, a curvatura Gaussiana do hemisfério deve ser de $K = 1/(4000)^2 = 6,25 \cdot 10^{-8} \text{ nm}^2$. O pico encontrado na figura 32 ocorre justamente para esse valor. Isso indica o funcionamento correto do programa. Esperava-se um pico bem mais estreito no valor acima, no entanto verifica-se uma pequena largura, indicando outros valores de curvatura. Isso pode ser explicado pelo fato de que o hemisfério possui uma junção com o plano e nessa região há uma variação abrupta da curvatura.

O leitor deve estar se perguntando pelo pico que deveria aparecer no zero, já que o

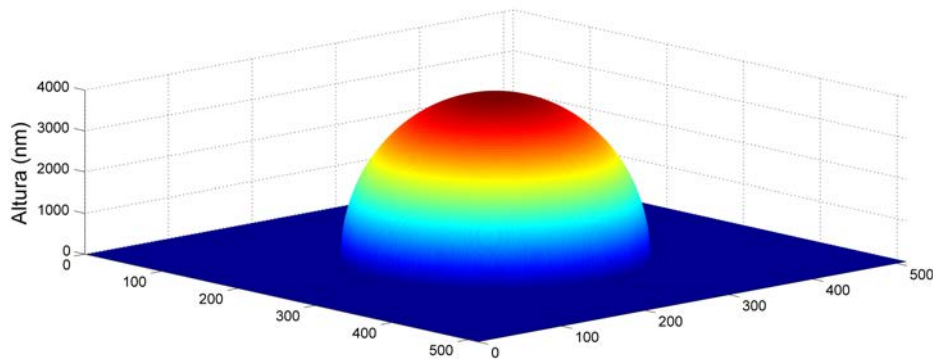


Figura 31: Superfície artificial contendo um hemisfério com raio de 4000 nm.

restante da superfície é plano. De fato, o pico em zero ocorre, mas ele prejudica a visualização do primeiro pico de curvatura. Assim, inserimos no programa uma instrução que onde K é identicamente nulo, atribui-se o valor de 1. Dessa forma afastamos o pico que ocorreria no zero para a posição 1 do eixo. Essa instrução deve ser removida para análise de superfícies reais.

Na figura 33, ilustramos o campo de orientação da superfície de uma hemácia de um paciente sadio. O campo de orientação é um conjunto de vetores normais à superfície. A convenção adotada é que o sentido positivo coincida com a orientação dos vetores normais (segmentos em vermelho), saindo da superfície. O campo de orientação nos dá um idéia de como um vetor normal varia de um ponto a outro da superfície.

A figura 34 mostra uma hemácia com *shape* de célula em alvo. A forma dessa célula se aproxima de um toro. Para essa imagem, o programa fornece a distribuição de curvatura apresentada na figura 35.

Na figura 35, a curvatura Gaussiana foi calculada em todos os pixels da imagem, totalizando 262.144 pixels. Essa distribuição é ligeiramente deslocada para valores de K negativos. O pico de maior contagem está centrado em $K = -2,74 \cdot 10^{-6} \text{ nm}^{-2}$.

Por se tratar de uma superfície semelhante a de um toróide, são admissíveis valores positivos, nulos e negativos para K . Se a semelhança fosse muito grande, deveriam existir somente três picos. Um pico para K assumindo um valor constante e positivo, outro para um valor nulo e, finalmente, um pico correspondente a um valor negativo. Isso não ocorre devido a vários motivos. Um deles é a rugosidade que tanto o substrato, quanto a superfície da célula apresentam. Variações abruptas produzem grandes saltos no valor de K , acompanhados de mudança de sinal.

Comparando o módulo da curvatura no pico central da fig. 34 com aquele obtido para

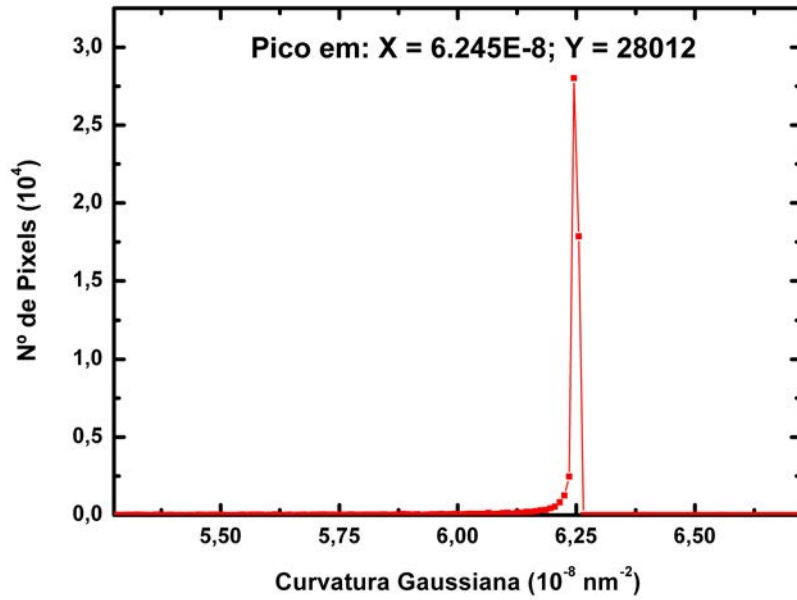


Figura 32: Distribuição de curvatura Gaussiana para uma superfície artificial contendo um hemisfério com raio de 4000 nm.

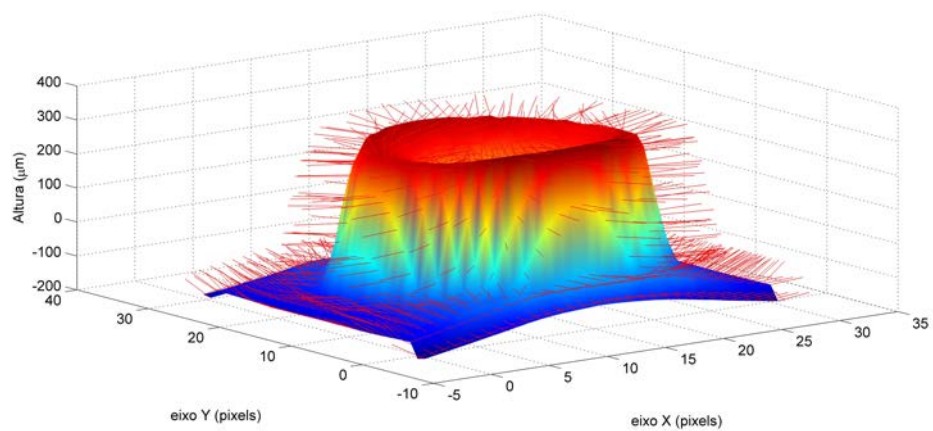


Figura 33: Campo de orientação de uma hemácia. Os segmentos em vermelho são vetores unitários normais à superfície eritrocitária.

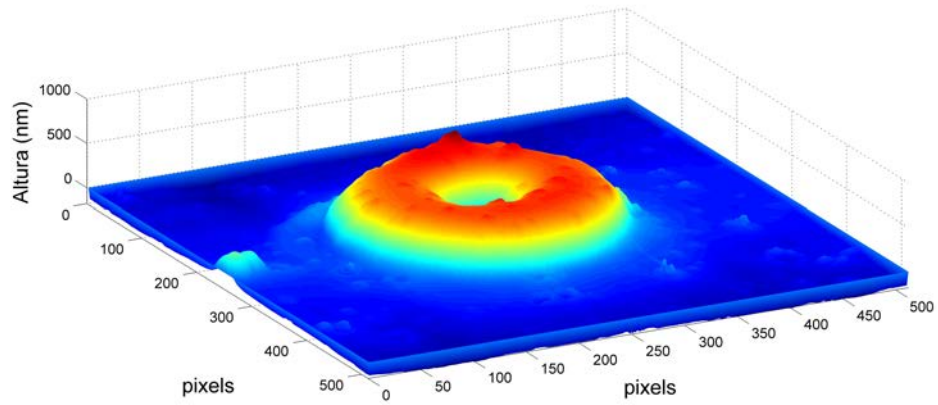


Figura 34: Imagem tridimensional obtida por AFM de uma hemácia com *shape* em um formato semelhante ao de um toróide.

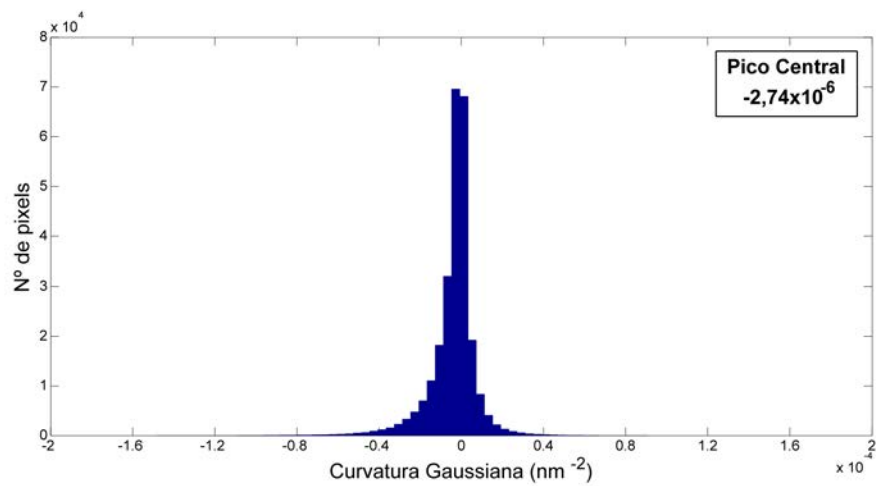


Figura 35: Distribuição de curvatura Gaussiana para a hemácia da fig. 34

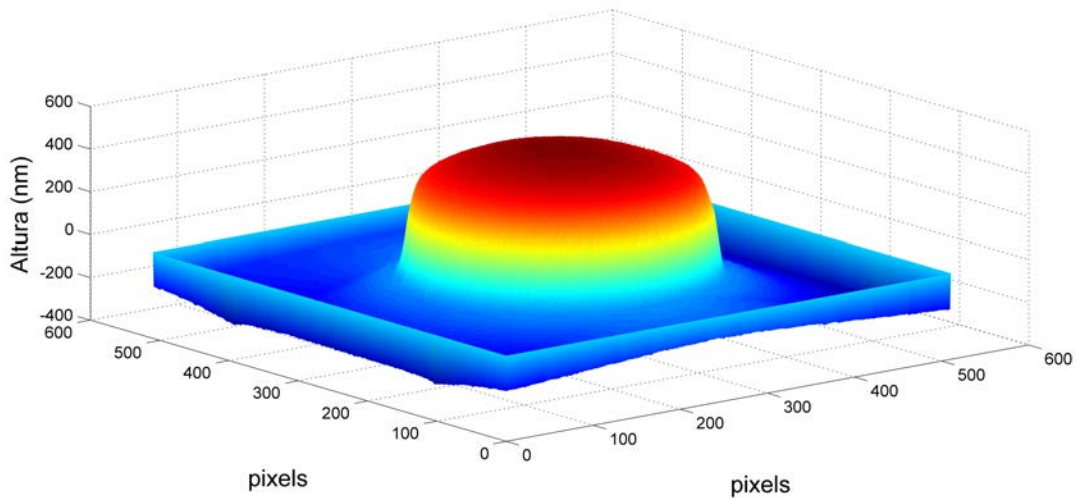


Figura 36: Imagem de uma hemácia com *shape* achatado devido à caracterização em ar, sem fixação prévia.

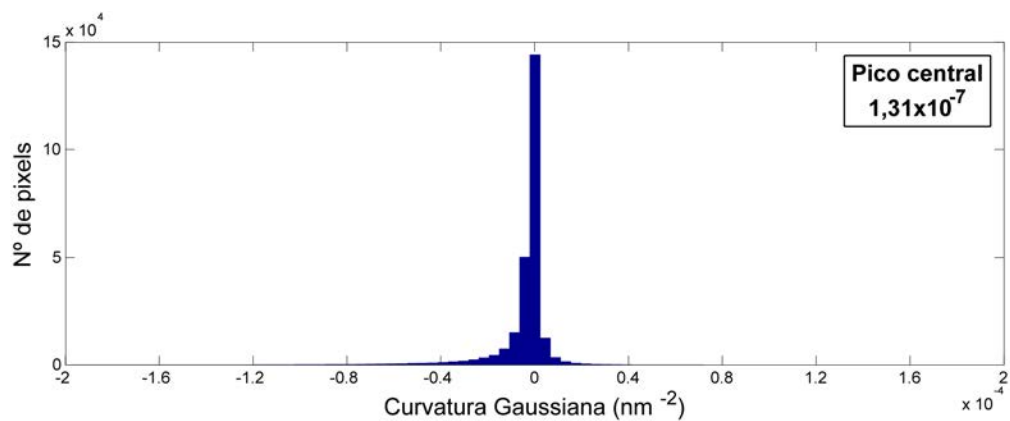


Figura 37: Distribuição de curvatura Gaussiana para uma hemácia apresentando achatamento.

a esfera, percebe-se que a curvatura da esfera é menor, cerca de duas ordens de grandeza. De fato, percebe-se na fig. 34 que a invaginação central contribui para aumentar a distorção da superfície da hemácia.

Na figura 36 mostra-se uma hemácia que foi caracterizada em ar, sem fixação. Seu *shape* achatado juntamente com o resto do substrato produz a distribuição de curvatura Gaussiana encontrada na figura 37.

