

Heloise Pöckel Fernandes

**Estudo das propriedades elétricas das hemácias
utilizando pinça óptica.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Barjas-Castro

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Carlos Lenz César

Campinas

2009

Heloise Pöckel Fernandes

Estudo das propriedades elétricas das hemácias utilizando pinça óptica.

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Barjas-Castro

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Carlos Lenz César

Campinas

2009

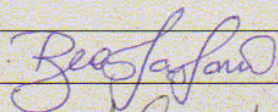
Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Heloise Pockel Fernandes

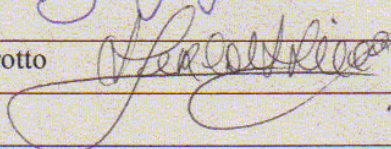
Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Membros:

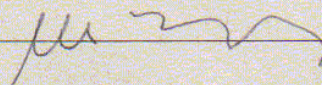
Professor (a) Doutor (a) Beate Saegesser Santos



Professor (a) Doutor (a) Helena Zerlotti Wolf Grotto



Professor (a) Doutor (a) Maria de Lourdes Rios Barjas Castro



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/09/2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F391e	<p>Fernandes, Heloise Pöckel</p> <p>Estudo das propriedades elétricas das hemácias utilizando pinça óptica / Heloise Pöckel Fernandes. Campinas, SP : [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores : Maria de Lourdes Barjas-Castro, Carlos Lenz César</p> <p>Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Pinças óticas. 2. Eritrócitos. 3. Hemaglutinação. 4. Potencial zeta. I. Barjas-Castro, Maria de Lourdes. II. César, Carlos Lenz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Título em inglês : Study of electrical properties of red blood cell using optical tweezers

Keywords: • Optical tweezers
• Erythrocytes
• Hemagglutination
• Zeta potential

À Deus por tudo.

Aos meus pais Moisés Dutra Fernandes e Ana Flora Pöckel Fernandes pelo amor, carinho e incentivo.

À Dr^a Malú, pela orientação, oportunidade, confiança, presteza e apoio na realização desse trabalho. Por estar sempre disposta a ajudar, pelo ensinamento e conhecimentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Prof^o Dr^o Carlos Lenz Cesar por ter cedido o espaço e oferecido todo apoio necessário para a realização da pesquisa.

À Adriana Fontes, sempre disposta a ajudar.

Aos meus irmãos, todos os meus familiares e amigos, que estiveram sempre ao meu lado pelo amor, carinho e apoio constante.

A todos os funcionários do laboratório de imunohematologia e aos alunos do laboratório de física, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

<i>DEDICATÓRIA</i>	<i>v</i>
<i>SUMÁRIO</i>	<i>vi</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>viii</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>x</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>xii</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xv</i>
<i>I - INTRODUÇÃO</i>	<i>17</i>
I.1 - Membrana eritrocitária.....	<i>18</i>
I.1.A - Viscosidade de membrana	<i>20</i>
I.1.B - Anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários	<i>23</i>
I.2 - Investigação imunoematológica.....	<i>25</i>
I.2.A - Fatores que influenciam a primeira fase da aglutinação.....	<i>26</i>
I.2.B - Fatores que influenciam na segunda fase da aglutinação.....	<i>29</i>
I.3 - Potencializadores.....	<i>34</i>
I.3.A - Solução salina de baixa força iônica (LISS).....	<i>35</i>
I.3.B - Enzimas proteolíticas	<i>35</i>
I.3.C - Dextran.....	<i>39</i>
I.3.D - Polietilenoglicol.....	<i>40</i>
I.4 - Pinça óptica.....	<i>41</i>
I.5 - Justificativas	<i>45</i>
<i>II - OBJETIVOS</i>	<i>46</i>
<i>III - MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>48</i>
III.1 - Pinça Óptica	<i>49</i>
III.1.A - Uso de microesferas nas medidas de força.....	<i>51</i>
III.2 - Coleta das amostras de sangue	<i>52</i>
III.3 - Medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta.....	<i>52</i>
III.3.A - Preparo das amostras	<i>53</i>
III.3.B - Metodologia de medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta	<i>53</i>
III.4 - Medidas de quantificação da força de agregação eritrocitária.....	<i>55</i>
III.4.A - Preparo das amostras	<i>55</i>
III.4.B - Metodologia de quantificação da força de agregação eritrocitária	<i>58</i>
III.4.C - Cálculos da medida de quantificação da força de agregação eritrocitária	<i>61</i>
III.5 - Análise Estatística	<i>62</i>

IV - RESULTADOS.....	63
IV.1 - Resultados das medidas do tamanho da dupla camada de íons.....	64
IV.2 - Resultados das medidas do potencial zeta.....	64
IV.3 - Resultado das medidas da força de agregação eritrocitária.....	65
V - DISCUSSÃO	69
VI - CONCLUSÕES.....	76
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
VI - ANEXOS.....	86
Anexo 1 - Termo de consentimento pós informado	87
Anexo 2 - Conceitos físicos	88
2.A - Conceitos de Mecânica: energia cinética, potencial e trabalho.	88
2.B - Conceitos de campo e potencial elétrico.....	89
2.C - Condutores e dielétricos.	90
Anexo 3 - Cálculos da medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta ..	93
Anexo 4 - Programa Matemático.....	95
Anexo 5 - Publicações e trabalhos apresentados	98

[Ac] – Concentração de anticorpos

[Ag] – Concentração de antígenos

AgAc – Complexo antígeno-anticorpo

CGS – Sistema de unidades (~~centímetro~~–~~grama~~–segundo)

CH – Concentrado de hemácias

Cl⁻ – Íons de cloreto

cP – Centipoise

CPDA₁ – Citrato, fósforo, dextrose e adenina

DHPN – Doença hemolítica peri natal

DLC – Dupla camada de Íons

GVHD – Doença do transplante versus hospedeiro

Ig – Imunoglobulina

K – Constante de equilíbrio

k₁ – Constante de associação

k₂ – Constante de dissociação

LISS – Solução de baixa força iônica

MKS – Sistema de unidades (~~metro~~–**kg** quilograma–segundo)

Na⁺ – Íons de sódio

PB – Polarizer bean splitter

PEG – Polietilenoglicol

pN – Pico newton

ε – Constante dielétrica do meio

E – Campo elétrico

η – Viscosidade

μ – Força iônica

σ – Eletronegatividade da hemácia

ζ – Potencial zeta

Figura 1 - Representação esquemática da membrana eritrocitária.	19
Figura 2 - Estrutura de uma molécula de ácido siálico.....	20
Figura 3 - Velocidade das camadas de um fluido viscoso entre duas superfícies.	21
Figura 4 - Diferença entre a tensão de cisalhamento e pressão.	22
Figura 5 - Classes de imunoglobulinas.....	24
Figura 6 - Representação de reação de hemaglutinação.....	25
Figura 7 - Diagrama ilustrando as forças envolvidas na ligação antígeno-anticorpo.....	26
Figura 8 - Representação esquemática das 4 principais forças envolvidas na interação antígeno e anticorpo.	28
Figura 9 - Diagrama mostrando a mínima distância para ligação de duas hemácias com moléculas de IgG e IgM.	30
Figura 10 - Representação esquemática das várias camadas de contra íons em torno de uma esfera carregada.	31
Figura 11 - Representação esquemática do Potencial Zeta.	33
Figura 12 - Ação de enzimas e sítios de clivagem na banda 3.	37
Figura 13 - Estrutura de um segmento de uma molécula de dextran.	39
Figura 14 - Estrutura química geral dos PEGs.	40
Figura 15 - Esquema das forças envolvidas na captura de partículas.	43
Figura 16 – Esquema de montagem de sistema de pinça óptica dupla.....	49
Figura 17 - Esquema de montagem dos espelhos para divisão do laser e formação da pinça dupla.....	51
Figura 18 - Esquema ilustrativo da câmara	53
Figura 19 - Representação esquemática da medida do tamanho da dupla camada de íons e do potencial zeta.	54
Figura 20 - Medida do tamanho da dupla camada de íons.	54
Figura 21 - Medida do potencial zeta.	55
Figura 22 - Medida de agregação de hemácia utilizando pinça óptica dupla.....	58
Figura 23 - Tela do controle de velocidade utilizado para medidas de agregação.	59
Figura 24 - Imagem da tela do programa Image Pró-Plus.....	60
Figura 25 - Modelo de membrana lipídica.	61

Figura 26 - Força óptica em função da velocidade.....	62
Figura 27 - “Box e whisker plot” comparando a distribuição das medidas de agregação eritrocitária.	66
Figura 28 - “Box e whisker plot” comparando a distribuição de agregação eritrocitária	67
Figura 29 - Imagem de uma hemácia na solução de PEG.....	68
Figura 30 - Cargas superficiais anulando o campo elétrico no interior de um condutor	90
Figura 31 - Esquema representativo de movimento de dipolo em um campo elétrico ..	91
Figura 32 - Estrutura de conjugações do beta caroteno.....	92

Tabela 1 - Descrição dos efeitos do tratamento enzimático por proteases na membrana da hemácia	38
Tabela 2 - Efeito do tratamento de hemácias com a enzimas bromelina, quimitripsina, dispase, ficina, neuramidase, papaína e tripsina.	39
Tabela 3 - Condições dos experimentos para mensuração da agregação eritrocitária. ..	56
Tabela 4 - Valores obtidos em uma das medidas de agregação eritrocitária.....	60
Tabela 5 - Cinco medidas do tamanho da dupla camada de íons (μm) de amostras controle..	64
Tabela 6 - Treze medidas do potencial zeta (mV) de amostras controle.....	65
Tabela 7 - Medidas de agregação eritrocitária (poise.cm) de amostras controle e amostras com diferentes soros anti-D.....	66

A membrana eritrocitária contém proteínas e glicoproteínas imersas em uma bicamada lipídica que possui um comportamento viscoelástico. Algumas glicoproteínas contém ácido siálico, que é o principal responsável pelas cargas negativas na superfície da hemácia que quando em solução cria um potencial elétrico (ζ) repulsivo. A carga elétrica negativa da superfície eritrocitária influencia na distribuição dos íons da solução ao redor da célula formando uma dupla camada de íons. A primeira, conhecida como camada compacta de cargas ou “Stern” é formada por íons rigidamente ligados à hemácia e a segunda camada é composta por íons distribuídos difusamente e conhecida como camada difusa.

O objetivo deste estudo foi medir o potencial zeta (ζ), a espessura da dupla camada das cargas iônicas (DLC) ao redor da hemácia, e a força de agregação eritrocitária com diferentes meios potencializadores da aglutinação utilizando pinça óptica.

Para medir DLC (d) e o potencial zeta (ζ) foi construída uma câmera com 2 eletrodos de platina separados por um canal. Um campo elétrico (E) foi aplicado com uma fonte de alta voltagem conectada aos eletrodos. A pinça óptica consiste de um laser de Nd: YAG fortemente focado através de uma objetiva de 100x de um microscópio acoplado com uma minicâmera que registra em tempo real as imagens das hemácias capturadas. As imagens foram gravadas em VHS e capturadas por um computador onde foram analisadas com auxílio do software Image pro-plus®. A pinça óptica utiliza transferência de um momento do fóton para capturar partículas com força de piconewtons. Hemácias de doadores foram coletadas e diluídas em plasma AB, posteriormente esferas de sílica foram adicionadas à solução de hemácias. A espessura da DLC(d) foi obtida medindo na câmara, o deslocamento do conjunto de uma hemácia ligada à uma esfera presa pela pinça, em diferentes voltagens. O potencial zeta (ζ) foi obtido medindo a velocidade terminal da hemácia (T_v) após ser solta da pinça óptica em

uma voltagem constante (100V)
$$T_v = \frac{\epsilon E}{\eta} \zeta$$
 ; onde ϵ = constante dielétrica do meio; η =

viscosidade). O DLC foi calculado pela equação
$$F_{op} = \frac{A\epsilon\zeta}{d} E$$
 (Fop= força óptica; A=

área da hemácia). A média da espessura da DLC (d) foi 0.85 μm (min 0.4/ max 1.3) e do potencial zeta (ζ) foi -14 V (min- 9.3/ max -15.5). Os resultados de potencial zeta estão de acordo com os encontrados na literatura, onde outros métodos são utilizados para medir as mesmas propriedades.