Nessa segunda distribuição, o pico centra-se no valor de $K = 1,31 \cdot 10^{-7}$. Como era de se esperar, o achatamento produziu uma diminuição do módulo de K em uma ordem de grandeza. À esquerda do pico, existem grandes contagens de curvaturas Gaussianas negativas. Para explicar esse fato, novamente recorre-se a hipótese da influência da rugosidade do substrato, haja vista que boa parte dos pixels da imagem estão contidos nele.

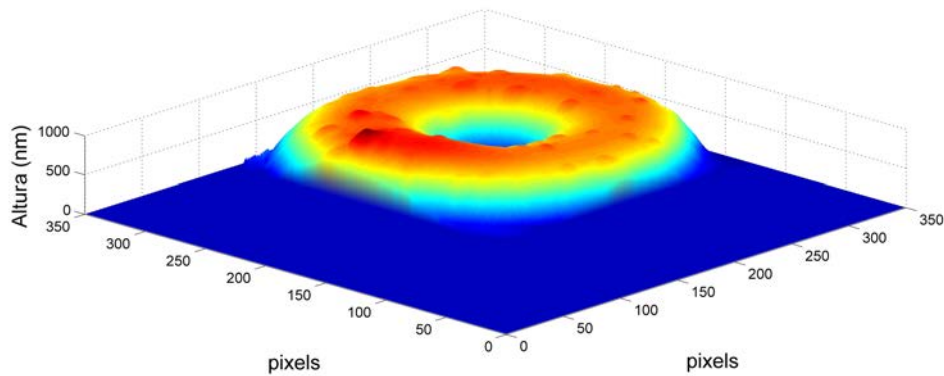


Figura 38: Imagem da mesma hemácia contida na fig. 34 após a redução do número de pixels.

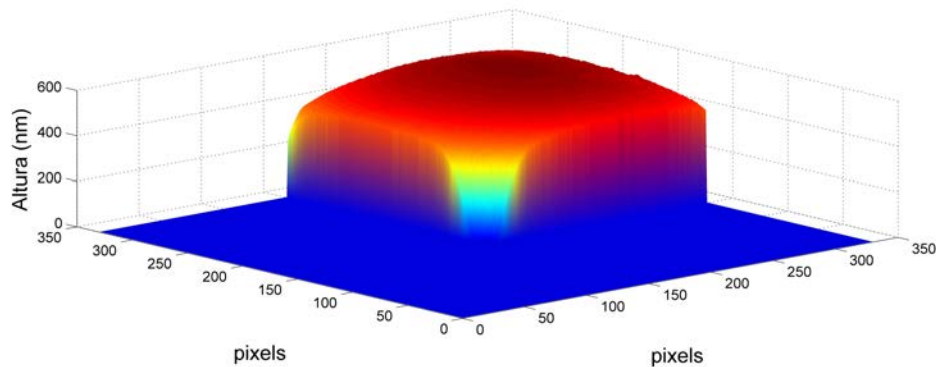


Figura 39: Imagem de parte da hemácia achatada vista na fig. 36 após a redução do número de pixels.

Na tentativa de contornar esse problema, diminuimos a área de análise e, consequentemente, o número de pixels. As figuras 38 e 39, possuem 45.500 e 22.500 pixels, respectivamente. As respectivas distribuições de curvatura Gaussiana são apresentadas nos histogramas das figuras 40 e 41.

Com a redução da quantidade de pixels, as novas distribuições estão centradas nos valores $2,03 \cdot 10^{-7}$ e $3,11 \cdot 10^{-10}$, para a hemácia em forma de toro e na forma achatada, respectivamente. Para a hemácia semelhante ao toro há uma diminuição, em módulo, do valor central da distribuição de curvatura Gaussiana acompanhada de uma inversão de sinal. Já para o outro caso, o da hemácia achatada, observa-se uma diminuição do valor em cerca de 3 ordens de grandeza.

Esses fatos demonstram a heterogeneidade da superfície mesmo em escalas reduzidas, sugerindo que existam diferenças bruscas nos valores de curvatura gaussiana entre pixels vizinhos. A falta de suavidade na distribuição dessas curvaturas pode estar associada ao passo utilizado no método de diferenças finitas. Na seção 2.5, dissemos que o passo é dado pela razão entre a medida da lateral da imagem (L) e o número de pixels em uma dada linha. Como a maior

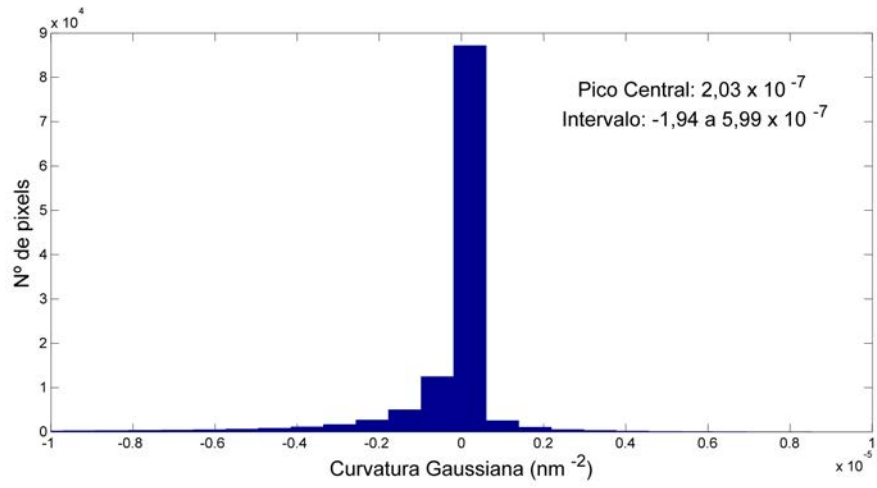


Figura 40: Distribuição de K para a imagem da fig. 38.

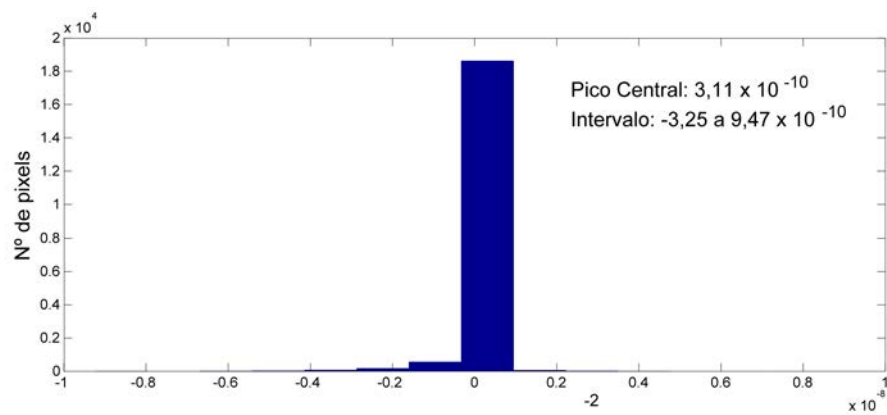


Figura 41: Distribuição de K para a imagem da fig. 39.

resolução encontrada em nosso equipamento é de 512 pixels por linha, para uma dada lateral L , a nossa análise de curvatura fica limitada, e por isso não conseguimos passos menores. Isso resulta na dificuldade em se obter uma distribuição mais suave da curvatura sobre as superfícies analisadas.

No entanto, demonstramos que o programa funciona e que, dada uma superfície suave, como a do hemisfério, é possível calcular a distribuição de curvatura das mesmas. Esperamos que estudos posteriores envolvendo imagens de AFM em maior resolução possam ser utilizadas para atestar a eficácia do programa.

2.7 Conclusões

O estudo morfológico de hemácias é de grande importância para a obtenção de informações sobre o impacto que patologias, como a anemia falciforme, exercem na estruturas dessas células. Nesse contexto, a Microscopia de Força Atômica tem grande potencial de contribuição.

Além das alterações morfológicas das hemácias que podem ser visualizadas nas imagens produzidas por AFM, propomos a manipulação dos dados contidos nos *pixels* dessas imagens para se obter um número ou um conjunto deles afim de descrever quantitativamente o *shape* dessas células. A rotina computacional que propomos é de baixo esforço computacional e pode ser facilmente adaptada para analisar imagens produzidas em diferentes tipos de microscópio de força atômica. Além de mais estudos sobre geometria diferencial, interpretação e exibição dos dados é necessário o aumento da resolução dessas imagens, afim de suavizar a distribuição de curvatura.

Nesse capítulo, vimos que a rugosidade da face citoplasmática da membrana de indivíduos com a hemoglobinopatia estrutural S, causa da anemia falciforme, é menor do que aquela encontrada na membrana de doadores saudáveis. A hipótese da variabilidade da rugosidade sobre a membrana de hemácias em pacientes com a doença, bem como a da perda de fosfolipídios, deve ser testada para um espaço amostral maior. Se for confirmada, a rugosidade da face citoplasmática pode contribuir como mais um parâmetro na investigação laboratorial dessa doença e avaliar a eficácia do tratamento com quimioterápicos.

3 ESTUDOS DE VISCOELASTICIDADE DE ERITRÓCITOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Neste capítulo, investigam-se as propriedades viscoelásticas de eritrócitos de doadores saudáveis e de pacientes com anemia falciforme, utilizando-se a abordagem *single cell*, na qual a célula é analisada como um todo. Inicialmente, fazemos algumas considerações sobre o modelo elástico de Hertz e a obtenção das curvas de força por indentação via AFM. Também apresentamos duas formas de se extrair propriedades viscosas a partir dessas curvas. Em seguida, propõe-se uma metodologia para modificação da geometria das *tips* de AFM e, finalmente, apresentam-se as curvas de forças obtidas sobre os eritrócitos e as propriedades mecânicas observadas.

3.1 Curvas de Força vs Indentação e algumas considerações sobre o modelo de Hertz

As propriedades mecânicas a serem investigadas neste capítulo já foram definidas e discutidas nas seções 1.3 e 1.4 do capítulo 1. Vimos que no processo de extração dessas propriedades é necessária a utilização de um modelo do contato, como o de Hertz, por exemplo.

Segundo dos Santos (2010, p. 31), o modelo de Hertz adota as seguintes premissas:

- Os materiais que compõem os corpos em contato são isotrópicos e homogêneos;
- A força aplicada é estática;
- O material é linearmente elástico, obedecendo a lei de Hooke;
- O raio de curvatura dos corpos em contato é muito grande comparado ao de contato, considerando, portanto, que o contato se dá em pequenas regiões ou que a espessura do material seja semi-infinita;

- Não há atrito entre as superfícies em contato;
- Regime de pequenas deformações.

e daí podemos concluir que existem algumas limitações na aplicação desse modelo ao estudo de corpos não-homogêneos, não-isotrópicos e com espessura finita, como as células. No entanto, é possível obter as propriedades mecânicas aparentes desses tipos de materiais através de pequenas indentações, numa tentativa de adaptar o experimento às premissas de Hertz. Para uma maior discussão a respeito do modelo de Hertz, recomendamos o trabalho de dos Santos (2010).

Para a presente discussão, nos limitamos à afirmar que, atendidas as condições de aproximação mencionadas, a eq. 1.7 pode ser utilizada para a realização de um *fitting* com a curva experimental de força *versus* indentação obtida, afim de se extrair o módulo de Young E aparente de células.

No entanto, vimos na figura 8 da seção 1.4 que o microscópio de força atômica obtém uma curva de deflexão *versus* posição relativa *tip*-amostra. Para que consigamos a curva desejada (F vs δ) devemos, inicialmente, multiplicar os valores de deflexão do *cantilever* (eixo vertical) pelo valor de sua constante de mola, atentando para as respectivas unidades. Geralmente, as forças obtidas são expressas em nN.

Para se obter os valores de indentação do eixo horizontal deve-se recorrer a uma curva de calibração de força que é obtida sobre um substrato rígido (Bremmel et al., 2006; Klymenko et al., 2009). A figura 42 nos mostra uma curva desse tipo.

O leitor deve estar se perguntando por que não há um evento de adesão como encontrado na figura 8 da seção 1.4. O motivo é simples, a curva de calibração apresentada na figura 42 foi obtida em meio líquido e, por isso, as forças de capilaridade são atenuadas (Rebelo, 2007, p. 15). Deve-se ressaltar que a curva de calibração de força deve ser tomada nas mesmas condições em que as curvas de força sobre as amostras serão obtidas.

Analisando a figura 42, percebemos que a curva de calibração de força é, praticamente, caracterizada por duas inclinações constantes. A primeira inclinação é nula e caracteriza o primeiro trecho retilíneo da curva. No ponto correspondente à abscissa 550 nm, inicia-se o segundo trecho retilíneo com a segunda inclinação. Tal ponto, onde há uma variação brusca na inclinação da curva, é denominado ponto de contato e o segundo trecho recebe o nome de região do contato. A segunda inclinação é igual à unidade, já que, no segundo trecho, essa curva recebe incrementos de força iguais aos incrementos de posição (deslocamentos), tal que a razão entre ambos é 1. Isso só ocorre devido à alta rigidez do substrato comparada a do *cantilever*.

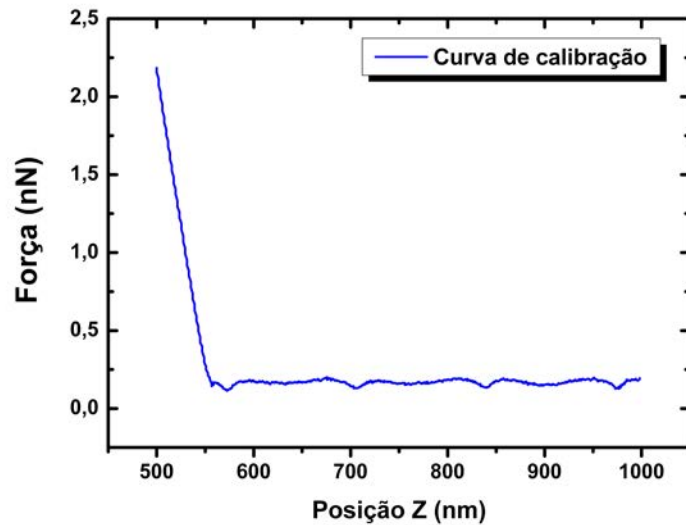


Figura 42: Curva de força obtida via AFM em um substrato rígido. A curva acima resultou de uma indentação em meio líquido de uma lamínula de vidro. A curva de extensão e retração coincidem e não é observada adesão significativa já que a curva foi obtida em meio líquido.

Assim, a curva de calibração de força só registra a deformação do cantilever a partir do ponto de contato.

Quando registramos uma curva de força sobre uma amostra deformável (figura 43), como uma célula, por exemplo, o segundo trecho da curva de força não apresenta o mesmo comportamento linear encontrado na figura 42. A inclinação passa a variar ponto a ponto na região do contato em virtude da deformação dos dois corpos; célula e *cantilever*.

Na figura 43 percebemos que a curva de força obtida sobre o corpo deformável tem um ponto de contato diferente daquele encontrado na curva de calibração. Obviamente isso ocorre pela presença do corpo deformável, mais especificamente, devido a sua altura (espessura). Se o referido corpo não estivesse ali (espessura nula), a *tip* e o *cantilever* seguiriam seu trajeto livremente até encontrar o substrato de vidro na posição 550 nm.

Transladando-se a curva de calibração na direção do eixo horizontal até o ponto de contato da curva sobre o corpo deformável e produzindo-se um gráfico de deflexão contra posição relativa, obtemos uma disposição para as curvas como a que mostramos na figura 44:

O leitor deve atentar que, para uma mesma abscissa Z , a diferença de deflexão entre as duas curvas é a indentação δ (Radmacher, 2002, p. 67). Para entender isso basta lembrar que quando a sonda se aproximava do substrato rígido (curva azul) só havia a deformação do *cantilever*. Agora, com a sonda se aproximando do corpo deformável (curva vermelha), parte

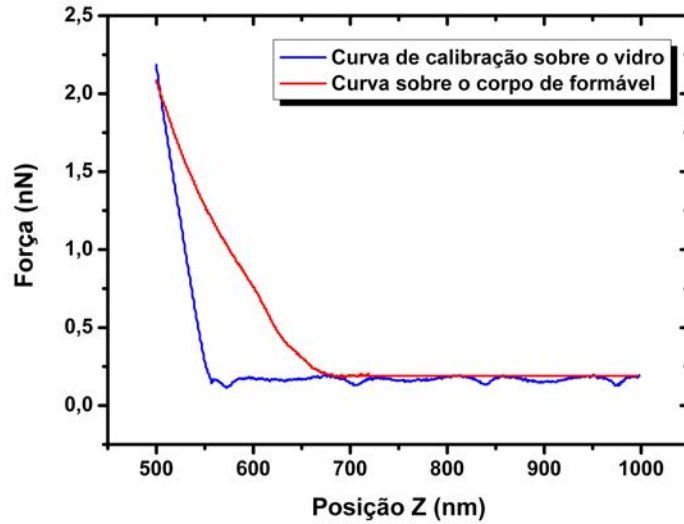


Figura 43: Curvas de força obtidas via AFM. Comparação entre o ponto de contato da curvas de calibração (em azul) e a curva sobre um corpo deformável (em vermelho).

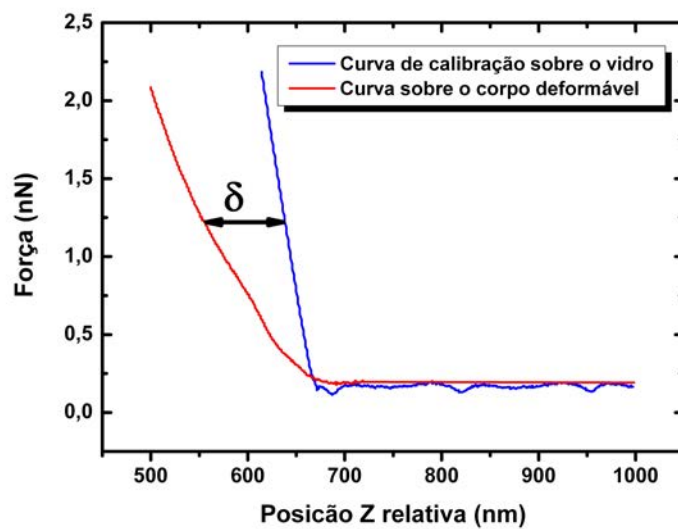


Figura 44: Disposição das curvas de força após a detecção do ponto de contato.

da deformação que era exclusiva do cantilever passa a ser dividida com o corpo (curva vermelha). Alternativamente, a indentação pode ser obtida a partir da diferença entre as abscissas daqueles pontos que apresentam a mesma deflexão (fig. 44) (Klymenko et al., 2009). Em ambos os casos a relação entre posição Z e a indentação δ pode ser escrita como na eq. 3.1.

$$\delta = (Z - Z_0) - (d - d_0) \quad (3.1)$$

onde (Z_0, d_0) são as coordenadas do ponto de contato. Através dessa equação transformamos a curva obtida via AFM em uma curva de força por indentação. Deve ficar claro, portanto, que o ponto de contato é um importante parâmetro para a obtenção dessa curva.

3.2 Obtenção de parâmetros viscosos a partir de curvas de força vs indentação obtidas por AFM

Na seção 1.4, definimos o tempo de resposta ou de relaxação de materiais viscosos (τ). Segundo Gillies et al. (2002), esse parâmetro pode ser extraído a partir de curvas de força obtidas por AFM. Esses autores utilizaram o modelo de Attard (2001) que desconsidera a adesão entre indentador e amostra durante o processo de deformação. Para a utilização deste modelo, além do conhecimento do ponto de contato, é necessário que se conheçam propriedades geralmente de difícil medição, tais como o potencial elétrico das superfícies, comprimento de Debye e outras propriedades elétricas do meio onde ocorre a indentação. O ponto de contato é função dessas propriedades e, portanto, muitas vezes é inviável a adoção desse modelo. Bremmel (2006) utiliza o modelo de Attard para estimar τ de hemácias em meio líquido, nesse caso, a solução de PBS. A expressão utilizada para o *fit* da curva de força é dada por:

$$F(t) = 2\pi R \kappa^{-1} P e^{-\kappa[z(t) + \delta(t)]} \quad (3.2)$$

e a indentação prevista pelo modelo é dada pela eq. 3.3

$$\delta(t) = A \left[e^{-\kappa vt} - e^{-t/\tau} \right] \quad (3.3)$$

onde a constante A é dada por:

$$A = \frac{\kappa v E_0^{-1} - E_\infty^{-1}}{1 - \kappa v \tau} \sqrt{\frac{8\pi R P^2}{\kappa}} e^{-\kappa z_0} \quad (3.4)$$

Os parâmetros κ^{-1} e P são determinados pelas propriedades elétricas mencionadas. Bremmel et al. (2006) adotou para solução de PBS o comprimento de Debye (κ^{-1}) igual a 0,75 nm. No entanto, este autor não entrou em detalhes a respeito do valor de P . O valor adotado por Attard (2001) em suas simulações foi de $10^7 N.m^{-2}$.

Outra característica de sistemas viscoelásticos é a histerese encontrada em curvas de força, entre a extensão e a retração (Bremmel et al., 2006). A medida da área da histerese é numericamente igual à energia dissipada durante a indentação e representa uma forma quantitativa, embora indireta, para caracterizar a viscosidade dos corpos (Gillies et al., 2002). Ela pode ser utilizada como uma alternativa ao complicado modelo de Attard.

Quanto maior a viscosidade do corpo indentado, menor a histerese, ou seja, menor energia dissipada e o corpo se comporta mais como um sólido. De acordo com Bremmel et al. (2006), a variação da histerese com a frequência do processo de indentação é outra característica dos sistemas viscoelásticos.

Rebello et al. (2011) utilizam um método direto para extrair a viscosidade de células epiteliais renais cancerígenas. Esses autores realizam um cálculo que leva em conta a energia dissipada durante a indentação destas células. A geometria utilizada para o indentador foi a cônica. O mesmo método pode ser aplicado considerando a geometria esférica do indentador. A expressão resultante é descrita pela eq. 3.5:

$$\Delta W_v = \pi v \eta R \left[(\delta_2 - \delta_1)^{APP} - (\delta_2 - \delta_1)^{RET} \right] \quad (3.5)$$

onde v é a velocidade em que se dá o processo de indentação, R é o raio do indentador, δ_1 e δ_2 são as abscissas da curva de força por indentação que delimitam a região da histerese. Os índices APP e RET são para designar, respectivamente, a diferença entre as abscissas da curva de extensão e da curva de retração. O trabalho realizado pelas forças viscosas (ΔW_v) é igual à energia dissipada (área da histerese) que pode ser obtida experimentalmente. Assim, a viscosidade η pode ser diretamente obtida da equação acima.

3.3 Modificação da geometria de *tips* de AFM

No capítulo 1, foi discutido que o modelo de Hertz adota originalmente a geometria esférica para o indentador. No entanto, as sondas de AFM comercializadas apresentam *tips* em formato piramidal, como mostramos na figura 5. *A priori*, isso não se torna uma dificuldade para a aplicação do modelo de Hertz na análise de curvas de força obtidas via AFM, já que Sneddon (1965) apud Jena e Hoyer (2002) generalizou o modelo de Hertz para outras geometrias de indentação, como cônicas e piramidais.

Visando o estudo de propriedades mecânicas na perspectiva *single-cell*, é necessário utilizar um indentador grande o suficiente para indentar uma boa parte da célula. Para isso procedemos à fixação de *beads* às *tips*. As *beads* são microesferas que podem ser obtidas a partir de diversos materiais poliméricos, bem como de sílica.

De forma objetiva, podemos dizer que iremos modificar a geometria da *tip* de nossas sondas de AFM, fazendo com que elas deixem de ser piramidais para se tornarem esféricas. Assim, adotaremos o modelo original de Hertz em nossas análises.

Na literatura técnica e científica, existem algumas metodologias para a fixação de *beads*, no entanto, elas requerem alguns materiais e equipamentos mais sofisticados, tais como colas de cura em ultra-violeta e nanomanipuladores (Ducker e Senden, 1992; Rice, 2001). Para este trabalho, procuramos desenvolver uma metodologia mais simples, com cola comercialmente disponível em nosso país e que utiliza o próprio microscópio de força atômica como nano-manipulador.

3.4 Materiais e Métodos

3.4.1 Caracterização e Fixação de *beads*

Uma alíquota de dispersão coloidal de partículas esféricas de sílica ou *beads* (Bangs Laboratories, Inc) com diâmetro nominal de 4 μm foi diluída em água deionizada, resultando em uma suspensão com concentração de 1%. Uma gota de 10 μL dessa suspensão foi depositada sobre uma lamínula de vidro e deixada secar a temperatura ambiente. Em seguida, utilizando-se um capilar de vidro, uma pequena gota de cola epóxi tipo Araldite[®] foi espalhada em uma região próxima daquela onde as *beads* foram depositadas. Esse procedimento tem por finalidade produzir um filme bem fino de cola cuja interface esteja bem próxima da região da lamínula contendo as *beads*, de forma que o deslocamento da *tip* entre essas duas regiões seja

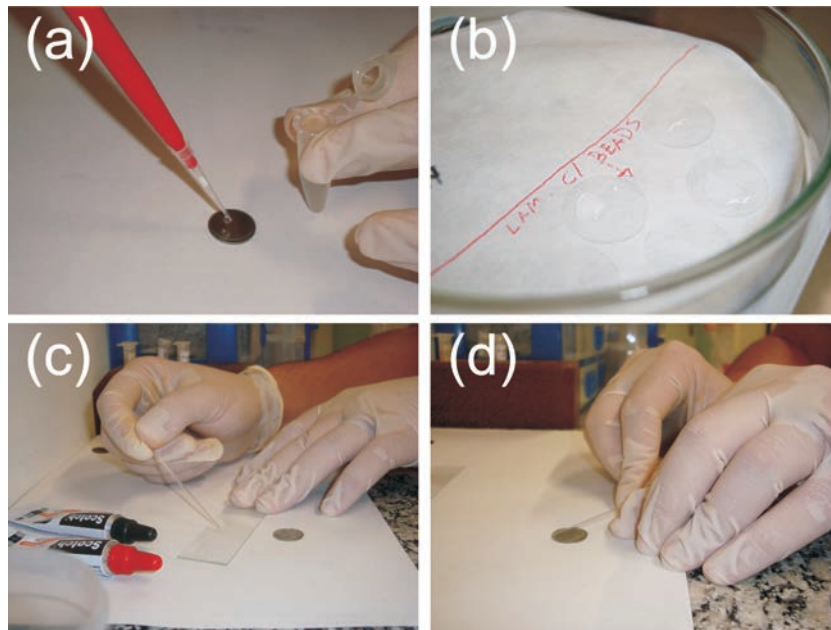


Figura 45: Metodologia para fixação de microsferas de sílica a *tips* de AFM. (a) Deposição por gota da solução diluída de microsferas sobre uma lamínula de vidro. (b) Secagem das lamínulas ao ar. (c) Preparação do adesivo epóxi sobre a lamínula contendo as *beads*. (d) Raspagem do excesso de adesivo com um capilar de vidro.

mais breve, evitando que a cola seque, antes que a bead seja aderida à *tip*.