Nas medidas da agregação eritrocitária, uma esfera de sílica ligada a duas hemácias foi pinçada e mensurada a força que uma hemácia desliza sobre a outra em função de diferentes velocidades. Hemácias O Rh(D) positivas foram diluídas em plasma AB (grupo controle) e com potencializadores da aglutinação (dextran 0.15%, solução salina de baixa força iônica – LISS e enzima). A agregação também foi analisada usando anticorpos soro anti-D. A mediana da força de agregação eritrocitária de 20 amostras de hemácias foi de 1×10^{-3} (0.1-2.5) poise.cm. Amostras analisadas com dextran 0.15%, LISS e bromelina sem anticorpos não apresentaram aglutinação. Hemácias tratadas com enzima papaína apresentaram alta adesão impossibilitando o deslizamento entre as hemácias. As 15 hemácias analisadas com soro anti-D policlonal apresentaram força de agregação mediana de 2×10^{-3} (1.0-4.0) poise.cm. Os resultados obtidos de hemácias com anticorpo foram estatisticamente significativos ($p < 0.001$) quando comparadas com o controle. Em conclusão as metodologias propostas são simples, reprodutíveis e podem fornecer informações específicas sobre a interação e entre as hemácias e agregação eritrocitária. Os métodos apresentados permitem a análise individual de células e portanto são considerados mais sensíveis para pequenas diferenças do que aquelas baseadas em valores médios. O tamanho da espessura da dupla camada iônica utilizando pinça óptica foi pela primeira vez mensurado.

The red blood cell (RBC) membrane contains proteins and glycoproteins embedded in a fluid lipid bilayer that confers viscoelastic behavior. Sialylated glycoproteins of the RBC membrane are responsible for a negatively charged surface, which creates a repulsive electric zeta potential (ζ) between the cells. The compact layer of charge or Stern consists of ions rigidly bonded to the cell and the double layer includes ions diffusely distributed around the cell.

The aim of this study was to measure the RBC double layer thickness of the charge (DLC) around the cell, zeta potential (ζ) and cell aggregation force in agglutination potentiator solutions, using optical tweezers.

To measure DLC (d) and zeta potential (ζ) a special chamber was built consisting of 2 platinum electrodes separated by a channel. An external electrical field (E) was applied with a voltage power supply connected to the electrodes. The optical tweezers consisted of Nd:YAG laser beam focused through the 100x objective of a microscope equipped with a minicam, which registered the trapped cell image in real time. These images were recorded in VHS and captured in a computer where they could be analyzed using Image Pro Plus[®] software. Optical tweezers utilizes the light momentum transfer to trap the silica beads with pico Newton forces. RBC units from healthy blood donors were collected. Samples were diluted in AB plasma. Silica beads were added to a RBC solution. DLC thickness (d) was obtained measuring, in the special chamber, the force on the silica bead attached to a single RBC in response to an applied voltage. Zeta potential (ζ) was obtained by measuring the RBC terminal velocity (T_v) after being released from the optical trap at a constant voltage applied supply (100V) ($T_v = \frac{\epsilon E}{\eta} \zeta$; ϵ = medium dielectric constant; η = viscosity). The DLC was

calculated by the equation $F_{op} = \frac{A\epsilon\zeta}{d} E$ (F_{op} = optical force; A= RBC area). DLC median size (d) was 0.85 μm (min 0.4/max 1.3) and zeta potential was $\zeta = -14$ mV (min -9.3/max -15.5). These results were in accordance with the data in literature, where other methods to measure the same property were used.

For measuring RBC aggregation, a silica bead attached to RBCs was trapped and the force needed to slide one RBC over the other, as a function of the different velocities was determined. RBC O Rh(D) positive were diluted in plasma AB (control group) and in agglutination potentiator solutions, (dextran 0.15%, low ionic strength solution-LISS and enzymes). Aggregation was also analyzed using anti-D antibodies serum. The median aggregation force obtained of 20 RBC control samples was 1×10^{-3} (0.1-2.5) poise.cm. Samples analyzed with dextran 0.15%, LISS and bromelain lacking antibodies showed no agglutination. RBCs treated with papain enzyme presented high adherence preventing the capability of separating cells. The 15 samples analyzed with anti-D serum showed median aggregation force 2×10^{-3} (1.0-4.0) poise.cm. These results obtained from RBC with antibodies were statistically higher ($p < 0.001$) when compared to control. In conclusion, the methodologies proposed are simple and may provide specific information on RBC interaction in addition to cell aggregation. Individual cell analyze methods are always more sensitive to small differences than those based on average values. This is the first time that the size of the double layer was measured using optical tweezers.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Membrana eritrocitária

Os grupos sanguíneos humanos foram pela primeira vez descritos por Karl Landstainer em 1900, que após teste de aglutinação de hemácias com soros de diferentes indivíduos, propôs a existência de 3 grupos sanguíneos (A, B e O). Desde então, muitos antígenos foram descobertos e, atualmente, de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea, existem 308 antígenos reconhecidos, dos quais 270 estão agrupados em 30 sistemas de grupos sanguíneos (DANIELS et al, 2009).

Os grupos sanguíneos são definidos pela presença ou ausência de determinados antígenos na membrana eritrocitária. Essa membrana consiste basicamente em uma bicamada lipídica com proteínas e carboidratos. A bicamada lipídica é composta de fosfolipídios que possui uma estrutura básica com duas caudas hidrofóbicas (apolares) de hidrocarboneto, e uma extremidade hidrofílica que contém fosfatos e outros grupos carregados (polares). Essa natureza anfifílica dos lipídios é que determina a formação da bicamada lipídica. As moléculas de lipídios quando estão em meio aquoso tendem a agregar-se de forma que as caudas hidrofóbicas interagem entre si, excluindo água e permitindo que a extremidade hidrofílica fique exposta à água. Além dos fosfolipídios, moléculas de colesterol também compõem a bicamada. Esse tipo de lipídio possui em sua estrutura rígidos anéis de esteróides que diminuem a mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios, influenciando a mobilidade, fluidez e deformabilidade da membrana (VOET et al, 2000).

Diferentes proteínas estão distribuídas assimetricamente na bicamada lipídica e são compostas de aminoácidos que variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química. Os resíduos das extremidades da cadeia polipeptídica das proteínas fazem apenas uma ligação peptídica restando, em uma extremidade, um grupo amino livre chamado de amino terminal, ou n-terminal, e, na outra extremidade um resíduo carboxílico livre chamado de carboxi-terminal ou C-terminal. Os grupos aminos e carboxílicos dos aminoácidos ionizam-se prontamente, em pH fisiológico (~7.4). Os grupos aminos são protonados e os grupos carboxílicos assumem sua forma de base conjugada (carboxilato). As diferenças químicas e estruturais das proteínas são responsáveis pelas variadas formas com que ela se associa às moléculas de lipídios da membrana e baseado

nestas características as proteínas são classificadas em proteínas integrais, proteínas periféricas e proteínas ligadas a lipídios (VOET et al, 2000).

As proteínas integrais estão firmemente associadas à membrana através de ligações hidrofóbicas e podem atravessá-la múltiplas vezes ou apenas uma única vez. As duas proteínas integrais mais importantes na membrana eritrocitária são as glicoforinas e a proteína de canal iônico (Figura 1). Proteínas periféricas associam-se a membrana por meio de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio. A espectrina, anquirina e banda 4.1 são proteínas periféricas responsáveis pela preservação da forma côncava da hemácia. A proteínas também pode se ligar aos lipídeos através ligações covalentes (VOET et al, 2000).

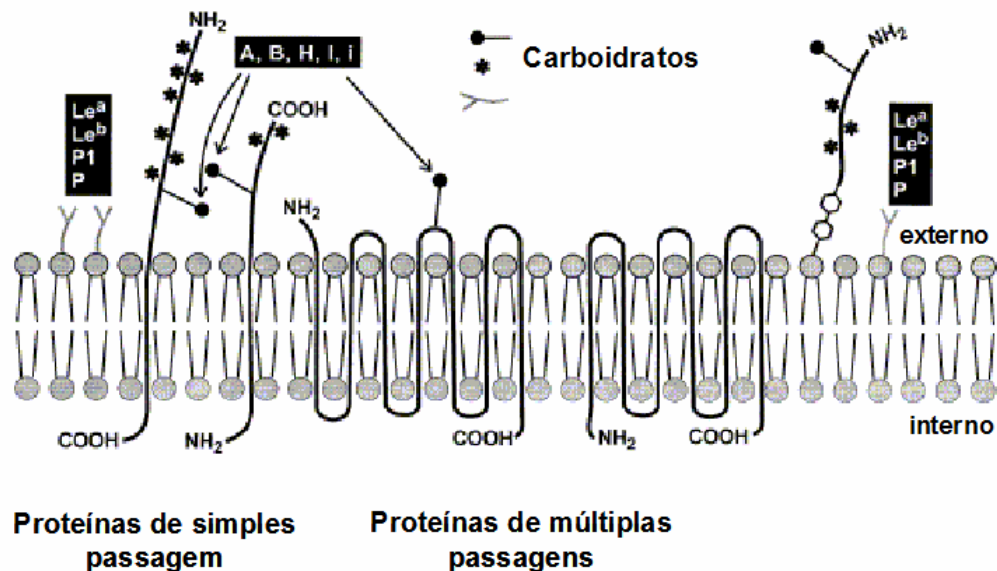


Figura 1 - Representação esquemática da membrana eritrocitária. Membrana composta pela dupla camada paralela de moléculas anfifílicas de lipídios e por proteínas que atravessam essa bicamada (passagem simples ou múltipla) As proteínas da membrana frequentemente possuem carboidratos ligados a ela como os antígenos eritrocitários Lewis, P, P1, A,B, H e I (FREY & REID, 1998).

Cadeias de oligossacarídeos (carboidratos) frequentemente estão ligados as proteínas e lipídios da membrana (Figura 1). Portanto, na superfície da célula possui uma grande quantidade de carboidratos que contém moléculas de ácido siálico (ácido

acetil neuramínico) que apresentam em sua estrutura um grupo carboxil (Figura 2) que é o principal responsável pelas carga negativas na superfície da hemácia (EYLAR et al, 1962, ALBERTS et al, 1997). O grupo carboxil em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), que é o maior responsável pela carga negativa eritrocitária.

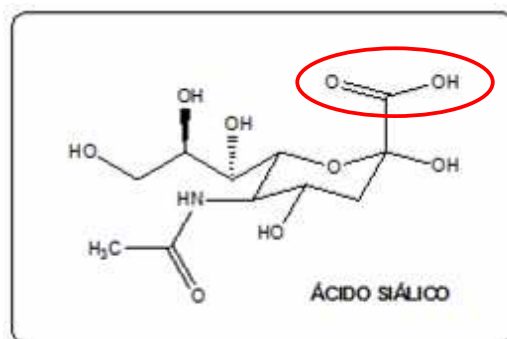


Figura 2 - Estrutura de uma molécula de ácido siálico. Em destaque grupo carboxil que em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), maior responsável pela negatividade eritrocitária.

As moléculas individuais dos lipídios e das proteínas, por não estarem ligados covalentemente, possuem liberdade e se movimentam lateralmente no plano da membrana. A fluidez da membrana é principalmente determinada pela porcentagem de moléculas de colesterol e de ácidos graxos insaturados, presentes nas moléculas de fosfolipídios. Devido essa mobilidade dos lipídios, a bicamada lipídica pode ser considerada um fluido bidimensional, cujo interior da bicamada possui viscosidade que pode ser comparada como a de um óleo lubrificante.

I.1.A - Viscosidade de membrana

No meio viscoso as diferentes camadas do fluido tendem a se fixar uma na outra e apenas deslizam umas sobre as outras quando uma força é aplicada entre elas. Considere a situação da Figura 3, contendo duas placas sólidas com um fluido viscoso entre elas. Uma das placas se move com velocidade u e a outra está em repouso. No escoamento sem turbulência a velocidade das camadas do fluido varia linearmente entre

uma placa e a outra como mostra a figura. A velocidade da placa é mantida por uma força, sem a qual desaceleraria e, eventualmente, pararia.

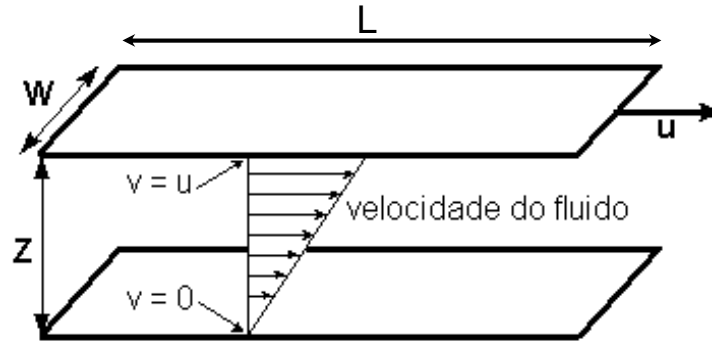


Figura 3 - Velocidade das camadas de um fluido viscoso entre duas superfícies.

Essa força depende da velocidade u e área $A = LW$ da placa e do inverso da distância z entre as duas placas, ou seja: $F = \eta A \frac{u}{z} = \eta LW \frac{u}{z}$. A constante de proporcionalidade η é chamada de viscosidade. Note que essa expressão poderia ser escrita como $\frac{F}{A} = \eta \frac{\Delta u}{\Delta z}$, com o significado de que a tensão, $\left(\frac{F}{A}\right)$, é proporcional ao gradiente de velocidade, $\frac{\Delta u}{\Delta z}$. Aqui a grandeza $\left(\frac{F}{A}\right)$ é semelhante à pressão, mas com uma grande diferença, pois a força é paralela à superfície e não perpendicular à mesma, como no caso da pressão. Ela é chamada tensão de cisalhamento ou “shear stress” em inglês. A figura 4 ilustra a diferença entre a tensão de cisalhamento, ou tensão de corte, e a pressão (HALLIDAY et al, 2001).

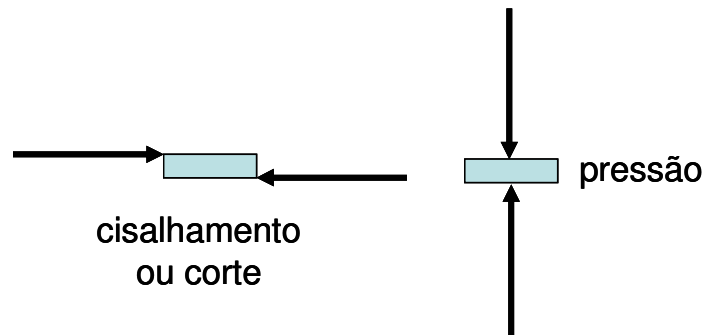


Figura 4 - Diferença entre a tensão de cisalhamento e pressão.

Expressando a viscosidade como $\eta = \frac{(F/A)}{(u/z)} = \frac{\text{força} \times \text{tempo}}{\text{área}}$, percebe-se que a

sua unidade no sistema MKS será,

$\frac{\text{Newton}}{\text{m}^2} \times \text{segundo} = \text{Pascal} \times \text{segundo}$. Um (pascal x segundo) é

chamado de Poiseuille, em homenagem ao médico francês, Jean Louis Poiseuille (1799 - 1869), que estudou as forças hidrodinâmicas na circulação sanguínea. Entretanto, a unidade no MKS é pouco utilizada, sendo mais comum a unidade no sistema CGS, $\frac{\text{dyna} \times \text{segundo}}{\text{cm}^2}$, chamada de poise, uma forma abreviada do nome Poiseuille

(HALLIDAY et al, 2001).

Uma idéia de ordens de grandeza pode ser obtida observando alguns valores típicos para a viscosidade de diferentes fluidos. Ar, um gás, tem viscosidade da ordem de $\eta_{ar} \simeq 2 \times 10^{-4} \text{ poise} = 0,02 \text{ centipoise [cP]}$. Já a viscosidade da água, um líquido, é da ordem $\eta_{água} \simeq 1 \times 10^{-2} \text{ poise} = 1 \text{ cP}$. A viscosidade do sangue é da ordem de $\eta_{sangue} \simeq 3 \text{ cP}$, do glicerol é de $\eta_{glicerol} \simeq 1.500 \text{ cP}$ e a viscosidade do mel varia entre $\eta_{mel} \simeq 2.000 \text{ cP}$ a $\eta_{mel} \simeq 10.000 \text{ cP}$. A viscosidade varia com a temperatura, por exemplo, a viscosidade da água é de 1 cP à 20°C, entretanto à 30°C o valor é de 10 cP (HALLIDAY et al, 2001).

Viscosidade Superficial de Membrana.

Quando temos um filme, como uma bolha de sabão, não existe mais a terceira dimensão. Isso significa que não existe mais o W da Figura 3. A força sobre uma linha, como uma “agulha” por exemplo, quando arrastada com uma velocidade u será dada por

$$F = \eta_s L \frac{u}{z}, \text{ onde } \eta_s \text{ é a viscosidade superficial (surface shear viscosity)}$$

(HALLIDAY et al, 2001). Também podemos expressar essa definição como

$$\frac{F}{L} = \eta_s \frac{\Delta u}{\Delta z}. \quad \text{A viscosidade superficial é dada por}$$

$$\eta_s = \frac{\left(\frac{F}{L}\right)}{\left(\frac{u}{z}\right)} = \frac{\text{força} \times \text{tempo}}{\text{comprimeto}}. \text{ No sistema CGS de unidades, a unidade de}$$

viscosidade superficial, portanto, é dada por:

$$\frac{\text{dyna} \times \text{segundo}}{\text{cm}} = \left(\frac{\text{dyna} \times \text{segundo}}{\text{cm}^2} \right) \times \text{cm} = \text{poise} \times \text{cm}$$

I.1.B - Anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários

Um antígeno induz a formação de um anticorpo específico, sendo que a especificidade depende de sua estrutura química, que possibilitará o contato estereoquímico entre o antígeno e seu específico anticorpo (DAVIES et al, 1990).

Anticorpos são proteínas globulínicas chamadas gamaglobulinas (Ig) e são divididas em classes distintas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Figura 5). Toda molécula de anticorpo possui a mesma característica estrutural básica composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas variando principalmente nas regiões de ligação ao antígeno. Tanto a cadeia pesada quanto cadeia leve possuem uma região amino terminal variável que participa do reconhecimento dos antígenos, e de regiões constantes carboxiterminais com funções efetoras. Cada anticorpo contém pelo menos dois sítios de ligação com o antígeno e podem se ligar a duas moléculas ao mesmo tempo, essa flexibilidade é conferida pela região de dobradiça (ABBAS, et al. , 2005)

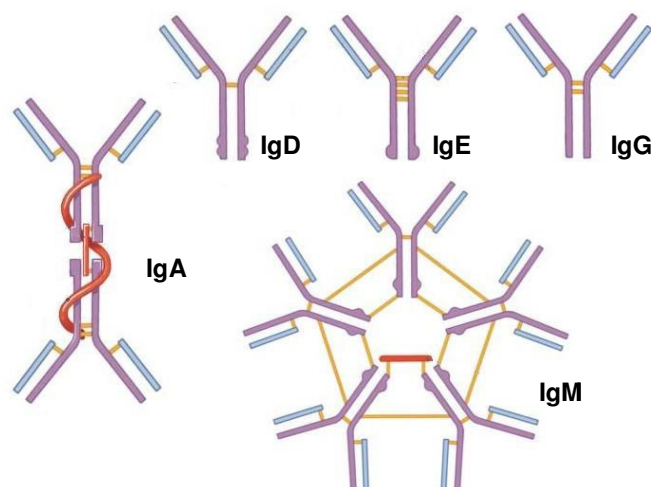


Figura 5 - Classes de imunoglobulinas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Os anticorpos imunes são produzidos em resposta a um estímulo antigênico, o primeiro estímulo leva a uma resposta imune relativamente fraca e de curta duração com produção de imunoglobulinas da classe IgM. Os contatos posteriores, com o mesmo antígeno, leva a uma resposta onde os níveis de anticorpos são elevados e permanecem no soro por períodos prolongados, e esses anticorpos são predominantemente da classe IgG (PETZ et al, 1996).

Os anticorpos contra grupos sanguíneos são divididos em dois grupos: aloanticorpos e autoanticorpos. Aloanticorpos são anticorpos imunes contra antígenos ausentes nas hemácias podendo ter sua produção estimulada por transfusão, gestação ou transplantes de órgãos. Autoanticorpos reconhecem antígenos do próprio indivíduo e são geralmente direcionados contra antígenos de alta frequência na população (MOLLISON et al., 2005).

A identificação laboratorial de anticorpos contra antígenos eritrocitários é de fundamental importância na prática transfusional, esses anticorpos podem levar à destruição celular "*in vivo*" de hemácias transfundidas causando reações hemolíticas, também podem atravessar a barreira placentária e provocar a doença hemolítica perinatal (DHPN), além de serem responsáveis por rejeições em transplantes de órgão (PETZ, et al 1996).

I.2 - Investigação imunohematológica

A ligação de anticorpos com antígenos da membrana eritrocitária pode levar a formação de um agregado de hemácias. Esse princípio de reação antígeno-anticorpo é chamado de hemoaglutinação e é amplamente utilizado em investigações imunohematológicas na prática transfusional (AABB, 2002).

Segundo POLLACK et al., (1977) a aglutinação é um fenômeno dinâmico que ocorre em duas fases. A primeira consiste na ligação das moléculas de anticorpos com os antígenos da superfície celular. Na segunda fase, ocorre a agregação das células sensibilizadas pelos anticorpos (Figura 6).

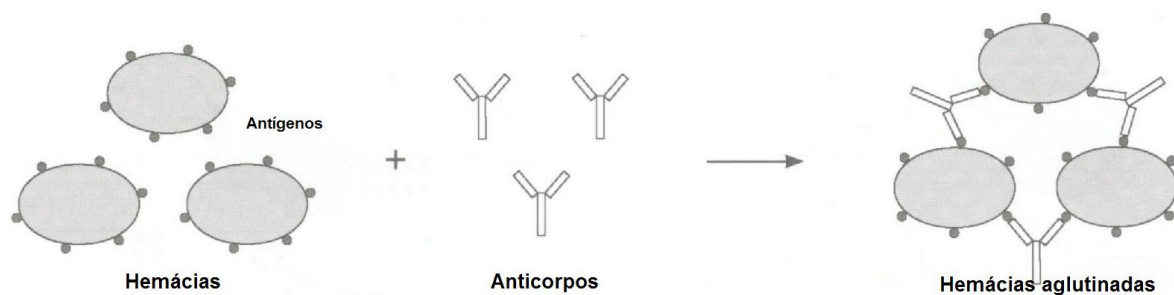


Figura 6 - Representação de reação de hemaglutinação. Antígenos eritrocitários e anticorpos formando um agregado de hemácias, fenômeno evidenciado na reação de hemaglutinação (PARSLOW, 2004).

A agregação das hemácias na segunda fase depende principalmente da soma de forças opostas, a força de agregação e de repulsão. A aglutinação irá ocorrer quando a força de agregação for maior que a de repulsão. (POLLACK et al., 1977). Força de repulsão é gerada pelas cargas negativas da superfície celular que ocorrem devido à presença de ácidos siálicos dos grupos carboxil da membrana eritrocitária (EYLAR et al., 1961, POLLACK et al., 1977) enquanto a força de agregação está relacionada à tensão superficial.