Para o processo de fixação, foram utilizadas sondas com cantilever de nitreto de silício OTR-4 (Veeco probes), com constante de mola nominal de $0,02 \text{ N.m}^{-1}$

As *beads*, bem como as *tips* modificadas, foram conduzidas ao microscópio eletrônico de varredura afim de se analisar o real diâmetro dessas micro-esferas e a fixação das mesmas. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico Philips XL 30 utilizando-se um feixe de 20kV. Para se analisar o diâmetro médio das *beads*, foram preparadas 4 lamínulas conforme metodologia descrita acima, excetuando-se a adição da cola. De cada lamínula, analisou-se os diâmetros de 6 micro-esferas ao longo das direções horizontal (X) e vertical (Y). Tais medidas foram obtidas em um aumento real de 1000X, utilizando-se o software do equipamento.

3.4.2 Obtenção de curvas de força

Para essa análise, o sangue fresco de 5 doadores saudáveis voluntários (grupo controle) foi obtido através de punção digital. Também foram coletadas amostras de sangue em tubos evacuados contendo anticoagulante EDTA de 5 doadores anêmicos, pacientes do Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE). O sangue foi mantido sob refrigeração e utilizado dentro de um período de 24 horas. Cinco hemácias de cada um dos indivíduos foram analisadas.

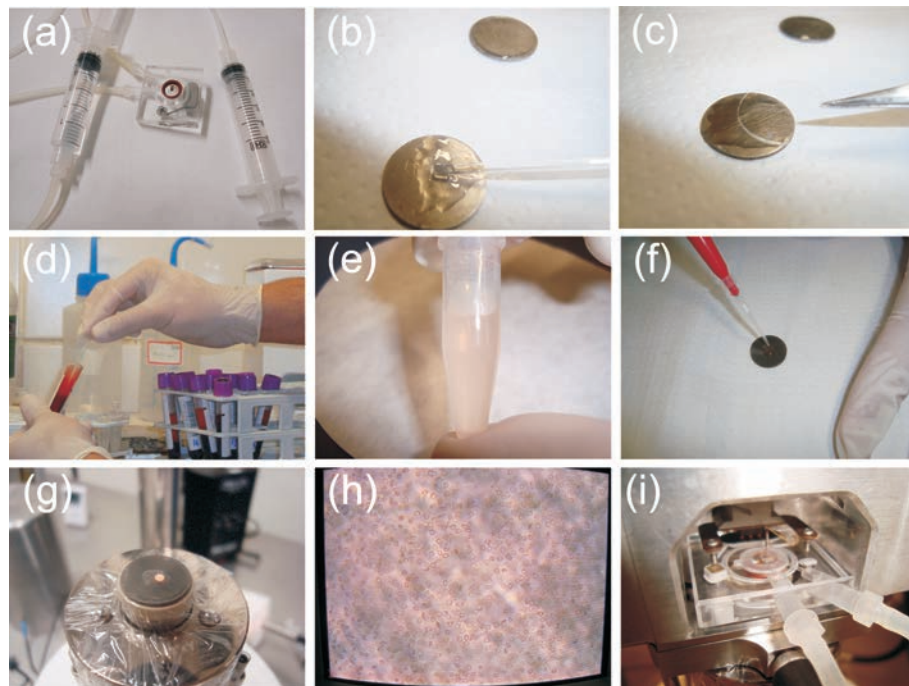


Figura 46: Metodologia para a obtenção de curvas de força em meio líquido. (a) Preenchimento da célula líquida com solução tamponada. (b) e (c) Fixação da lamínula de vidro ao porta-amostra com adesivo epóxi. (d) Extração de alíquota de sangue total. (e) Diluição da alíquota. (f) Deposição de uma gota da suspensão de hemácias sobre o vidro. (g) Posicionamento no microscópio. (h) Visualização das células em suspensão na gota. (i) Posicionamento da célula líquida sobre a gota.

A célula líquida (fig. 46) é um acessório que permite a operação do microscópio de força atômica em meio líquido. Em nossas medidas preenchemos a célula líquida com solução tampão fosfatada (PBS) (NaCl; KCl; Na₂PO₄; KH₂PO₄ e pH= 7,4 a 25°C) contendo anticoagulante EDTA 0,2 mM.

Para medidas em meio líquido, antes da preparação da amostra propriamente dita, faz-se necessária uma boa imobilização do substrato ao porta-amostra metálico (fig. 46b). Para isso utilizamos cola epóxi para a fixação das lamínulas de vidro (fig. 46c). As lamínulas são previamente tratadas com solução de *poly-L-lisine* (Sigma-Aldrich) a 0,1% v/v por 5 minutos. Em seguida, elas são enxaguadas com água Milli-q de condutância de 18 $\Omega.cm^{-1}$ a 25°C. Após a secagem em temperatura ambiente, essas lamínulas são então coladas ao porta-amostra.

Uma suspensão de hemácias é obtida através da dissolução (fig. 46d e fig. 46e) de uma pequena gota de sangue em um tubo tipo eppendorf contendo 1 mL de solução tampão fosfatada (PBS) (NaCl; KCl; Na₂PO₄; KH₂PO₄ e pH= 7,4 a 25°C) e anticoagulante EDTA 0,2 mM (fig. 46d). A solução deve ficar com uma leve tonalidade vermelha. Em seguida, uma gota de 20 μ L dessa suspensão é depositada sobre o substrato modificado e deixada em repouso por 3 minutos (fig. 46f e fig. 46g). Esse tempo é suficiente para as células aderirem ao vidro modificado sem que a gota seque. Nesse ínterim, uma região da amostra contendo um bom número de células isoladas é escolhida (fig. 46h) e, então, posiciona-se a célula líquida sobre a gota depositada fig. 46i.

Para a obtenção das curvas de força, foram utilizadas sondas de nitreto de silício OTR-4 (Veeco Probes) com constante elástica nominal de 0,02 N.m⁻¹. As sondas foram previamente modificadas com as *beads*, de acordo com protocolo encontrado na seção anterior.

As curvas de força foram realizadas em PBS + EDTA 0,2 mM com frequência de 1,0 Hz. Em um único caso variamos a frequência com que as curvas foram realizadas. Isso ocorreu no ensaio realizado para ilustrar o comportamento viscoelástico das hemácias. As frequências utilizadas nesse ensaio foram 0,1; 0,5; 1,0; 5,0, 10,0 e 15,0 Hz.

Análise de elasticidade foi realizada através do software *Hertz Fit* que foi implementado pelo prof. Jeanlex Soares de Sousa. Para a estimativa do módulo de Young E foram utilizadas as eqs. 1.7 e 1.8, ambas discutidas na seção 1.4 e 3.1. Assume-se o valor para o raio R das *beads* como sendo a raiz quadrada de um quarto do produto entre os diâmetros médios X e Y que serão obtidos na subseção 3.5.1.

Na análise de viscosidade dos eritrócitos, utilizamos uma rotina computacional em MATLAB (ver apêndice D) para calcular área de histerese entre as curvas de extensão e retração.

O resultado obtido pelo programa tem unidades de nm^2 e deve ser multiplicado pelo valor nominal da constante elástica da sonda, afim de se obter o valor da energia total dissipada em joules.

Para se obter o valor da viscosidade (η), utilizamos a eq. 3.5 que também foi implementada na rotina computacional em MATLAB que pode ser encontrada no apêndice E.

3.5 Resultados e discussões

3.5.1 Caracterização e Fixação de *beads*

A figura 47 mostra várias *beads*. A maioria delas está bem dispersa e isso indica que a concentração utilizada na preparação é adequada e não favorece a formação de aglomerados (figura 48) que dificultam o processo de fixação de uma única *bead* para cada *tip*.

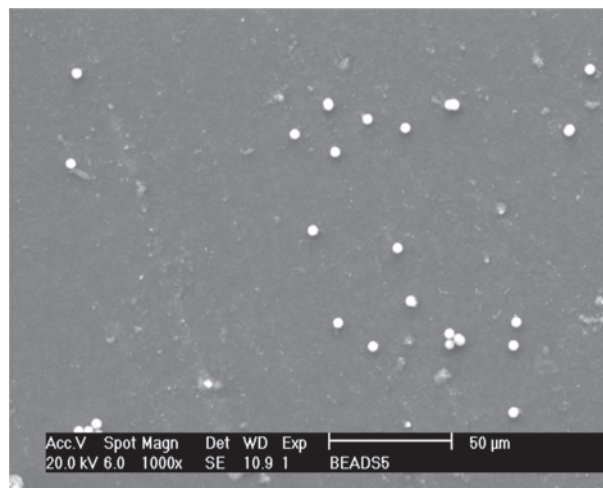


Figura 47: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura das *beads* sobre a lamínula de vidro. Panorâmica com magnificação de 1000X.

As medidas dos diâmetros das 24 micro-esferas, ao longo das direções horizontal e vertical, encontram-se na tabela 4. As medidas demonstram que há uma discrepância entre o valor nominal delarado pelo fabricante ($4 \mu\text{m}$) e os valores obtidos pela microscopia. Os valores médios, juntamente com o desvio padrão σ , para os diâmetros nas direções X e Y são, respectivamente, $4,94 (\pm 0,49) \mu\text{m}$ e $4,65 (\pm 0,33) \mu\text{m}$. Nota-se também que tais valores médios não coincidem entre si, e portanto as *beads* não são perfeitamente esféricas. O resultado dessa análise é relevante pois os modelos para a interpretação das curvas de força requerem como parâmetro de entrada a geometria do indentador. Além disso, de posse dos valores médios acima, obteremos dados mais realísticos a cerca do módulo de Young dos eritrócitos.

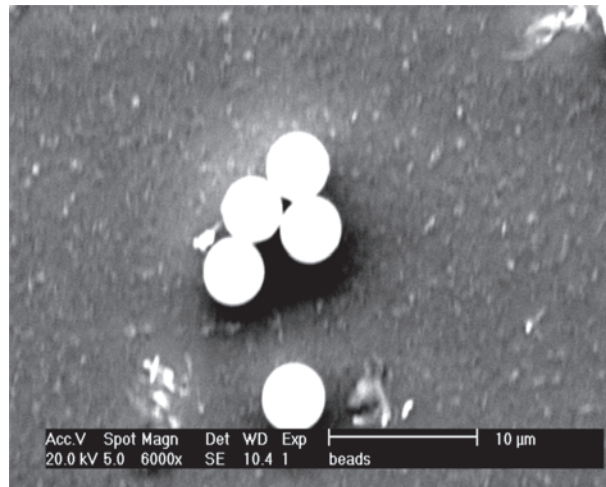


Figura 48: Micrografia com magnificação de 6000X de um aglomerado de *beads*. Aglomerados como esse impedem que uma única micro-esfera seja aderida à *tip*.

Tabela 4: Medida dos diâmetros das *beads*

# Bead	Diâmetro X (μm)	Diâmetro Y (μm)
1	4,50	4,90
2	5,54	4,61
3	4,50	4,61
4	5,54	5,37
5	5,89	4,61
6	5,54	4,99
7	5,20	4,99
8	5,20	4,99
9	5,20	4,61
10	4,44	4,29
11	4,62	4,54
12	4,56	4,35
13	4,79	4,80
14	5,20	4,99
15	4,85	4,61
16	5,20	4,22
17	4,50	4,61
18	4,50	4,61
19	4,16	4,22
20	4,50	4,99
21	5,54	4,22
22	4,16	4,22
23	5,20	4,20
24	5,20	4,99
Média $\pm \sigma$:	4,94 \pm 0,49	4,65 \pm 0,33

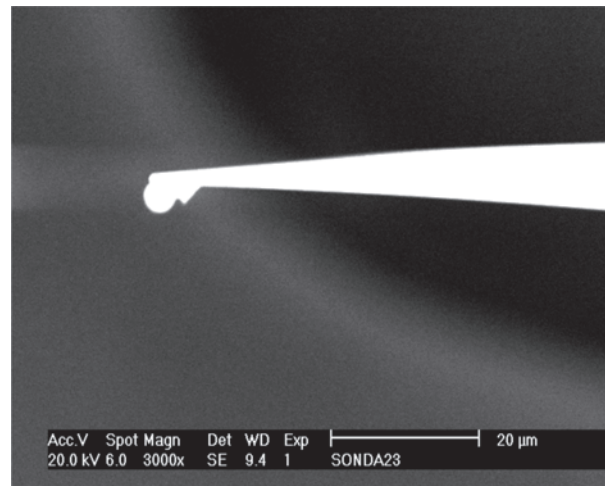


Figura 49: Micrografia com magnificação de 3000X de um cantilever de nitreto de silício.

Como resultado da fixação, obtém-se um cantilever com a *tip* modificada, ou seja, com uma micro-esfera aderida (figura 49). Observa-se que na figura 49, a superfície aproximadamente esférica da bead encontra-se em um nível mais baixo que a ponta da *tip* piramidal e, conseqüentemente, para pequenas indentações, a bead tocará primeiramente a amostra. Assim, a geometria do contato será esférica, ao invés de piramidal ou cônica. Tomaremos o raio R médio para as microesferas como sendo dado pela raiz quadrada de um quarto do produto dos diâmetros médios X e Y (tabela 4), ou seja, $R = 2396$ nm.

Uma ampliação maior dessa *tip* modificada pode ser visualizada na figura 50, onde novamente se observa que a superfície da bead encontra-se em um nível diferente da *tip* piramidal. Observa-se também que há um pequeno achatamento na superfície da micro-esfera, mas que provavelmente não é real, tratando-se, portanto, de um artefato causado pelo acúmulo de elétrons oriúndos do feixe eletrônico que este tipo de microscópio utiliza para operar. Como as *beads* são constituídas de sílica, sendo portanto materiais isolantes, a superfície fica repleta de cargas elétricas imobilizadas que acabam repelido os elétrons que chegam do feixe. Esses elétrons repelidos, ao serem detectados, produzem tal artefato.

3.5.2 Análise da elasticidade aparente dos eritrócitos

Os resultados do ajuste (*fitting*) do modelo de Hertz (eqs. 1.7 e 1.8) considerando com as curvas de força de extensão obtidas em doadores saudáveis e com anemia falciforme encontram-se resumidos nas tabelas 5 e 6. Admitiu-se aqui o valor de 0,5 para a razão de Poisson ν_{sample} , conforme discutido na seção 1.4. No fim de cada tabela, o valor médio para as 25 medidas de E realizadas em cada grupo doador (saudáveis e doentes) aparece acompanhado do respectivo desvio padrão σ .

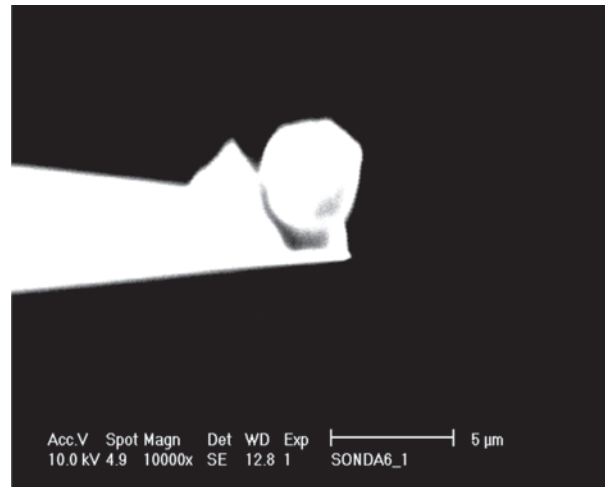


Figura 50: Micrografia com magnificação de 10000X da *tip* modificada. Na superfície da microesfera observa-se um pequeno achatamento, possivelmente ocasionado pela concentração de cargas elétricas provenientes do feixe eletrônico do microscópio.

Tabela 5: Módulo de Young das hemácias de doadores sadios

# doador	medida 1 (kPa)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	0,4233	0,3368	0,5217	0,4247	0,4739
2	0,3631	0,4995	0,3997	0,5219	0,3943
3	0,5345	0,5154	0,5536	0,3529	0,5089
4	0,5212	0,5428	0,4103	0,4504	0,5109
5	0,4417	0,5538	0,4871	0,4981	0,4598
$E \pm \sigma$:	0,1480 \pm 0,01873 kPa				

Tabela 6: Módulo de Young das hemácias de pacientes com anemia falciforme

# paciente	medida 1 (kPa)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	0,4233	0,3368	0,5217	0,4247	0,4739
2	0,3631	0,4995	0,3997	0,5219	0,3943
3	0,5345	0,5154	0,5536	0,3529	0,5089
4	0,5212	0,5428	0,4103	0,4504	0,5109
5	0,4417	0,5538	0,4871	0,4981	0,4598
$E \pm \sigma$:	0,4680 \pm 0,06494 kPa				

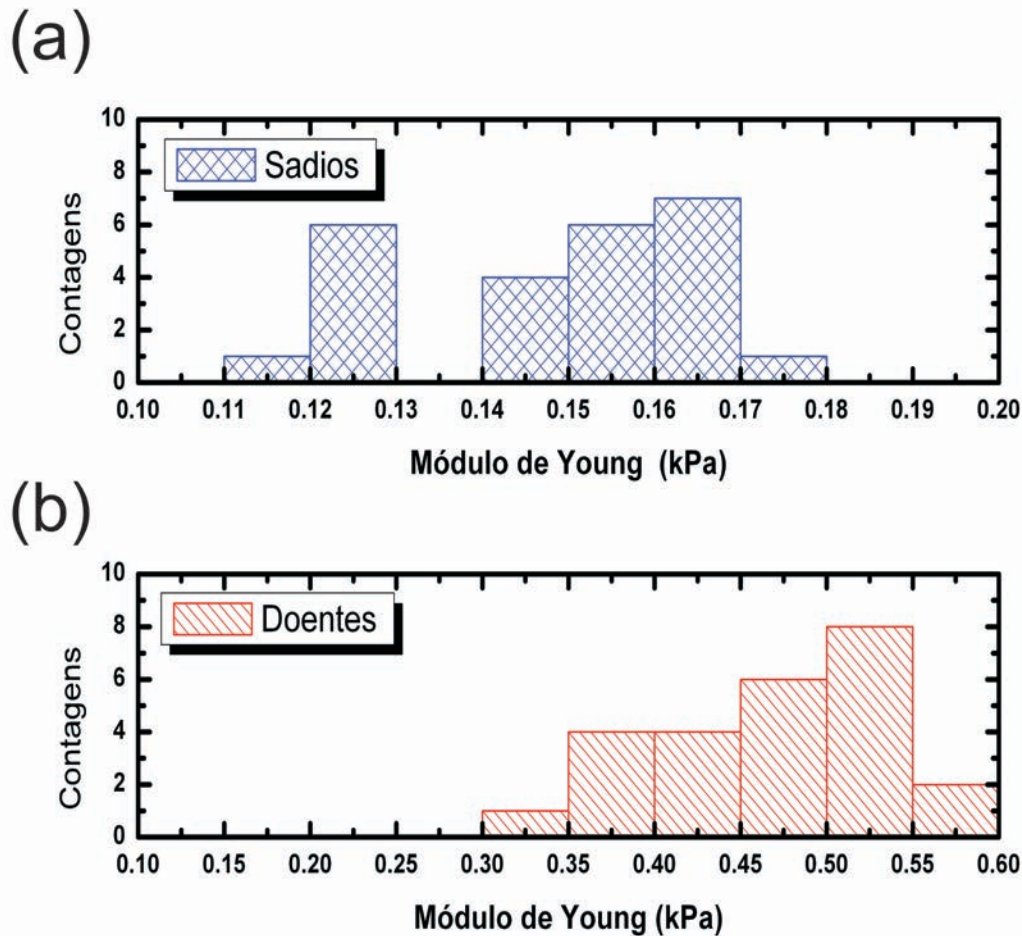


Figura 51: Histograma de distribuição do módulo de Young E para as hemácias de doadores (a) sadios (b) doentes.

A partir da tabelas, concluímos que as hemácias de doadores sadios, em média, apresentam módulo de Young cerca de três vezes menor que o módulo encontrado para as células de doadores com a hemoglobinopatia.

O desvio padrão representa cerca de 12,6% e 13,9% da média de E para as distribuições de doadores sadios e doentes, respectivamente. Apesar desses valores representarem uma variabilidade admissível para tais distribuições, os valores médios encontrados são inferiores aos encontrados na literatura (Dulinska et al., 2006 e Maciaszek e Lykotrafitis, 2011). No entanto, o comportamento elástico aparente verificado para essas células condiz com os achados de outros autores; as hemácias de doadores falcêmicos são mais elásticas (maior valor de E) do que as dos doadores sadios.

A representação gráfica da distribuição dos valores do módulo de Young podem ser observadas na figura 51.

A figura 51 revela que não há superposição entre as distribuições de E . As hemácias do doadores sadios possuem módulos de Young aparente, situados entre os valores 0,11 e 0,18 kPa, enquanto num intervalo superior, de 0,30 a 0,60 kPa, encontra-se distribuído o módulo de Young aparente para as hemácias de doadores com anemia falciforme.

Esse comportamento de E para as hemácias nessas condições também foi observado no trabalho de Maciaszek e Lykotrafitis (2011). Esses autores utilizaram a técnica de AFM para estudar as hemácias em condições semelhantes as que foram utilizadas em nosso trabalho, exceto pelo uso de 0,5% do fixador glutaraldeído. O modelo mecânico por eles utilizado foi o de Hertz-Sneddon considerando a geometria piramidal do indentador.

Apesar de obterem valores de E um pouco maiores que os encontrados no presente trabalho (1,10 kPa, para hemácias de doadores normais e 3,05 kPa em hemácias de pacientes falcêmicos), Maciaszek e seu colaborador verificaram a mesma relação que nós encontramos, ou seja, que as hemácia em pacientes com anemia falciforme são cerca de três vezes mais rígidas do que aquelas encontradas em doadores sadios.

O aumento dos valores de E obtidos no trabalho de Maciaszek e Lykotrafitis (2011) podem ser justificados por dois motivos: O primeiro deles pode ser o uso do fixador que, conforme vimos, contribuem com o aumento da rigidez da célula afim de manter seu *shape*. Já o segundo poderia ser justificado pela diferença entre a geometria utilizada. Nós utilizamos uma geometria esférica enquanto aqueles autores utilizaram um indentador piramidal.

Esses autores afirmam que o motivo do aumento da regidez dos eritrócitos é provavelmente devido a mudanças na afinidade da espectrina e os filamentos de actina quem estruturam o citoesqueleto. Outra possibilidade levantada por estes autores é que a desidratação da célula falciforme promova a polimerização da hemoglobina HbS desoxigenada.

3.5.3 Análise da viscosidade aparente dos eritrócitos

Afim de destacar o comportamento viscoelástico das hemácias, obtemos curvas de força sobre a hemácia de um doador sadio em diferentes frequências ou velocidades de aproximação/afastamento.

Na figura 52, as curvas de força sofreram deslocamentos verticais somente para facilitar a visualização do aumento da área da histerese com a frequência. Observa-se que, para frequências abaixo de 1,0 Hz a histerese é muito pequena ou nula e cresce rapidamente a partir deste valor.

Como vimos na seção 3.2, tal comportamento é relatado para vários materiais viscoe-

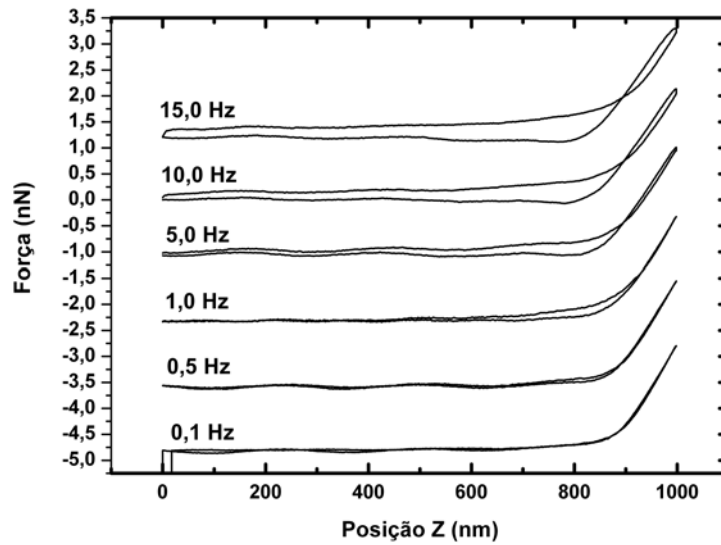


Figura 52: Curvas de força obtidas em diferentes frequências sobre a hemácia de um doador sadio. Observa-se o aumento da histerese com a frequência.

Tabela 7: Área da histerese nas curvas de força em hemácias de doadores sadios

# doador	medida 1 (10^{-16} J)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	3,9643	7,5991	6,3785	6,3605	5,6347
2	9,3581	7,2885	6,7973	7,4266	8,4655
3	4,5651	7,2055	15,2639	6,5431	8,1484
4	6,7107	7,0403	7,3171	7,7566	7,0974
5	7,4815	7,1027	7,1813	6,3620	10,3348
$A \pm \sigma = (7,4153 \pm 2,0846)10^{-16}$ J					

lásticos. Tanto para hemácias (Bremmell et al., 2006) quanto para vesículas poliméricas (Gillies et al., 2002).

Os valores calculados para a área da histerese nas curvas de força realizadas com frequência de 1,0 Hz sobre as hemácias de doadores sadios e de pacientes com anemia falciforme são discriminados nas tabelas 7 e 8.

Analisando-se as médias informadas nas tabelas 7 e 8, percebe-se que o valor médio da a energia dissipada é ligeiramente maior em hemácias de paciente sadios.

Os valores médios encontrados para a energia dissipada nas hemácias, em ambos os tipos de doadores, têm uma ordem de grandeza a mais do que os valores encontrados para a dissipação de energia em vesículas coloidais (Gillies et al., 2002).

Como os desvios σ para essas distribuições são altos (28,1% para sadios e 48,8%,

Tabela 8: Área da histerese nas curvas de força em hemácias de pacientes com anemia falciforme

# paciente	medida 1 (10^{-16} J)	medida 2	medida 3	medida 4	medida 5
1	6,8576	12,1807	10,4885	7,7980	15,8350
2	3,9179	4,4078	8,3086	5,7715	4,9239
3	9,0969	4,8491	9,0445	5,4951	5,8943
4	8,1054	3,4432	3,8816	3,8702	4,2222
5	3,3656	3,5832	5,4722	3,8793	4,6625
$A \pm \sigma = (6,3742 \pm 3,1085)10^{-16}$ J					

Tabela 9: Viscosidade aparente de hemácias em indivíduos sadios

# doador	medida 1 (Pa.s)	medida 2	medida 3
1	41,1433	443,6174	263,1149
2	82,9131	214,1503	286,3578
3	167,1093	214,3972	234,5322
4	461,1007	157,2268	343,6267
5	123,8231	337,4009	161,2414
$\eta \pm \sigma = 235,4503 \pm 122,5859$ Pa.s			

para falcêmicos) a média da energia dissipada não pode ser utilizada como medida de tendência central. Porém, podemos fazer algumas especulações em torno das distribuições da fig. 53.