I.2.A - Fatores que influenciam a primeira fase da aglutinação

A ligação de um anticorpo com um antígeno ocorre devido à formação de múltiplas ligações intermoleculares reversíveis. Essas forças atrativas não covalentes são fracas quando comparadas às ligações covalentes, no entanto a formação de múltiplas ligações produz uma energia total de ligação suficiente para resistir a sua ruptura. A força de ligação entre o antígeno e o anticorpo é chamada de afinidade e é produzida pela somatória de forças atrativas e repulsivas. As forças de atração são dependentes da distância entre o sítio combinatório do anticorpo e o determinante antigênico (ABBAS, 2005).

As ligações não covalentes envolvidas na reação antígeno-anticorpo são pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações hidrofóbicas (Figura 7).

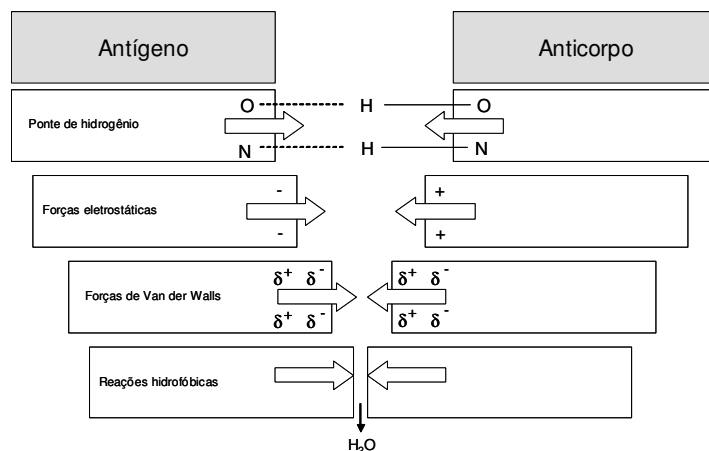


Figura 7 - Diagrama ilustrando as forças envolvidas na ligação antígeno-anticorpo. Forças hidrofóbicas e de Van der Waals agem quando existe uma distância muito pequena entre as hemácias. As interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio não exigem grande proximidade entre o antígeno e o anticorpo (ABBAS, 2005 - Modificada).

- Pontes de hidrogênio

Átomos de hidrogênio se ligam a dois átomos eletronegativos formando assim as chamadas pontes de hidrogênio. Essas interações são frequentemente observadas em terminais O-H-O, N-H-N e O-H-N e se caracterizam por uma ligação covalente de um átomo e com o outro, forças puramente eletrostáticas. As reações são exotérmicas e portanto são mais fortes em baixas temperaturas e usualmente associadas a um antígeno carboidrato (Figura 8) (ATKINS e PAULA, 2004).

- Interações eletrostáticas

Interações eletrostáticas ocorrem quando grupos carregados positivamente, como os grupos amina ($-\text{NH}_3^+$) nas cadeias laterais de aminoácidos, interagem com grupos carregados negativamente como o grupo carboxila ($-\text{COO}^-$). Resultam da atração entre cargas opostas de cadeias laterais de aminoácidos de uma proteína (Figura 8). O grau de ionização das moléculas é dependente do pH (ATKINS e PAULA, 2004).

- Forças de Van der Waals

Van der Waals é uma força de atração inespecífica que ocorre quando dois átomos estão próximos. A força é gerada pela interação entre nuvens eletrônicas e pontes de hidrogênio, que pode ser entre dipolos permanentes ou induzidos. Esta força depende da associação apolar e de grupos hidrofóbicos para que o contato com moléculas de água seja minimizado. Embora essas forças sejam muito fracas, elas podem se tornar coletivamente importante em reações envolvendo antígenos e anticorpos (Figura 8) (ATKINS e PAULA, 2004).

- Ligações Hidrofóbicas

A maioria das ligações formadas entre antígenos e anticorpos é hidrofóbica. A aproximação de dois grupos hidrofóbicos (apolares) em meio aquoso provoca a exclusão de moléculas de água da região de interação. Essas reações são endotérmicas, portanto ocorrem mais fortemente a temperaturas mais altas e estão associadas com antígenos de origem protéica (Figura 8) (ATKINS e PAULA, 2004).

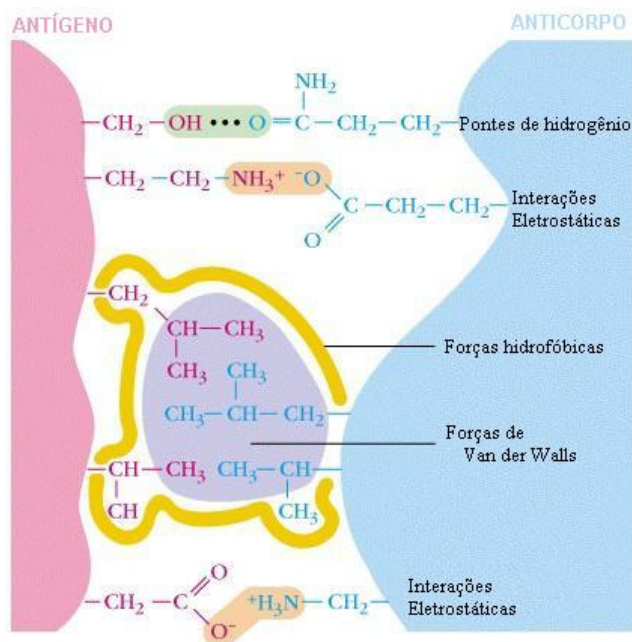
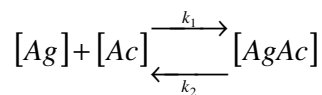


Figura 8 - Representação esquemática das 4 principais forças envolvidas na interação antígeno e anticorpo: pontes de hidrogênio (hidrogênio compartilhado entre átomos eletronegativos), interação eletrostática (atração entre cargas opostas entre grupos carregados positivamente e grupos carregados negativamente), forças de Van der Waals (Flutuação de nuvens de elétrons em torno de moléculas polarizam de maneiras opostas os átomos vizinhos) e forças hidrofóbicas (grupos hidrofóbicos reagem desfavoravelmente com a água e tendem a se agrupar provocando exclusão de moléculas de água, a atração também envolve forças de Van der Waals).

A contribuição de cada uma dessas forças de interação depende da especificidade do anticorpo e do antígeno envolvido, como a reação entre antígenos e anticorpos é reversível, a lei de ação das massas pode ser aplicada à reação como:



$$\frac{[AgAc]}{[Ag] \times [Ac]} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Onde a concentração (mol/L) de antígenos e anticorpos é representada respectivamente por $[Ag]$ e $[Ac]$, a concentração de ligação de antígenos e anticorpos é dada por $[AgAc]$, k_1 é a constante de associação, k_2 a constante de dissociação e K a constante de equilíbrio de associação que mede a afinidade entre o antígeno e anticorpo que define a estabilidade do complexo $AgAc$ formado (MOLLISON, 2005). Uma excessiva concentração de anticorpos pode produzir reações falso-negativas, pela saturação dos sítios antigênicos, esse efeito é conhecido como fenômeno de prozona. O grau de ionização das moléculas é dependente do pH do meio da reação. Mudanças de pH afetam ligações não covalentes e forças eletrostáticas. A dissociação do complexo antígeno-anticorpo pode ocorrer em pH reduzido (DANIELS, 2007).

A concentração de sal no meio da reação possui um efeito na ligação do anticorpo nos antígenos eritrocitários. Íons de sódio (Na^+) e Cloreto (Cl^-) em uma solução formam uma camada de íons ao redor da célula e neutralizam as cargas opostas. Redução da força iônica do meio da reação favorece a ligação entre o antígeno e o anticorpo de carga complementar (DANIELS, 2007).

I.2.B - Fatores que influenciam na segunda fase da aglutinação

Após a sensibilização das hemácias pela ligação de anticorpos com antígenos eritrocitários, ocorre a formação de pontes entre os anticorpos das células sensibilizadas permitindo a visualização da reação pela formação de aglutinados. Essa formação de pontes depende de fatores como o tamanho e características físicas dos anticorpos e a distância entre as células.

O tipo de anticorpo ligado na hemácia influencia diretamente na segunda fase da aglutinação, pois imunoglobulinas da classe IgG são moléculas pequenas em relação às imunoglobulinas IgM e esse fator impede a ligação cruzada com determinantes antigênicos situados próximos à bicamada lipídica. A distância mínima entre a membrana de duas hemácias suspensas em uma solução isotônica é de 180 Å, por outro lado a distância entre as duas valências da molécula de IgG é de apenas 120 Å (Figura 9). Assim, a aglutinação nem sempre ocorre quando o anticorpo for da classe IgG, pois o tamanho da molécula não é suficientemente grande para se ligar em determinados sítios antigênicos de duas células diferentes. Por outro lado à distância de 60 Å da

região Fc desses anticorpos ligados às hemácias é suficiente para permitir que outros anticorpos anti-IgG promovam a formação de pontes entre células sensibilizadas. Moléculas IgM são maiores e multivalentes permitindo fácil aglutinação direta (VAN OSS, C.J., 1983).

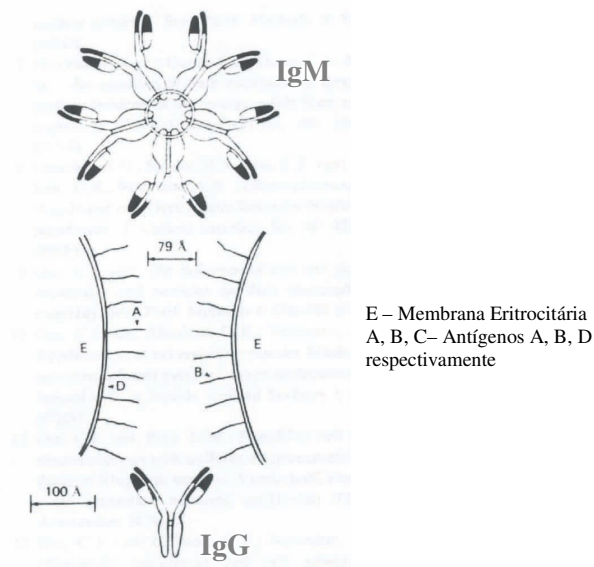


Figura 9 - Diagrama mostrando a mínima distância para ligação de duas hemácias com moléculas de IgG e IgM desenhadas em escala (100Å). A, B e D (Rh₀) determinantes antigênicos da membrana eritrocitária (VAN OSS, 1983).

Características antigênicas também interferem na aglutinação assim com localização e quantidades expressas na membrana eritrocitária. As glicoforinas, por exemplo, são proteínas longas que sustentam muitas cadeias de carboidratos como os antígenos eritrocitários do sistema ABO. As glicoforinas são consideradas as principais proteínas expostas na superfície externa da membrana. Por apresentarem uma localização estratégica na membrana favorecem a formação de aglutinados de hemácias até mesmo com moléculas pequenas como as imunoglobulinas IgG (MOLLISON et al., 2005).

A distância entre as hemácias em uma solução eletrolítica é um importante fator para a aglutinação, pois as hemácias são envolvidas por uma nuvem de cátions do meio. Essa região de nuvem iônica gera uma diferença de potencial em relação ao meio, chamado de potencial zeta e faz com que os eritrócitos permaneçam separados uns dos outros (POLLACK et al., 1977).

Para melhor compreensão das discussões sobre potencial zeta, foram descritos no Anexo 2, alguns conceitos físicos de energia cinética, potencial, trabalho, campo, potencial elétrico, condutores e dielétricos.

Potencial Zeta.