A distribuição de energia dissipada pelas hemácias para ambos os grupos de indivíduos está representada nos histogramas da figura 53.

Observando-se a figura 53, conclui-se que, embora em pequenas contagens, a dissipação de energia em hemácias de doadores falcêmicos ocorre em todos os valores do intervalo analisado, enquanto nas hemácias de doadores sadios, observa-se maior existência de dissipação para valores situados entre $6 \cdot 10^{-16}$ e $8 \cdot 10^{-16}$ J.

Os resultados da rotina computacional que calculou a viscosidade aparente são apresentados nas tabelas 9 e 10 e graficamente representados nos histogramas da figura 54. Nessa análise foram utilizadas 15 curvas de força obtidas sobre as hemácias de doadores sadios e outras 15 curvas obtidas em hemácias de indivíduos com anemia falciforme.

Novamente, a média não poderá ser utilizada como medida de tendência central para as distribuições de η , haja vista que a variabilidade das duas distribuições foram grandes; $\eta_{sadios} = 235,4503 \pm 122,5859$ Pa.s e $\eta_{doentes} = 612,4753 \pm 424,2948$ com esses desvios representando cerca de 52,1% e 69,3%, respectivamente.

A distribuição de viscosidade em hemácias de doadores sadios (fig. 54a) concentra-se no intervalo de 0 a 500 Pa.s, enquanto a distribuição de η para as hemácias dos doentes se espalham

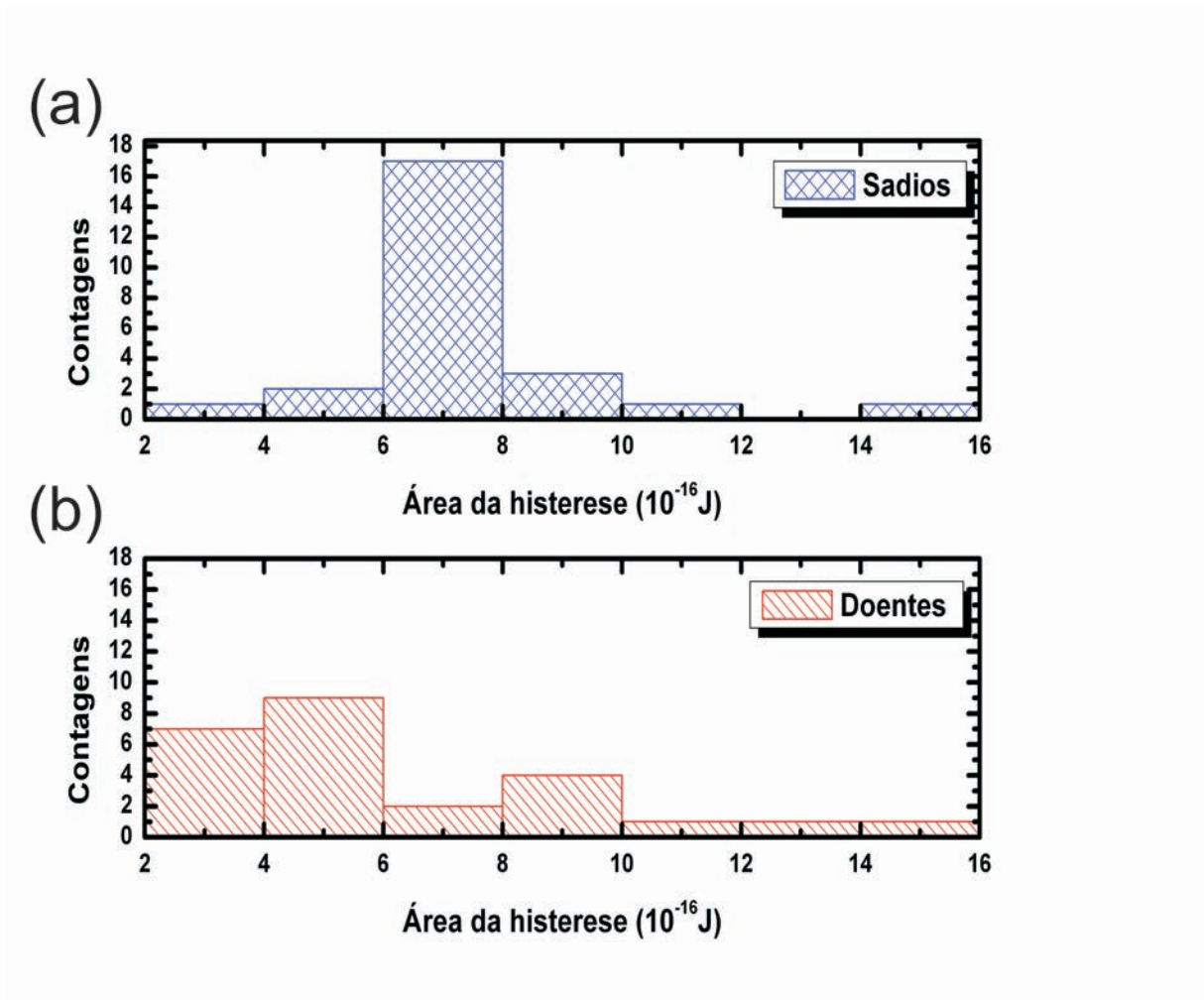


Figura 53: Distribuição da dissipação de energia durante o processo de indentação das hemácias de doadores: (a) sadios (b) doentes.

Tabela 10: Viscosidade aparente de hemácias em indivíduos com anemia falciforme

# doador	medida 1 (Pa.s)	medida 2	medida 3
1	568,8031	1599,1	1435,2
2	604,3138	481,1278	205,3847
3	454,8252	629,8704	171,5306
4	345,1575	210,3402	264,1795
5	538,1884	804,958	874,1510
$\eta \pm \sigma = 612,4753 \pm 424,2948$ Pa.s			

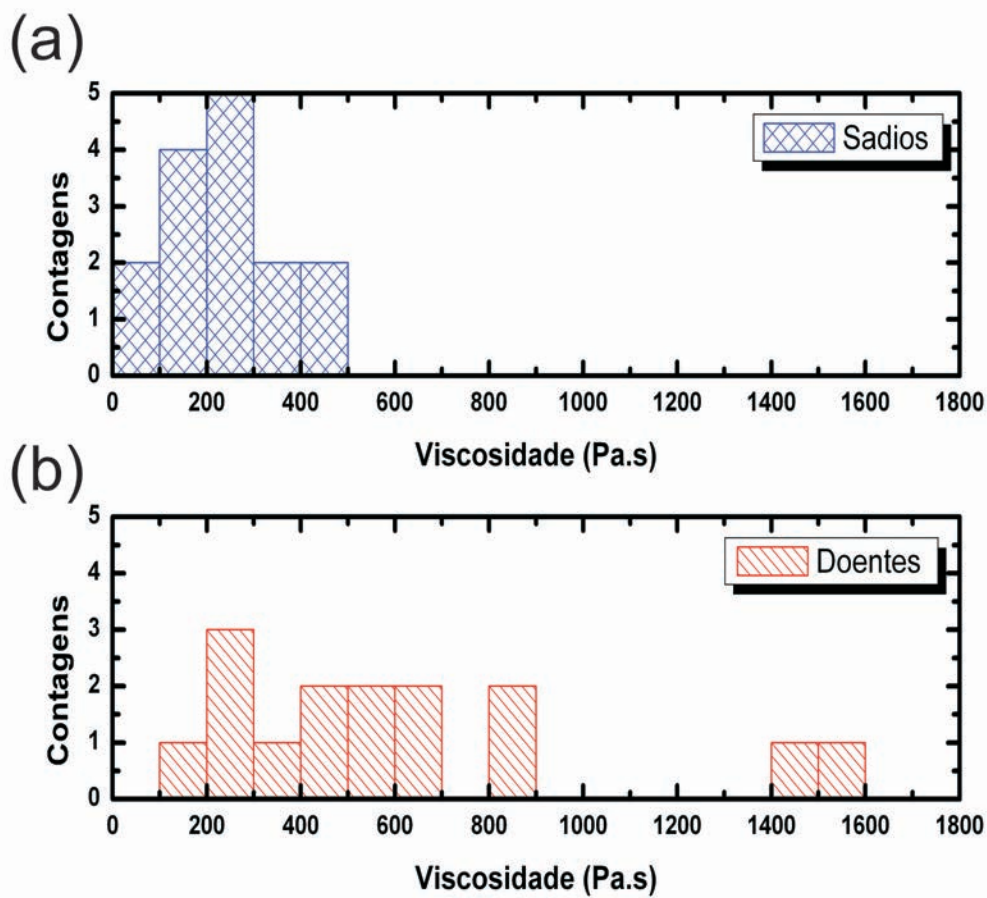


Figura 54: Histograma de distribuição da viscosidade aparente η de hemácias contendo hemoglobina (a) normal (b) anormal.

em um intervalo maior de viscosidade. De fato, o desvio padrão dessa distribuição é quase 4 vezes o valor de σ para a distribuição dos sadios. Há uma superposição das distribuições entre 100 e 500 Pa.s.

3.6 Conclusões

Ao final deste capítulo, concluímos que a metodologia adotada para a modificação de *tips* da AFM se mostrou eficaz e reprodutível. Exceto para a caracterização das *tips* por microscopia de varredura, essa metodologia dispensa o uso de equipamentos mais sofisticados como nanomanipuladores, além de dispensar colas mais sofisticadas como a de cura em ultravioleta e isso faz com que a metodologia seja mais barata.

Concluímos que a utilização das sondas modificadas foi satisfatória na análise de elasticidade aparente dos eritrócitos. Determinamos que as hemácias advindas de pacientes com anemia falciforme são cerca de três vezes mais rígidas do que as hemácias de doadores sadios.

Embora não se possa utilizar os valores médios da área de histerese e da viscosidade, pode-se recorrer ao histogramas para afirmar que as distribuições de energia dissipada (área de histerese) nas curva de força e de viscosidade η ocorrem em valores menores para as hemácias de doadores sadios.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

i

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERO, U.; MONKEN, C. H.; NAKANO, Y.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; MESQUITA, O. N. *Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy*. Physical Review E. 67, 051904, 2003.
- A-HASSAN, E.; HEINZ, W. F.; ANTONIK, M. D.; D’COSTA, N. P.; NAGESWARAN, S.; SCHOENENBERGER, C. A. e HOH, J. H. *Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy*. Biophysical Journal. 74, 1564-1578, 1998.
- AKAKI, M.; NAGAYASU, E.; NAKANO, Y.; AIKAWA, M. *Surface charge of Plasmodium falciparum merozoite as revealed by atomic force microscopy with surface potential spectroscopy*. Parasitol. Res. 88, 16-20, 2002.
- ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. *AFM: a versatile tool in biophysics*. Meas. Sci. Technol. 16, R65-R92, 2005.
- ANJOS, J.; VIEIRA, C. L. *Um olhar para o futuro: desafios da física para o século XXI*. Rio de Janeiro, Vieira e Lent, 2008.
- ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M. *Internal cell manipulation using infrared laser traps*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 7914-7918, 1989.
- ATTARD, P. *Interaction and deformation of viscoelastic particles: nonadhesive particles*. Physical Review E. 63, 061604, 2001.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. *Sickle cell biomechanics*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 12, 345-367, 2010.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. *An introduction to rheology*. 3 ed. New York, Elsevier, 1993.
- BEREITER-HAHN, J.; ILONKA, K.; LUERS, H.; VOTH, M. *Mechanical basis of cell shape: investigations with the scanning acoustic microscope*. Biochem. Cell Biol. 73, 337-348, 1995.
- BHUSHAN, B. *Handbook of nanotechnology*. 2 ed. New York, Springer, 2007.
- BOAL, D. H. *Mechanics of the cell*. Cambridge, Cambridge University Press, 2002.

- 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 study of drug response in sickle cell disease*. Eur. J. Haematology. 70, 207-211, 2003.
- BREMMELL, K. E.; EVANS, A.; PRESTIDGE, C. A. *Deformation and nano-rheology of red blood cells: an AFM investigation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 50, 43-48, 2006.
- BRIDGES, K. R.; PEARSON, H. A. *Anemias and other red cell disorders*. McGraw-Hill, 2008.
- BRODY, D. E.; BRODY, A. R. *As sete maiores descobertas científicas da história e seus autores*. Trad. Lauro Teixeira Motta. São Paulo, Companhia das Letras, 1999.
- BUSHAN, B; FUCHS, H. *Atomic force microscopy in nanomedicine in applied scanning probe methods III*. Heidelberg, Springer, 2006.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. *A doença falciforme no Brasil*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 29(3), 203-206, 2007.
- CAPRARI, P.; TARZIA, A.; MOJOLI, G.; CIANCIULLI, P.; MANNELLA, E.; MARTORANA, M. C. *Hereditary spherocytosis and elliptocytosis associated with prosthetic heart valve replacement: rheological study of erythrocyte modifications*. Int. J. Hematol. 89, 285-293, 2009.
- do CARMO, M. P. *Geometria diferencial de curvas e superfícies*. Trad. Pedro Roitman. 3 ed. Rio de Janeiro, SBM, 2008.
- COSTA, A. S.; MAGALHÃES, S. M. M.; PITOMBEIRA, M. S.; FREIRE, J. A. K.; FREIRE, V. N.; BARRETO, M. S. F.; REBELO, L. M.; SANTOS, R. P.; FARIAS, G. A. *Evaluation of red blood cells of healthy subjects and patients with myelodysplastic syndrome*. Microscopy and Microanalysis. 11, 2005.
- COSTA, E. F. *Caracterização de células vermelhas por microscopia de força atômica*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2006.
- COTTERRILL, R. *Biophysics: an introduction*. New York, John Wiley & Sons, 2002.
- DAVIES, A. J. *An introduction to computational geometry for curves and surfaces*. New York, Oxford University Press, 1996.
- DAVYDOV, A. S. *Biology and quantum mechanics*. Oxford, Pergamon, 1982.
- DISCHER, D. E.; DONG, C.; FREDBERG, J. J.; GUILAK, F.; INGBER, D.; JANMEY, P.; KAMM, R. D.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; WEIBAUM, S. *Cell research and applications for the next decade*. Annals of Biomedical Engineering. 37, 5, 847-859, 2009.