Em um campo elétrico gerado por uma partícula em um meio eletrolítico os íons podem se movimentar, tendendo a se comportar como um metal. O movimento browniano tende a dispersar os íons. Quando uma carga é colocada nesse meio ela atrai uma nuvem de contra íons que tenderão a anular o campo elétrico no exterior da partícula. A medida que camadas de contra íons vão se acumulando, o campo elétrico vai diminuindo, e a atração dos contra íons diminui. Isso implica que a densidade de contra íons em volta da partícula carregada vai diminuindo com a distância, assim como o campo elétrico e o potencial elétrico. Existe uma camada de contra íons tão fortemente ligada que se move junto com a partícula carregada. O potencial elétrico na superfície de cisalhamento entre a camada que se move com a partícula e a camada deslizante, é chamado de potencial zeta (LI et al, 2006). A Figura 10 define o nome das várias camadas de contra íons em torno de uma esfera carregada.

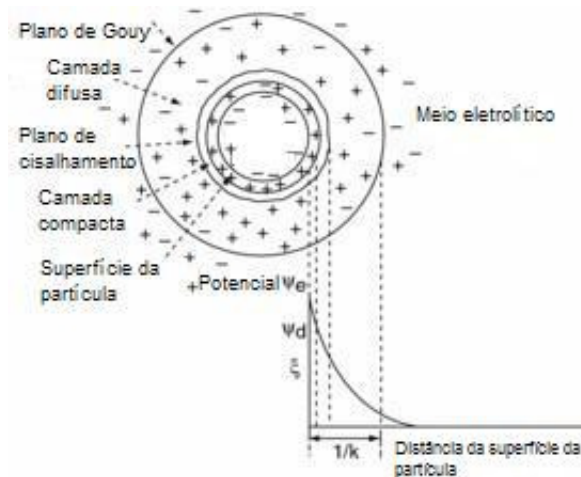


Figura 10 - Representação esquemática das várias camadas de contra íons em torno de uma esfera carregada, em um meio eletrolítico (LI et al, 2006).

Quanto maior for o potencial zeta maior será a repulsão entre duas partículas idênticas carregadas. As variáveis que influenciam nessa repulsão estão descritas abaixo:

1. A concentração e força iônica dos contra íons. Íons duplamente carregados blindam o campo da carga mais eficientemente do que íons com carga simples (HUNTER, 1981).

2. A constante dielétrica do meio. O campo percebido pelos contra íons diminuiu com o aumento da constante dielétrica do meio devido ao papel de blindagem dos dipolos (HUNTER, 1981).

Potencial zeta eritrocitário

A formação dessa nuvem iônica entre as hemácias em solução eletrolítica ocorre pela presença de cargas negativas na superfície da hemácia que em contato com o meio aquoso polar torna-se eletricamente carregada. A carga da superfície eritrocitária influencia a distribuição espacial dos íons do meio aquoso que estão próximos à sua superfície, atraindo íons de cargas opostas e repelindo íons de mesma carga até que os íons livres em solução atinjam um ponto de neutralização elétrica sobre a superfície da hemácia. Esse rearranjo na disposição dos íons livres em solução leva à formação de duas camadas elétricas na interface da hemácia com o líquido. A primeira camada, comumente chamada de camada compacta, ou camada de Stern, é formada por íons positivos que se aproximam da superfície eritrocitária negativa por uma forte atração eletrostática. Mesmo com a formação dessa camada iônica, íons positivos são ainda atraídos pelas cargas negativas da hemácia, mas agora são repelidos pela camada de “Stern”, resultando na formação de uma outra camada conhecida como camada difusa que possui uma alta concentração de íons positivos nas proximidades da hemácia e diminui gradualmente com a distância até que alcança o equilíbrio iônico da solução (HUNTER, 1981, NI et al, 2003, SZE et al, 2003).

Essa diferença de concentração iônica causa um potencial eletrocinético entre a superfície eritrocitária e as camadas iônicas ao redor da hemácia. A região limite entre a camada compacta e a camada difusa é chamada de ponto de cisalhamento, nesse ponto ocorre uma maior diferença de potencial, chamado de potencial zeta (Figura 11).

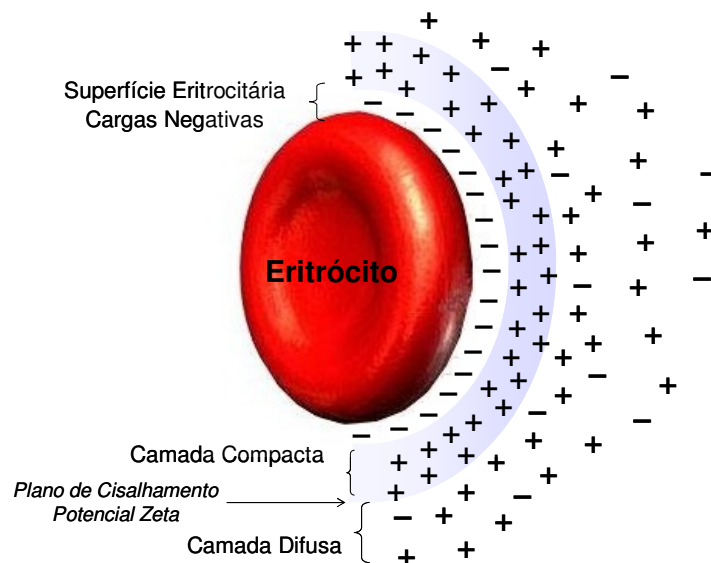


Figura 11 - Representação esquemática do Potencial Zeta. Hemácias (cargas negativas) em suspensão provocando um rearranjo das cargas do meio com a formação de duas camadas iônicas que geram uma diferença de potencial entre elas, chamado de potencial zeta. (POLLACK et al, 1977 - Modificada).

O potencial no ponto de cisalhamento pode ser quantificado baseado no princípio da eletroforese onde partículas carregadas se movimentam com uma velocidade fixa em um campo elétrico. A mobilidade da partícula está relacionada com a constante dielétrica e a viscosidade do meio líquido e com o potencial elétrico (HUNTER, 1981, LI & TIAN, 2006).

Quanto maior for a concentração de íons no meio, maior será o tamanho da camada compacta e maior será a velocidade da partícula quando submetida a um campo elétrico. Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície e altera o potencial zeta. Dessa forma, o potencial zeta depende da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a

carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética. Esse valor entra nas equações de Smoluchowski ou a de Debye, que são as mais utilizadas para calcular o potencial zeta (HUNTER, 1981, SZE et al, 2003).

Quanto maior o potencial zeta, as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. Desta forma, valores baixos podem levar à agregação. Segundo POLLACK (1977), o potencial zeta (ζ) pode ser demonstrado pela equação $\zeta Z = f \left[\sigma, \frac{1}{D}, \frac{1}{\sqrt{D\mu}} \right]$ e pode ser modificado por eletronegatividade da hemácia (σ), constante dielétrica do meio (D) e força iônica do meio(μ).

Outro fator que interfere na agregação das hemácias em um meio salino é a atração intercelular induzida pelas forças de Van der Waals (VAN OSS et al, 1983).

I.3 - Potencializadores

Nas reações imunohematológicas, pode se obter uma aglutinação artificial de hemácias sensibilizadas modificando o potencial zeta, através da alteração da força iônica do meio (MOORE et al, 1976), e da redução das cargas elétricas negativas da superfície eritrocitária. A remoção de moléculas de ácido siálico pelo tratamento das hemácias com enzimas proteolíticas permite a redução das cargas negativas eritrocitárias (STRATTON et al., 1973, LUNER et al, 1975).

Outra forma de diminuir o potencial zeta é aumentando a constante dielétrica, através da variação da composição do meio pela adição de substâncias macromoleculares como a albumina (POLLACK et al., 1977), Dextran (BUXBAUM 1982), Polietilenoglicol e outros (AABB, 2002).

I.3.A - Solução salina de baixa força iônica (LISS)

Uma proteína possui muitos grupos carregados positiva e negativamente provenientes das cadeias laterais dos aminoácidos. As moléculas irão interagir umas com as outras, com pequenos íons de cargas opostas e com água, assim, ocorrem interações proteína-proteína, proteína-água e proteína-íons.

Moléculas de água apresentam maior capacidade de solvatação de partículas menores como os íons, portanto os sais tendem a desidratar as proteínas, atraindo as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas protéicas. Quando as proteínas estão em soluções com baixas concentrações de sais há um aumento da quantidade de moléculas de água fixadas à moléculas protéicas.

Soluções salinas de baixa força iônica consistem em uma solução com menor concentração de cloreto de sódio. A solução descrita como LISS por Löw e Masseter (1974) propõe uma redução de 20% de cloreto de sódio quando comparado com uma solução isotônica normal. A formula proposta se caracteriza por apresentar uma solução salina 0.17M /180 mL, tampão fosfato 0.15M /20 mL e sódio glicinado 0.3M/ 800 mL (LOW & MASSETER, 1974).

Reduzindo o número de íons de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) livres em solução, a camada iônica ao redor da hemácia será menor favorecendo ligações não covalentes que são dependentes da distância entre o sítio combinatório dos anticorpos com o determinante antigênico na membrana eritrocitária. A taxa de associação de antígenos e anticorpos será maior necessitando, desta forma, de menor tempo de incubação para a formação de complexos antígenos / anticorpos (DANIELS 2007).

I.3.B - Enzimas proteolíticas

Várias enzimas proteolíticas são utilizadas como potencializadores de reação de aglutinação como tripsina, quimiotripsina, ficina, neuramidase, papaína e a bromelina. Entre elas as duas últimas são as mais utilizadas como potencializadores em reação de aglutinação.

A enzima papaína (EC 3.4.22.2) pertence à família de protease de cisteína C1. Consiste de uma única cadeia polipeptídica simples, não glicosilada com 212 aminoácidos, 3 pontes dissulfeto e um grupo sulfidril necessário para a sua atividade. Esta enzima é extraída do látex do mamão *Carica papaya*. (BARRET et al, 1998, BEYNON & BOND, 1989)

A enzima bromelina (EC 3.4.22.32) pertence à família de protease de cisteína C1. É uma endopeptidase extraída do talo do abacaxi (*Anana comosus*) e possui uma cadeia simples, glicosilada com sete aminoácidos cisteína e prováveis 3 pontes dissulfídricas. (BARRET et al, 1998, BEYNON & BOND, 1989)

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. As proteases constituem uma grande família, dividida em exopeptidases e endopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia do aminoácido. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região amino ou carboxi terminal livre, liberando resíduo de aminoácido e peptídeos. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica entre as regiões amino e carboxi terminal e não aceitam substratos com grupos terminais amino ou carboxílico carregados. Elas podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo de seu sítio ativo envolvido com a catálise em serina-, cisteína-, aspártico- e metallo- endoproteínases. (BARRET et al, 1998, BEYNON & BOND, 1989)

Serina peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico-peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metallo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico. (BARRET et al, 1998, BEYNON & BOND, 1989)

O mecanismo usado para clivar uma ligação peptídica envolve a produção de um resíduo de aminoácido (peptidases de serina, cisteína e treonina) ou a formação de uma molécula de água nucleofílica (peptidases de ácido aspártico e ácido glutâmico e metaloproteases) capaz de atacar o grupo carbonil da ligação peptídica. Grupos doadores de prótons presentes no aminoácido histidina são os responsáveis pela ativação do grupo sulfidril de um resíduo de cisteína de seu sítio ativo (BARRET et al, 1998, BEYNON & BOND, 1989).

Hemácias tratadas com enzimas proteolíticas são principalmente utilizadas em imunohematologia para a pesquisa de anticorpos, pois a remoção de fragmentos de glicoproteínas na membrana eritrocitária permitem maior proximidade entre as hemácias e melhor acesso dos anticorpos aos antígenos eritrocitários (DANIELS 2007) (Figura 12) (

Tabela 1).