- _____. *New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity*. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 117-122, 2000.
- DUCKER, W. A.; SENDEN, T. J. *Measurement of forces in liquids using a force microscope*. *Langmuir.* 8, 1831-1836, 1992.
- DULINSKA, I.; TARGOSZ, M.; STROJNY, W.; LEKKA, M.; CZUBA, P.; BALWIERZ, W.; SZYMONSKI, M. *Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy*. *J. Biochem. Biophys. Methods* 66, 1-11, 2006.
- DURÁN, J. E. R. *Biofísica: fundamentos e aplicações*. São Paulo, Pearson, 2003.
- EVANS, E.; RAWICZ, W. *Entropy-Driven Tension and Bending Elasticity in Condensed-Fluid Membranes*. *Physical Review Letters*, 64, 2094, 1990.
- GARCIA, C. R. S.; TAKEUSCHI, M.; YOSHIOKA, K.; MIYAMOTO, H. *Imaging plasmodium falciparum-infected ghost and parasite by atomic force microscopy*. *J. Structural Biol.* 119, 92-98, 1997.
- GILLIES, G.; PRESTIDGE, C. A.; ATTARD, P. *An AFM study of the deformation and nanorheology of cross-linked PDMS droplets*. *Langmuir.* 18, 1674-1679, 2002.
- GIRASOLE, M.; POMPEO, G.; CRICENTI, A.; CONGIU-CASTELLANO, A.; ANDREOLA, F.; SERAFINO, A.; FRAZER, B. H.; BOUMIS, G.; AMICONI, G. *Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1768, 1268-1276, 2007.
- GLASER, R. *Biophysics*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2001.
- GOLDFARB, D. *Biophysics demystified*. New York, McGraw Hill, 2011.
- GOMPPER, G.; SCHICK, M. *Soft matter*. v. 4. Weinheim, Wiley - VHC, 2008.
- IKAI, A. *The world of nano-biomechanics*. Oxford, Elsevier, 2008.
- KAMM, R. D.; MOFRAD, M. R. K. *Cytoskeletal mechanics: models and measurement*. Cambridge, Cambridge University Press, 2006.
- KETENE, A. N.; SCHMELZ, E. M.; ROBERTS, P. C.; AGAH, M. *The effect of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. DOI: 10.1016/j.nano.2011.05.012, 2011.
- KHAN, M.; SONI, H.; SOOD, A. K. *Optical tweezer for probing erythrocyte membrane deformability*. *Applied Physics Letters.* 95, 233703, 2009.

- KLYMENKO, O.; WILTOWSKA-ZUBER, J.; LEKKA, M.; KWIATEK, W. M. *Energy dissipation in the AFM elasticity measurements*. Acta Physica Polonica A. 155, 2, 2009.
- KUZNETSOVA, T. G.; STARODUBTSEVA, M. N.; YEGORENKOV, N. I.; CHIZHIK, S. A.; ZHDANOV, R. I. *Atomic force microscopy probing cell elasticity*. Micron. 38, 824-833, 2007.
- LIM, C. T.; ONG, C. N.; LEE, G. Y. H.; LI, Q. S. *AFM indentation study of breast cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 374, 4, 609-613, 2009.
- LIU, F.; BURGESS, J.; MIZUKAMI, H.; OSTAFIN, A. *Sample preparation and imaging of erythrocyte cytoskeleton with the atomic force microscopy*. Cell Biochemistry and Biophysics. 38, 251-270, 2003.
- LUERS, H.; HILLMANN, K.; LITNIEWSKI, J.; BERCITER, J. *Acoustic microscopy of cultured cells: distribution of forces and cytoskeletal elements*. Cell Biophys. 18, 279-293, 1991.
- MACIASZEK, J. L.; LYKOTRAFITIS, G. *Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal*. Journal of Biomechanics. 44, 657-661, 2011.
- MACOSKO, C. W. *Rheology: principles, measurements and applications*. New York, Wiley, 1994.
- MAHAFFY, R. E.; PARK, S.; GERDE, E.; KAS, J.; SHIH, C. K. *Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy*. Biophysical Journal. 86, 1777-1793, 2004.
- _____; SHIH, C. K.; MACKINTOSH, F. C.; KAS, J. *Scanning probe based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells*. Phy. Rev. Lett. 85, 880-883, 2000.
- MCGOUGH, A. *Membrane skeleton: how to build a molecular shock absorber*. Curr. Biol. 9, R887-R889, 1999.
- MESQUITA, L. G.; AGERO, U.; MESQUITA, O. N. *Defocusing microscopy: an approach for red blood cell optics*. Applied Physics Letters. 88, 133901, 2006.
- MOHANDAS, N.; EVANS, E. *Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 787-818, 1994.
- MOKKEN, F. CH.; KEDARIA, M.; HENRY, CH. P.; HARDEMAN, M. R.; GELB, A. W. *The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrhheological parameter*. Ann. Hematol. 64, 113-122, 1992.

- MORRIS, V. J.; KIRBY, A. R.; GUNNING, A. P. *Atomic force Microscopy for biologists*. Londres, Imperial College Press, 1999.
- MURADOR, P.; DEFFUNE, E.; *Structural aspects of the erythrocyte membrane*. Rev. bras. hematol. hemoter. 29(2), 168-178, 2007.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODRVELL, V. W. *Harper's illustrated biochemistry*. 25 ed. New York, McGraw-Hill, 2003.
- Nanotechnology community*. Disponível em: <<http://nanotechweb.org/cws/article/tech/17122>>. Acesso em 17 jan. 2012.
- NEIDLE, S. *Oxford handbook of nucleic acid structure*. Oxford, Oxford University Press, 1999.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 4 ed. New York, W. H. Freeman, 2006.
- NETO, J. C.; AGERO, U.; GAZZINELLI, R. T.; MESQUITA, O. N. *Measuring optical and mechanical properties of a living cell with defocusing microscopy*. Biophysical Journal. 91, 1108-1115, 2006.
- NOWAKOWSKI, R.; LUCKHAM, P. *Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy*. Surf. Interface Anal. 33, 118-121, 2002.
- NUSSENZVEIG, H. M. *Curso de física básica*. v. 4. São Paulo, Edgard Blücher, 1998.
- O'REILLY, M. O.; MCDONNELL, L.; MULLANE, J. O. *Quantification of red blood cells using atomic force microscopy*. Ultramicroscopy. 86, 107-112, 2001.
- PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. *Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease*. Science. 110, 543-548, 1949.
- PELLING, A. E.; HORTON, M. A. *An historical perspective on cell mechanics*. Eur. J. Physiol. 456, 3-12, 2008.
- PERUTZ, M. F. *Nobel Lectures, Chemistry*. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1964.
- PETERSEN, J. R.; MOHAMMAD, A. A. *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis*. New Jersey, Humana Press, 2001.
- PETERSON, M. A. *Linear response of the human erythrocyte to mechanical stress*. Physical Review A. 45, 6, 1992.

RADMACHER, M. *Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope in atomic force microscopy in cell biology*. San Diego, Academic Press. Cap. 4, 68, 2002.

_____; FRITZ, M.; KACHER, C. M.; CLEVELAND, J. P.; HANSMA, P. K. *Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope*. Biophysical Journal. 70, 556-567, 1996.

REBELO, L. M.; DE SOUSA, J. S.; MENDES FILHO, J.; RADMACHER, M. *Viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypy measured with atomic force microscopy*. Soft Matter. Submetido em 22 de dezembro de 2011.

_____. *Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 2010.

_____. *Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2007.

RESNICK, R.; HALLIDAY, D.; KRANE, K. S. *Física*. 4 ed. v. IV. Rio de Janeiro, LTC, 1996.

RICE, A. *Attaching particles to AFM cantilevers*. Support Note 226, Revision B. Veeco Metrology, 2001.

SAFRAN, S. A.; GOV, N.; NICOLAS, A.; SCHWARZ, U. S.; THUSTY, T. *Physics of cell elasticity, shape and adhesion*. Physica A. 352, 171-201, 2005.

dos SANTOS, J. A. C. *Nanoidentação de materiais lineares elásticos com espessura finita*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2010.

SEN, S.; SUBRAMANIAN, S.; DISCHER, D. E. *Indentation and adhesion probing of a cell membrane with AFM: theoretical model and experiments*. Biophysical Journal. 89, 3203-3213, 2005.

SHAO, J.; HOCHMUTH, R. M. *Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes*. Biophysical Journal. 71, 2892-2901, 1996.

SLEEP, J.; WILSON, D.; SIMMONS, R.; GRATZER, W. *Elasticity of red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study*. Biophysical Journal. 77, 3085-3095, 1999.

SNEDDON, I. N. *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. Int. J. Eng. Science. 3, 47-57, 1965.

- STEVINA, S.; KUZMAN, D.; WAUGH, R. E.; ZIHERL, P.; ZEKS, B. *The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells*. *Bioelectrochemistry*. 62, 107-113, 2004.
- SVOBODA, K.; SCHMIDT, C. F.; BRANTON, D.; BLOCK, S. M. *Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton*. *Biophysical Journal*. 63, 784-793, 1992.
- SWIHART, A. H.; MIKRUT, J. M.; KETTERSON, J. B.; MACDONALD, R. C. *Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton*. *Journal of Microscopy*. 204, Pt 3, 212-225, 2001.
- THIRIET, M. *Biology and mechanics of blood flows*. Part I. New York, Springer, 2008.
- THOMAS, G. B.; FINNEY, R. L. *Cálculo diferencial e integral*. Trad. Alberto Flávio Alves de Aguiar. Rio de Janeiro, LTC, 1985.
- VERDIER, C.; ETIENNE, J.; DUPERRAY, A.; PREZIOSI, L. *Review: Rheological properties of biological materials*. *C. R. Physique*. 10, 790-811, 2009.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. *Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids*. *Nature*. 171, 738-740, 1953.
- WU, Y.; HU, Y.; CAI, J.; MA, S.; WANG, X.; CHEN, Y.; PAN, Y. *Time dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM*. *Micron*. 40, 359-364, 2009.
- YAMASHINA, S.; KATSUMATA, O. *Structural analysis of red blood cell membrane with atomic force microscope*. *Journal of Electron Microscopy*. 49, 445-451, 2000.
- YOUNG, A.; EVANS, E. *Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipettes*. *Biophys. J.* 56, 139-149, 1989.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo, Atheneu, 2001.
- ZANETTE, S. I.; *Funcionamento de um microscópio de força atômica*. Notas de aula do CBPF, 1997.
- ZEMAN, K.; ENGELHARDT, H.; SACKMANN, E. *Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effect of cell shape and membrane organization*. *Eur. Biophys. J.* 18, 203-219, 1990.
- ZILCKER, A.; ENGELHARDT, H.; SACKMANN, E. *Dynamic reflection interference contrast (RIC) microscopy: a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli*. *J. Phys.* 48, 2139-2151, 1987.

APÊNDICE A



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 180/11

Fortaleza, 20 de Agosto de 2011

Protocolo COMEPE nº 157/11

Pesquisador responsável: Thiago de Melo Santiago

Título do Projeto: “Hematologia Física: Aplicação da técnica de microscopia de força atômica (AFM) ao estudo de propriedades mecânicas de hemácias em anemia hemolíticas”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 18 de Agosto de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,


Dr. Fernando Costa Pereira
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

APÊNDICE B

```

%SurfDiff: Diferencia a matriz do arquivo .dat extraido do microscopio
%-----
clc; clear all;
%define a resolucao da imagem
NX = 512; NY =512;
L=15000; % define lateral da imagem analisada
%inicializacao das matrizes
DIFX = zeros(NX,NY);
DIFY = zeros(NX,NY);
DIFX2 = zeros(NX,NY);
DIFY2 = zeros(NX,NY);
DIFXY = zeros(NX,NY);
N =zeros(NX,NY,3);
H=zeros(NX,NY,3);
Gaussian=zeros(NX,NY);
CM=zeros(NX,NY);
DX = L/NX; %separacao entre os pontos na direcao x em nm
DY = L/NY; %separacao entre os pontos na direcao y em nm
disp('Lendo a superficie')
Z=dlmread('nome do arquivo.dat'); %lendo a superficie a partir do arquivo .dat
disp('Terminado')
for I = 2:NX-1; %derivadas primeiras fora das extremidades
for J = 2:NY-1;
H(I*1,J*1,3) = Z(I,J);
%derivadas primeiras
DIFY(I,J) = (Z(I+1,J) - Z(I-1,J))/(DX);
DIFX(I,J) = (Z(I,J+1) - Z(I,J-1))/(DY);
%derivadas segundas
DIFY2(I,J) = (Z(I+1,J) - 2*Z(I,J) + Z(I-1,J))/(DX2);
DIFX2(I,J) = (Z(I,J+1) - 2*Z(I,J) + Z(I,J-1))/(DY2);

```

```

DIFXY(I,J) = (Z(I+1,J+1) - Z(I+1,J-1) - Z(I-1,J+1) + Z(I-1,J-1))/(DX * DY);
%derivadas mistas
DIFXY(1,J) = (Z(2,J+1) - Z(2,J-1) - Z(1,J+1) + Z(1,J-1))/(DX * DY);
DIFXY(NX,J) = (Z(NX,J+1) - Z(NX,J-1) - Z(NX-1,J+1) + Z(NX-1,J-1))/(DX *
DY);
end
DIFXY(I,1) = (Z(I+1,2) - Z(I+1,1) - Z(I-1,2) + Z(I-1,1))/(DX * DY);
DIFXY(I,NY) = (Z(I+1,NY) - Z(I+1,NY-1) - Z(I-1,NY) + Z(I-1,NY-1))/(DX *
DY);
end
DIFXY(1,1) = (Z(2,2) - Z(2,1) - Z(1,2) + Z(1,1))/(DX * DY); %nas bordas
DIFXY(NX,1) = (Z(NX,2) - Z(NX,1) - Z(NX-1,2) + Z(NX-1,1))/(DX * DY); %nas bor-
das
DIFXY(1,NY) = (Z(2,NY) - Z(2,NY-1) - Z(1,NY) + Z(1,NY-1))/(DX * DY); %nas bor-
das
DIFXY(NX,NY) = (Z(NX,NY) - Z(NX,NY-1) - Z(NX-1,NY) + Z(NX-1,NY-1))/(DX *
DY); %nas bordas
for J = 1:NY; %derivadas em y nas bordas
DIFY(1,J) = (Z(2,J) - Z(1,J))/DX;
DIFY(NX,J) = (Z(NX,J) - Z(NX-1,J))/DX;
DIFY2(1,J) = (Z(2,J) - 2 * Z(1,J))/(DX^2);
DIFY2(NX,J) = (-2 * Z(NX,J) + Z(NX-1,J))/(DX^2);
end
for I = 1:NX; %derivadas em x nas bordas
DIFX(I,1) = (Z(I,2) - Z(I,1))/DY;
DIFX(I,NY) = (Z(I,NY) - Z(I,NY-1))/DY;
DIFX2(I,1) = (Z(I,2) - 2 * Z(I,1))/(DY^2);
DIFX2(I,NY) = (-2 * Z(I,NY) + Z(I,NY-1))/(DY^2);
end
%Escrevendo nos arquivos de saida
disp('Escrevendo no arquivo')
%guardando os valores das derivadas
dlmwrite('DiffX.dat',DIFX(:,:),'delimiter','^','precision',8);
dlmwrite('DiffY.dat',DIFY(:,:),'delimiter','^','precision',8);
dlmwrite('DiffX2.dat',DIFX2(:,:),'delimiter','^','precision',8);

```

```

dlmwrite('DiffY2.dat',DIFY2(:,:),'delimiter',';',precision',8);
dlmwrite('DiffXY.dat',DIFXY(:,:),'delimiter',';',precision',8);
%essa instrucao pode ser utilizada para plotar o campo de orientacao normal
%armazenamento das componentes dos vetores normais a superficie analisada
%aquí nao estamos definindo N e por isso o arquivo Normal esta vazio
dlmwrite('Normal.dat',N(:,:),3,'delimiter',';',precision',8);
%desenha o campo de orientacao normal a superficie analisada se N estiver
%definido.
I=1:NX; J=1:NY;
[X,Y] = meshgrid(I,J);
z=H(I,J,3);
[Nx,Ny,Nz] = surfnorm(z);
N(I,J,1)=Nx;
N(I,J,2)=Ny;
N(I,J,3)=Nz;
disp('Iniciando calculo da curvatura')
Gaussian = (DIFX2.*DIFY2 - DIFXY.^2)./((1 + DIFX.^2 + DIFY.^2).^2);
CM = (1 + DIFX.^2).*DIFY2 - 2.*(DIFX.*DIFY.*DIFXY) + (1 + DIFY.^2).*DIFX2./(2.*(1 + DIFX2.^2 + DIFY2.^2).^1.5);
disp('Matriz curvatura calculada com sucesso!')
dlmwrite('CurvaturaG.dat',Gaussian,'delimiter',';',precision',8);
disp('Gerando grafico')
hold off;
%desenha a superficie analisada
surf(z);
shading interp
%produz o histograma da distribuicao de curvatura gaussiana
figure;
tmp = reshape(Gaussian,NX*NY,1);
hist(tmp,100000);
%opcional que calcula a integral da funcao curvatura gaussiana
% sobre uma da area e divide o resultado pela area.
CG = trapz(trapz(Gaussian))./L^2
disp('Terminado')

```

APÊNDICE C

```

%Cria um hemisferio de raio 4000nm em um arquivo .dat
%-----
clc; clear all;
NX = 512; NY =512;
R=4000;% raio do hemisferio em nm
L=15000; %lateral da imagem em nm
PX = L/NX; %separacao entre os pontos na direcao X em nm
PY = L/NY; %separacao entre os pontos na direcao Y em nm
disp('Criando a Superficie')
H=zeros(NX,NY);
Z=zeros(NX,NY);
disp('Fim')
for I = 1: NX;
for J =1: NY;
%indica a eq. z=f(x,y) para o ramo positivo da esfera de raio R
H(I,J) = sqrt(R2 - ((I*PX - 7500)2 + (J*PY - 7500)2));
% anula as alturas na regioao que nao compreende o hemisferio
if imag(H(I,J)) == 0Z(I,J) = H(I,J); end
end
end
disp('Gerando a superficie no arquivo') dlmwrite('esfera512.dat',Z,'delimiter',' ','precision',8);
hold off; surf(Z); shading interp disp('Terminado')

```

APÊNDICE D

```

%Hist area: Calcula a area da histerese de uma curva de forza do
%arquivo .dat extraido do microscopio
%_____
clc; clear all;
NX = 1; NY=1024;
M=zeros(1024,2);
x=zeros(1,1024);
x1=zeros(512,1);
x2=zeros(512,1);
y=zeros(1,1024);
y1=zeros(1,512);
y2=zeros(1,512);
A=zeros(25,2);
for k=1:5;
M=zeros(1024,2);
disp('Lendo os Arquivos')
%lendo os arquivos posicao(coluna 1) e deflexao(coluna 2)
if k==1;
M=dlmread('fplot1 1hz.dat');
end
if k==2;
M=dlmread('fplot2 1hz.dat');
end
if k==3;
M=dlmread('fplot3 1hz.dat');
end
if k==4;
M=dlmread('fplot4 1hz.dat');
end
if k==5;

```



```

M=dlmread('fplot5 1hz.dat');
end
disp('Terminado')
%loop para calcular o valor minimo de deflexao da curva de extensao (1)
min1=M(1,2);
for i=2:512;
if min1>M(i,2);
min1=M(i,2);
end
end
min1
%loop para calcular o valor minimo de deflexao da curva de retracao (2)
min2=M(513,2);
for j=514:1024;
if min2>M(j,2);
min2=M(j,2);
end
end
min2
%shift do valores de deflexao da curva 1 para deixa-la acima do eixo x
for i=1:512;
M(i,2)=M(i,2)+abs(min1);
end

%shift do valores de deflexao da curva 2 para deixa-la acima do eixo x
for i=513:1024;
M(i,2)=M(i,2)+abs(min2);
end
%loop para alterar as abscissas da curva de retracao (caminho de volta)
l=0;
for i=512:1023;
l=1024-i;
M(i+1,1)=M(l,1);
end
% desmembrando a curva total (ida e volta) na curva de extensao (y1,x1)

```

```
% e na curva de retracao (y2,x2)
x=M(1:1024,1);
y=M(1:1024,2);
x1=M(1:512,1);
x2=M(513:1024,1);
y1=M(1:512,2);
y2=M(513:1024,2);
%calculando a area sob as curvas individuais
A1=trapz(x1,y1);
A2=trapz(x2,y2);
%calculando a area entre as curvas
A(k,1)=A1-A2
%Escrevendo no arquivo
disp('Escrevendo')
dlmwrite('histerese.dat',A(:,:),'delimiter','\t','precision',8);
k=k+1
end
%plotando a area entre as curvas
area(x,y)
```

APÊNDICE E

```

%Viscalc: Calcula a viscosidade aparente a partir das curvas de força.
%-----
clc; clear all;
V=zeros(5,1);
G=zeros(512,6);
H=zeros(512,6);
x=zeros(1,512);
y=zeros(1,512);
A=zeros(1024,2);
M=zeros(512,6,5);
disp('Lendo os Arquivos')
%lendo os arquivos posicao Z (coluna 1) e deflexao D(coluna 2)
A=dlmread('nome arquivo.dat');
disp('Done')
%loop para calcular o valor minimo de deflexao da curva 1 da amostra
min1=A(1,2);
for i=2:512;
    if min1 > A(i,2);
        min1=A(i,2);
    end
end
min1
%loop para calcular o valor minimo de deflexao da curva 2 da amostra
min2=A(513,2);
for j=514:1024;
    if min2 > A(j,2);
        min2=A(j,2);
    end
end
min2

```

```

%shift do valores de deflexao 1 da calibracao para deixa-la acima do eixo x
if min1 < 0;

for i=1:512;
A(i,2)=A(i,2)+abs(min1);
end
end
%shift do valores de deflexao 1 da amostra para deixa-la acima do eixo x
if min2 < 0;
for i=513:1024;
A(i,2)=A(i,2)+abs(min2);
end
end
%loop para alterar as abscissas da curva de retracao (caminho de volta)
%fechando a curva
%M(513,2)=M(1,2);
%M(1024,2)=M(512,2);
%looping para preencher a matriz G 512x6 (Z D1 I1 D2 I2 )
for j=1:5;
for i=1:512;
if j==1 ;
G(i,j)=A(i,1);
end
if j==2;
G(i,j)=A(i,2);
end

if j==3;
G(i,j)=A(i,1)-A(i,2);
end

if j==4;
G(i,j)=A(1024+1-i,2);
end

```

```

if j==5;
G(i,j)=A(i,1)-A(1024+1-i,2);
end
end
end
%Escrevendo no arquivo
disp('Escrevendo no arquivo')
dlmwrite('cel 5.dat',G(:,:),'delimiter',' ','precision',8);
%Apresentando as curvas para que o usuario possa informar os pontos
%de contato e as respectivas deflexoes:
x=G(1:512,1);
s1=G(1:512,2);
s2=G(1:512,4);
plot(x,s1,x,s2)
Zapp=zeros(3,1);
Dapp=zeros(3,1);
Zret=zeros(3,1);
Dret=zeros(3,1);
w=0;
while w==0;
%Solicitando dados da curva de aproximacao
Zapp(1,1) = input('Digite Z0 da curva de extensao:');
Dapp(1,1) = input('Digite D0 da curva de extensao:');
Zoapp=Zapp(1,1);
Doapp=Dapp(1,1);
%z1 sera considerado igual ao ponto de contato
zapp1=Zoapp;
dapp1=Doapp;
Zapp(3,1) = input('Digite Z2, o limite da curva de extensao a direita:');
zapp2=Zapp(3,1);
Dapp(3,1)= input('Digite a deflexao D2 correspondente a Z2 da extensao:');
; dapp2=Dapp(3,1);
indapp1 = ((zapp1 - Zoapp) - (dapp1 - Doapp))^2
indapp2 = ((zapp2 - Zoapp) - (dapp2 - Doapp))^2
indapp=(indapp2-indapp1)

```

```

%Solicitando dados da curva de retracao
Zret(1,1)= input('Digite Z0 da curva de retracao:');
Zoret=Zret(1,1);
Dret(1,1)= input('Digite D0 da curva de retracao:');
Doret=Dret(1,1);
%zret1 sera considerado igual ao Z1 da curva de extensao
zret1=zapp1;
Dret(2,1)= input('Digite a deflexao D1 correspondente a posicao Z1 na retracao:');
dret1=Dret(2,1);
%zret2 sera considerado igual ao Z2 da curva de extensao
zret2 = zapp2;
Dret(3,1) = input('Digite a deflexao D2 correspondente a Z2 da retracao:');
dret2=Dret(3,1);
indret1=(zret1-Zoret)-(dret1-Doret)
indret2=(zret2-Zoret)-(dret2-Doret)
indret=(indret2-indret1)
disp('Viscosidade em Pa.s sera calculada com os parametros acima')
w=input('Para confirmar digite 1 e aperte ENTER, caso contrario digite 0:');
end
a=340; % parametro que deve ser inserido pelo usuario a partir da analise
% das curvas que determina a posicao do dado que corresponde a Z0.
% Isso pode ser feito atraves do Origin com a ferramenta de cursor
% data reader. Clicando sobre o ponto de contato esse cursor ele
% da as coordenadas xy e a posicao do dado entre colchetes. Nesse
% caso foi [340]
x=G(a:512,1);
y1=G(a:512,2);
y2=G(a:512,4);
trapz(x,y1-y2)
Viscosidade = (1/(pi * 2396 * 2e - 6)) * 0.02 * (1e - 9) * trapz(x,y1 - y2)/(indapp - indret)
dlmwrite('visco.dat',Viscosidade,'delimiter',';', 'precision',8);

```