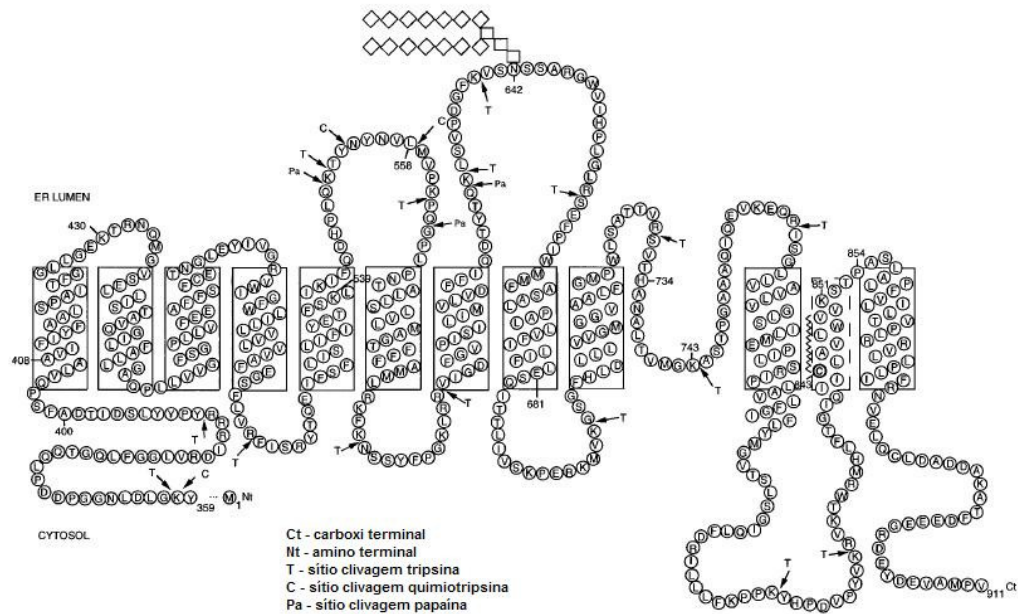


Figura 12 - Ação de enzimas e sítios de clivagem na banda 3, maior glicoproteína da membrana eritrocitária. Modelo de um segmento de proteína banda 3 da membrana eritrocitária contendo 12 segmentos transmembrana. Indicação do sítio de clivagem das enzimas tripsina (T), quimiotripsina (C) e papaína (P) (POPOV et al. 1997).

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

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

A remoção de ácido siálico reduz diretamente a carga elétrica da superfície eritrocitária o que provoca uma redução do potencial zeta (

Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento de hemácias com as enzimas bromelina, quimitripsina, dispase, ficina, neuramidase, papaína e tripsina. Os resultados foram obtidos a partir das medidas de potencial zeta (ξ) (OMI et al., 1994).

Enzimas	Potencial Zeta ξ (mV)	% de redução de do Potencial Zeta
Bromelina	-6.05	55.8
Quimitripsina	-7.91	42.3
Dispase	-9.04	34.0
Ficina	-4.38	68.0
Neuramidase	-1.31	90.4
Papaína	-8.52	37.8
Tripsina	-7.28	46.8
Normal	-13.70	0

I.3.C - Dextran

Dextran é um polissacarídeo de carboidrato produzido por fermentação da sacarose por *Leuconostoc mesenteroides* que converte a sacarose a dextrano (Figura 13). Ele pode ser utilizado como substituto ao plasma em pacientes hipovolemicos, porém pode induzir a agregação de hemácias.

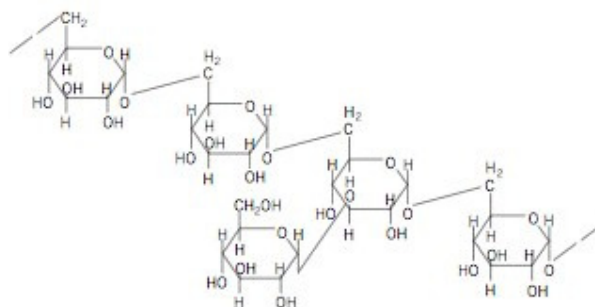


Figura 13 - Estrutura de um segmento de uma molécula de dextran.

Os mecanismos do dextran envolvidos na agregação eritrocitária ainda não estão completamente esclarecidos e dois modelos experimentais foram descritos. No primeiro (CHIEN & JAM 1973, CHIEN et al. 1983, PRIBUSH et al. 2007) a formação de pontes entre as células ocorre quando macromoléculas de polímeros são adsorvidas à superfície celular devido à alta afinidade do polissacarídeo à membrana da hemácia. A camada de polímero adsorvida altera o potencial químico dos íons na parte difusa da dupla camada elétrica movendo o plano de cisalhamento para longe da superfície alterando o potencial zeta. O segundo modelo (BROOKS et al., 1973 e NEU et al. 2008) propõe que a agregação ocorre por redução de proteínas ou polímeros localizados próximos à superfície celular em relação ao meio. Essa exclusão de macromoléculas provoca um gradiente osmótico e movimentação de fluidos para fora do espaço intercelular criando uma pressão negativa que leva à atração entre as células.

I.3.D - Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, obtido por polimerização do óxido de etileno com moléculas de água e disponível em uma grande variedade de pesos moleculares (Figura 14). Solubiliza-se em água e em alguns solventes orgânicos como tolueno, cloridrato de metileno, etanol e acetona, por essa característica de solubilidade é freqüentemente descrito como anfifílico (HARRIS, 1992).

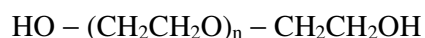


Figura 14 - Estrutura química geral dos PEGs onde n representa o grau de polimerização.

O grupo terminal hidroxila da molécula de PEG fornece um sítio para ligações covalentes a outras moléculas e/ou superfícies. Moléculas na qual o PEG normalmente está ligado permanecem ativas, demonstrando que a ligação do PEG não desnatura proteínas ou dificulta a aproximação de outras moléculas pequenas. Sendo não

antigênico nem imunogênico vem sendo amplamente utilizado na biotecnologia e biomedicina, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Não provoca a diminuição da atividade de proteínas, sendo biodegradável e atóxico (HARRIS, 1992).

A formação de sistema de duas fases de polímeros aquosos é utilizada na purificação de materiais biológicos por separação entre duas fases formadas pela solução de dois polímeros (tipicamente PEG e dextran) em tampão aquoso (HARRIS, 1992).

Em 1977 pesquisas pioneiras de Abuchowski e colaboradores descreveram o potencial de conjugar PEG às proteínas por ligações covalentes. Esta técnica é bem conhecida hoje como peglação que é o processo de unir as cadeias do polímero PEG a proteínas, enzimas e drogas ajudando a mudar e melhorar na segurança e eficiência terapêutica. Produzem alterações das propriedades físico-químicas incluindo mudanças na conformação, ligações eletrostáticas, hidrofobicidade etc. Essas mudanças físicas e químicas aumentam a retenção de determinados agentes terapêuticos além de influenciar na afinidade de ligações do meio terapêutico com receptores celulares alterando o padrão de absorção e distribuição (HARRIS, 1992).

PEG em meio aquoso atua como uma molécula muito móvel com uma grande capacidade de exclusão de água e outros polímeros (HARRIS, 1992). Dessa forma sua ação é eliminar a água da superfície da hemácia, aumentando a concentração de anticorpos e favorecendo a ligação dos anticorpos com os sítios antigênicos (DEMAN & OVERBEEKE, 1990).

I.4 - Pinça óptica

Em 1986, Ashkin e colaboradores demonstraram o uso de uma técnica para capturar partículas dielétricas, como micro-esferas e células, baseada na transferência de momento¹ dos fótons. Essa transferência de momento da luz foi descoberta por Einstein

¹ A segunda lei de Newton da mecânica, força igual a massa vezes aceleração, pode ser escrita como $\vec{F} = m \frac{\Delta \vec{v}}{\Delta t} = \frac{\Delta(m \vec{v})}{\Delta t}$. A grandeza vetorial $\vec{p} = m \vec{v}$ é chamada de momento linear, ou simplesmente momento. Também se chama Quantidade de Movimento. Em termos do momento a força vetorial pode

para explicar o Efeito Fotoelétrico, trabalho pelo qual ele ganhou o prêmio Nobel. Nesse trabalho ele criou o conceito de partículas de luz, que chamou de fótons, capazes de transportar momento mecânico e energia. Os trabalhos iniciais de levitação de partículas com luz de Ashkin utilizavam até seis feixes de laser contra-propagantes, dois para cada dimensão x, y e z, para capturar ou levitar partículas nas três dimensões. Por volta de 1986 ele percebeu que seria suficiente um feixe apenas, mas altamente focalizado, para capturar partículas nas três dimensões. É essa captura com apenas um feixe que é hoje denominada Pinça Óptica.

Uma pinça óptica a laser consiste, portanto, de um único feixe de laser que após incidir perpendicularmente em uma lente, tem seus raios fortemente focalizados num ponto interior a uma partícula. Para comprimentos de ondas menores do que as partículas aprisionadas, a captura pode ser entendida a partir do desvio da trajetória dos raios da óptica geométrica. Existe, portanto, uma transferência de momento sempre que a trajetória de um raio é desviada.

A forma mais intuitiva de entender o princípio de operação da “armadilha óptica” é examinar dois raios, um de cada lado, de um feixe de laser cônico que se encontrarão no foco. Pode-se imaginar o fóton como uma partícula que ao ter sua trajetória desviada obriga o objeto que a desviou a sofrer um recuo na direção de \vec{F} , como mostra a Figura 15a. Os raios a e b da Figura 15b se encontrariam no foco f se não houvesse a esfera. O desvio desses raios produz os recuos na direção \vec{F}_a e \vec{F}_b , e a combinação dos dois leva ao recuo na direção \vec{F} . O recuo \vec{F} tende a obrigar o centro da esfera (o) a coincidir com o foco do laser f . Desta forma, um feixe de laser focalizado cria uma armadilha que mantém o centro das partículas no foco do laser.

ser escrita como $\vec{F} = \frac{\Delta \vec{p}}{\Delta t}$, ou seja, sempre haverá uma força associada à uma variação do momento.

Note que, como momento é um vetor, basta uma mudança na direção do momento para que uma força seja criada.

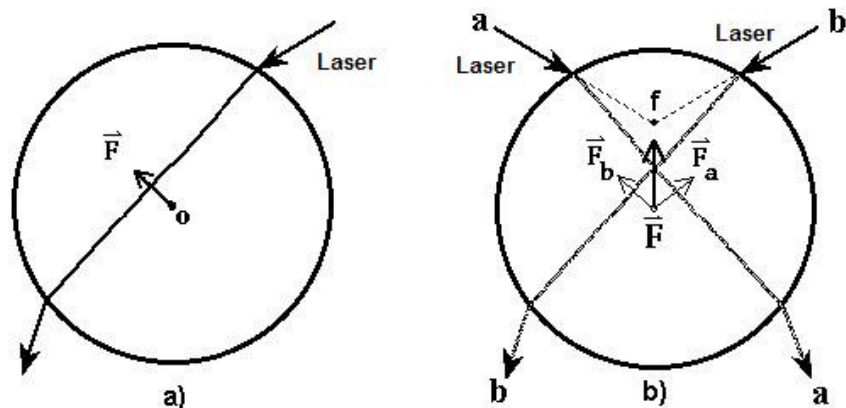


Figura 15 - Esquema das forças envolvidas na captura de partículas. a) Sentido do desvio sofrido pelo objeto quando o laser (fóton) incide sobre esse objeto. b) Centro da esfera coincidindo com o foco de dois raios de laser produzindo uma força que mantém a esfera aprisionada no foco do laser.

As forças ópticas por desvio da trajetória dos raios são muito pequenas. Pinças ópticas muito boas podem gerar forças de até 200 pico-Newtons [200×10^{-12} N], com potências de laser abaixo do limiar de danos térmicos às partículas. Apesar das forças ópticas envolvidas nessa pinça serem muito pequenas, em torno de 0,1 a 200 pico-Newtons, as acelerações podem ser muito grandes devido à massa muito pequena no caso de partículas microscópicas. Um cubinho de $1\mu m \times 1\mu m \times 1\mu m$ de água tem um volume de $10^{-18} m^3 = 10^{-15}$ litros, com uma massa, portanto, de $10^{-15} kg$. A aceleração

devido à força óptica para essa partícula seria de
$$a = \frac{F}{m} = \frac{200 \times 10^{-12} N}{10^{-15} kg} = 2 \times 10^5 m/s^2$$

que corresponde a 2×10^4 gravidades. O aumento da dimensão da partícula por um fator de 10 aumenta sua massa por um fator de 1000, logo a aceleração máxima para uma partícula de 10 μm seria de 20 gravidades, e para uma partícula de 100 μm seria de 0,02 gravidades. Assim a pinça óptica é capaz de capturar partículas com tamanhos até da ordem de 30 - 50 μm .

Desde os primeiros trabalhos então, a pinça óptica vem sendo amplamente utilizada em diferentes áreas da biologia celular em duas vertentes: (1) como micro-ferramenta de manipulação e (2) como micro-ferramenta de medida de propriedades

bio-mecânicas no nível microscópico. A vantagem da pinça óptica como ferramenta para medidas de propriedades biomecânicas é a sua sensibilidade, podendo medir forças tão pequenas quanto 10 femto-Newtons [10^{-15}] até 200 pico-Newtons. Existem situações em que a força de adesão ultrapassa 100-200 pico-Newtons, nas quais a pinça óptica não deve ser utilizada. Nesse caso a técnica de contacto de força atômica pode alcançar até o intervalo de nano [10^{-9}] Newtons.

Como micro-ferramenta de manipulação, a pinça óptica já foi utilizada para inserir DNA no interior de diferentes tipos de células (BUER et al., 1997), e mesmo para fertilizações *in vitro* e fusão de células (OBRUCA et al., 1997).

Como ferramenta de medida, a pinça óptica já foi utilizada para mensurar forças de proteínas do miocárdio (miosinas) (SUGIURA et al., 1998), para caracterização de motores biológicos moleculares (THOMAS et al., 1998) e rigidez flexural de microtúbulos (FELGNER et al., 1996), para medir o comprimento de uma molécula de DNA (SAGATA & SOGAWA et al., 1998) e até a motilidade de espermatozóides humanos KONIG et al., 1996). Os trabalhos anteriores do grupo de pesquisa da UNICAMP envolveu a medida de elasticidade de hemácias em diversas condições patológicas e fisiológicas (HURUTA et al., 1997, HURUTA et al, 1998, BARJAS-CASTRO et al, 2000, BRANDÃO et al, 2003a, BRANDÃO et al, 2003b).

I.5 - Justificativas

A mensuração das cargas eritrocitárias poderá contribuir para o melhor desempenho do teste de hemoaglutinação utilizados na rotina transfusional.

- Em serviços de hemoterapia, a grande maioria dos testes imunohematológicos transfusionais é baseado em reações específicas entre antígenos e anticorpos. Os anticorpos antieritrocitários IgG são monômeros, e não são capazes de sensibilizar e aglutinar sem a adição na reação de elementos que aproximam as hemácias. Para tanto, é necessária a introdução de substâncias potencializadoras que geralmente atuam no potencial zeta e diminuem a distância entre as células favorecendo a aglutinação. A especificidade e sensibilidade das reações imunohematológicas dependem diretamente do uso adequado destas substâncias. Existem no mercado diversos tipos de potencializadores utilizados nas rotinas transfusionais, porém, a padronização das reações é baseada exclusivamente no desempenho de testes qualitativos, verificando a presença ou ausência de aglutinados celulares. Assim, uma avaliação quantitativa da eficiência das diferentes substâncias potencializadoras ou mesmo de novos produtos poderiam melhorar a qualidade dos testes imuno hematológicos pré-transfusionais e principalmente facilitar a padronização em rotinas automatizadas.

Uma metodologia que permita o estudo do comportamento elétrico das cargas eritrocitárias poderá no futuro contribuir para a melhor compreensão de alterações de membranas presentes em diversas doenças hematológicas, durante o armazenamento e irradiação de concentrado de hemácias (CH) para fins transfusionais e também em doenças trombóticas e vaso oclusivas.

II - OBJETIVOS

Desenvolver métodos, utilizando pinça ótica dupla que permitam:

- Mensurar o potencial zeta e o tamanho da dupla camada de cargas ao redor da hemácia.
- Mensurar a força de agregação eritrocitária utilizando a pinça ótica dupla em hemácias diluídas em plasma humano normal e associado a meios potencializadores da reação de aglutinação.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - Pinça Óptica

O sistema de pinça óptica utilizado nesse trabalho (Figura 16) foi constituído de um feixe de laser Nd:YAG (neodímio: yttrium aluminum garnet) que opera de modo contínuo no infravermelho, em um comprimento de onda de 1064 nm, pois nessa região a absorção é pequena e não há danos celulares. O feixe de laser passa por um conjunto de lentes e é focalizado na amostra através de uma objetiva de 100x (abertura numérica 1.25), que está acoplada a um microscópio (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) equipado com uma minicâmera (JVC Company of America, Elmwood, NJ) que registra a imagem em tempo real. As imagens obtidas foram visualizadas em televisão ou monitor de microcomputador e também foram gravadas em fita VHS ou diretamente no computador através de uma placa de captura de vídeo. Desta forma, as imagens obtidas puderam ser analisadas qualitativamente com auxílio do software Image Pró-Plus (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD), que permitiu determinar o espaço percorrido por uma hemácia ou o deslocamento sofrido pela esfera.

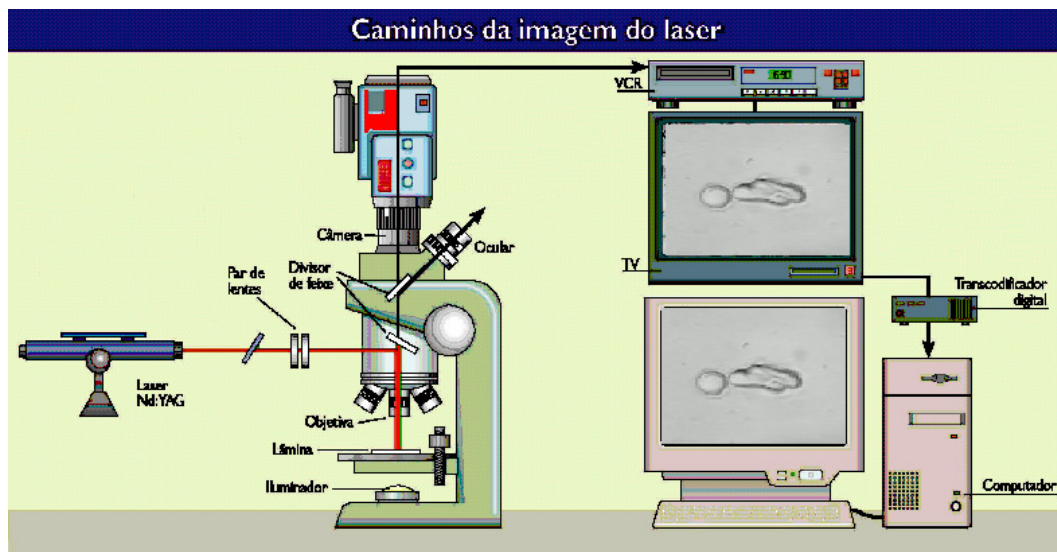


Figura 16 – Esquema de montagem de sistema de pinça óptica dupla (Revista Pesquisa Fapesp, 2000).

Focalizando dois feixes de laser em duas posições diferentes obtém-se uma pinça óptica dupla, com a qual é possível exercer tração em uma partícula puxando as extremidades em direções opostas. Para medir a força de tração uma das pinças não deve prender diretamente a partícula, mas uma microesfera pré-calibrada que se liga fortemente na partícula. Nesse caso, a medida do deslocamento dessa microesfera fornece o valor da força.

Pinça Dupla.

A pinça óptica dupla foi montada utilizando um laser que possui polarização paralela. Este sistema apresenta como vantagens, bom desempenho e manutenção da potência. Uma placa de meia onda foi utilizada para permitir que a polarização girasse livremente além de possibilitar uma distribuição do laser nos sentidos vertical e horizontal. Dessa forma a polarização pôde ser distribuída em 50% horizontal e 50% vertical ou 15% horizontal e 85% vertical. Uma placa de meia onda, conhecida como “polarizer beam splitter (PB1)” foi empregada com o objetivo de dividir o feixe em dois, transmitindo uma parte do laser com polarização paralela e refletindo a outra com polarização vertical, dando origem a dois feixes com potências diferentes ou iguais que puderam ser facilmente controlados através da placa de meia onda (Figura 17). O segundo “polarizer beam splitter” (PB2) recombina os feixes de laser e os mesmos seguiram colineares até o microscópio. Uma placa de meia onda H2 foi utilizada como um atenuador, para controlar a potência de um único feixe ou uma única pinça óptica. Com essas duas placas foi possível controlar individualmente a potência em cada uma das pinças.

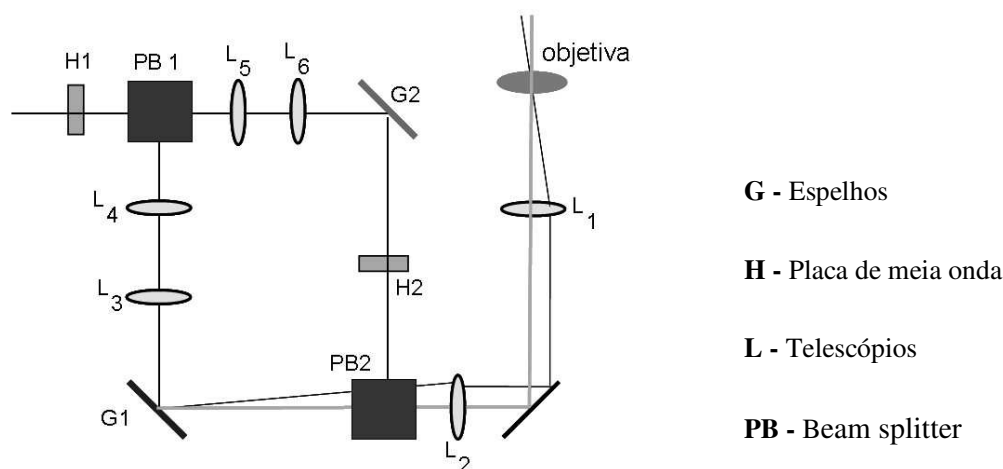


Figura 17 - Esquema de montagem dos espelhos para divisão dos laser e formação da pinça dupla.

Os espelhos “gimbal mounts” G1 e G2 permitiram que o feixe fosse refletido em torno do centro do espelho e inclinado, desta forma possibilitou a reflexão do laser em torno do centro da abertura traseira da objetiva. Com isso, a cada reflexão, o feixe não se deslocava lateralmente e permitia que o laser fosse movimentado sem desalinhar o sistema de duas pinças ópticas e sem perder a potência. As deflexões dos feixes através da movimentação dos espelhos “gimbal mounts” possibilitou o movimento das pinças no microscópio. Para garantir que uma rotação em torno do “gimbal mounts” fosse uma rotação em torno do centro da objetiva, foi necessário usar um conjunto de telescópios L1+L2. Telescópios L3+L4 e L5+L6, foram também utilizados para que o foco do laser coincidissem com o plano de visão do microscópio e assim possibilitasse a observação das partículas aprisionadas.

III.1.A - Uso de microesferas nas medidas de força

O cálculo de forças ópticas e hidrodinâmicas em objetos que não são esféricos é praticamente impossível. Assim a microesfera é utilizada como um calibrador cuja precisão está intimamente ligada com a concordância de forças que agem sobre ela e a força que se deseja obter é sempre medida através do quanto essa força desloca o centro da microesfera em relação à posição de feixe de laser. Quando movimentamos uma

microesfera capturada pela pinça óptica a uma velocidade constante em um fluido, forças ópticas e hidrodinâmicas agem sobre a mesma. No equilíbrio, se o modelo teórico e hidrodinâmico forem adequados, as forças deverão coincidir experimentalmente.

A calibração para medida da força consiste em arrastar uma microesfera de raio conhecido em um fluido com uma determinada velocidade v_{arraste} anotando o deslocamento da mesma em relação à posição de equilíbrio na qual $v_{\text{arraste}} = 0$. Conhecendo a viscosidade do meio pode-se obter o valor da força hidrodinâmica, que é igual à força óptica.

III.2 - Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas do tubo coletor de unidades de concentrado de hemácias, do Hemocentro da UNICAMP. O sangue dos doadores foi coletado em bolsa contendo CPDA₁ (citrato, fósforo, dextrose e adenina) (Fresenius, Asem-NPBI, Itapecerica da Serra, São Paulo, Brasil) segundo padronização da AABB (AABB, 2002) e Diretrizes Brasileira, Resolução RDC 153 (ANVISA/2004). Todos os doadores de sangue assinaram o termo de consentimento pós informado (Anexo 1) padronizado pelo próprio Hemocentro da UNICAMP.

III.3 - Medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta

Para medidas do tamanho da dupla camada de íons e do potencial zeta foi criado uma câmara experimental que possibilitou a reprodução das mesmas condições eletrolíticas das reações de hemoaglutinação utilizadas na prática imunohematológica.

A câmara foi confeccionada em acrílico e possui dois reservatórios laterais que se comunicam através de um canal de 25 mm de comprimento, 1 mm de largura e 75 μm de profundidade. Nos canais foram instalados eletrodos de platina separados um do outro 170 mm. A platina foi escolhida por se tratar de um material anódico e não reativo em processos eletrolíticos. Para geração de um campo elétrico foi utilizada uma fonte de alta voltagem (máx 600V e máx 3A) ligada aos eletrodos (Figura 18).

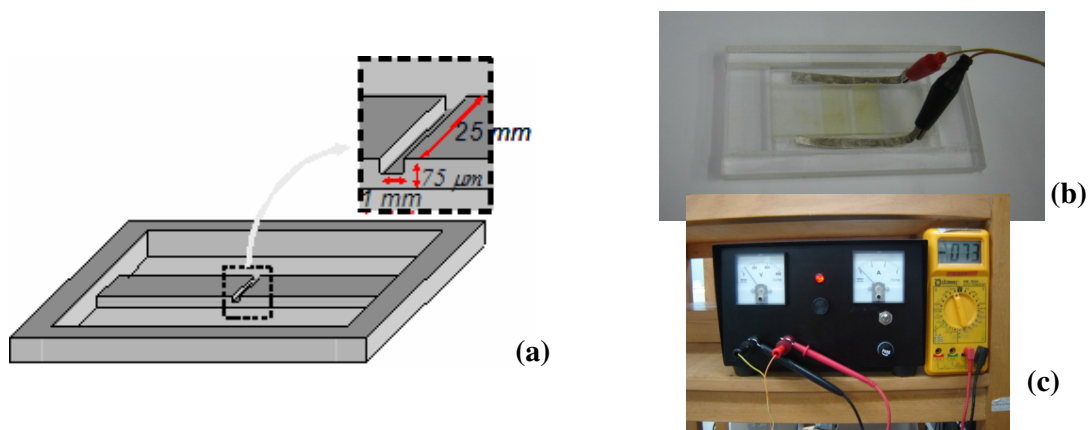


Figura 18 - Esquema ilustrativo da câmara (a), foto da câmara com eletrodos ligados por cabos (b) e fonte de alta voltagem (c).

III.3.A - Preparo das amostras

As amostras selecionadas foram grupo O Rh (D) positivo e foram diluídas em soro do grupo sanguíneo AB (0.5:500 μL). Microesferas de sílica (Bangs Laboratories, Inc., USA) de 4 μm de diâmetro foram diluídas (50:1000 μL) em soro fisiológico 0.9% e posteriormente adicionadas (10 μL) na suspensão de hemácias.

III.3.B - Metodologia de medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta

Nas medidas de potencial zeta e tamanho da dupla camada de íons, a solução com hemácias e microesferas foi colocada na câmara em volume suficiente para que a única comunicação do líquido com os dois lados do reservatório ocorresse apenas pelo canal. Focalizando o material presente no canal e com o auxílio da pinça óptica, foi

formado um conjunto composto pela esfera e hemácia (Figura 19), posteriormente este sistema foi submetido a diferentes voltagens (60, 70, 80, 90 e 100 V) (Figura 20).

A medida da espessura da dupla camada foi obtida calculando a força do deslocamento da esfera de sílica ligada a uma única hemácia em resposta às voltagens aplicadas. O deslocamento da esfera é consequência do movimento da hemácia, gerado pelas cargas negativas da membrana em relação ao campo elétrico aplicado. O deslocamento obtido em cada uma das voltagens foi mensurado com o auxílio do programa Image pró-plus (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD) e posteriormente foi realizado os cálculos do tamanho da dupla camada de íons conforme modelo proposto por FONTES et al., 2008.

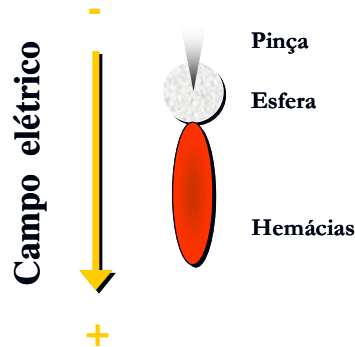


Figura 19 - Representação esquemática da medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta. Conjunto de microesfera e hemácia preso pelo pinça óptica

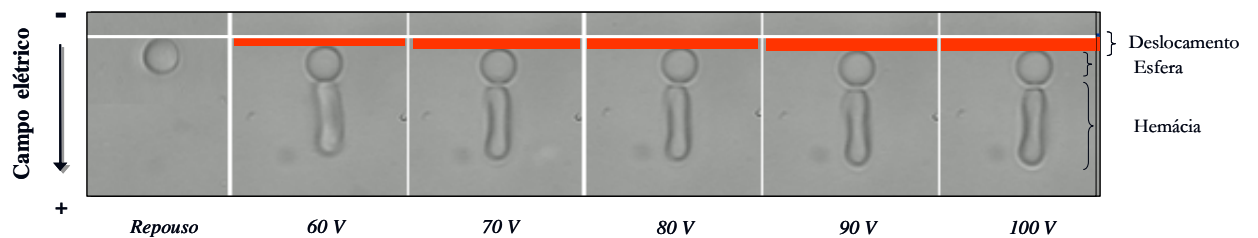


Figura 20 – Representação da medida da dupla camada de íons. O deslocamento da esfera pode ser observado com o aumento progressivo da voltagem (60-100V).

Para a medida do potencial zeta foi utilizado o mesmo sistema previamente descrito no cálculo da dupla camada de íons, isto é conjunto esfera-hemácia e câmara. O valor do potencial zeta foi obtido da velocidade terminal com que a hemácia-esfera percorreu o plasma após ter sido solta da pinça óptica, quando aplicado a voltagem de 100V (Figura 21).

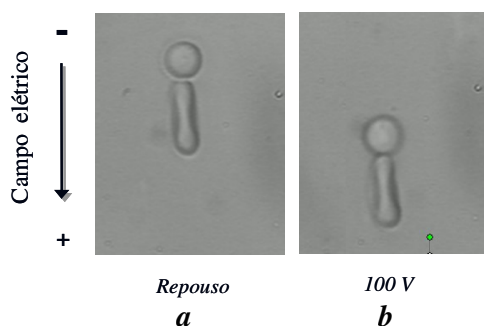


Figura 21 - Medida do potencial zeta. Na figura *a* observa-se a hemácia ligada a uma esfera presa pela pinça óptica em situação de repouso. Na figura *b* o conjunto foi submetido a uma voltagem de 100 V. O laser foi desligado e foi calculado a velocidade em que o conjunto (hemácia e esfera) percorreu o plasma . Os cálculos da medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta estão descritos no anexo.

III.4 - Medidas de quantificação da força de agregação eritrocitária

III.4.A - Preparo das amostras

As medidas de agregação eritrocitárias foram realizadas em três condições:

- Hemácias diluídas em plasma normal (controle)
- Na presença de anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários.
- Associado a meios potencializadores da reação de aglutinação

As soluções utilizadas para as medidas de agregação eritrocitária foram preparadas conforme descrito na Tabela 3

Tabela 3 - Condições dos experimentos para mensuração da agregação eritrocitária. Descrição do meio diluente, volume de amostra de hemácias, solução de esfera e anticorpos utilizados nas medidas de agregação eritrocitária.

Amostra	Meio diluente	Concentrado de Hemácia (Ht 70%)	Solução de esfera	Anticorpo
Controle	Soro AB 500 µL	5 µL	10 µL	-
Anticorpo anti-D _p	Soro AB 500 µL	5 µL	10 µL	5 µL
Anticorpo anti-D _{p+m}	Soro AB 500 µL	5 µL	10 µL	5 µL
Anticorpo anti-D _{p+m}	Soro AB 500 µL	5 µL	10 µL	10 µL
PEG	Soro AB 250 µL + Sol. PEG 20% 250 µL	5 µL	10 µL	-
Dextrano	Soro AB 250 µL + Sol. Dextrano 0.15% 250 µL	5 µL	10 µL	-
LISS	Soro AB 250 µL + Sol. LISS 250 µL	5 µL	10 µL	-
LISS e anticorpo anti-D _p	Soro AB 250 µL + Sol. LISS 250 µL	5 µL	10 µL	5 µL
Bromelina	Soro AB 250 µL + Sol. Bromelina 15% 250 µL	5 µL	10 µL	-
Hemácia tratada com papaína (2 estágios)	Soro AB 500 µL	5 µL	10 µL	-

p = policlonal
m = monoclonal
LISS= Solução de baixa força iônica

Para todas essas condições foram feitas as mesmas diluições variando apenas o meio diluente. As amostras selecionadas do grupo O Rh (D) positivo foram diluídas em um meio diluente (0.5:500 µL). Microesferas de sílica (Bangs Laboratories, Inc., USA) de 4 µm de diâmetro foram diluídas (50:1000 µL) em soro fisiológico 0.9% e adicionadas (10 µL) na suspensão de hemácias (Tabela 3).

Nas amostras controle foi utilizado como meio diluente soro AB. Nas análises com anticorpos, os soros contendo anticorpos anti-D policlonal (5 µL) (Biotest, Itapicirica da Serra, SP, Brazil) e Policlonal + monoclonal (5 µL e 10 µL), (Biotest, Itapicirica da Serra, SP, Brazil) foram acrescentados ao meio diluente, soro AB.

Os experimentos foram realizados com quatro diferentes meios potencializadores de reação: meio de baixa força iônica (LISS), polietilenoglicol e as enzimas, bromelina e papaína. A bromelina foi apenas adicionada à reação técnica conhecida como tratamento enzimático eritrocitário em um estágio. Nas reações com papaína, às hemácias foram previamente incubadas com solução de enzima (hemácias 70% + solução de papaína e 5 min incubação), esta padronização é denominada tratamento enzimático em dois estágios. Ambos métodos são utilizados regularmente e padronizados em rotinas imunohematológicas transfusionais (AABB, 2005).

Preparo dos meios potencializadores de reações

As soluções potencializadoras, previamente preparadas como descrito abaixo, foram diluídas em soro AB (1:1 v/v)

- Polietilenoglicol - PEG 20% Wt = 3350 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em tampão fosfato - PBS pH 7.2 (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil).
- Dextrano 0,15% W_t = 6400-7600 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) diluída em soro fisiológico 0,9%.
- Solução de baixa força iônica - LISS (ID-Diluyente 2, DiaMed, Lagoa Santa, MG, Brazil).
- Bromelina 15% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) diluída em soro fisiológico 0,9%.
- Papaína (ID-papain, DiaMed, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Amostras de hemácias foram tratadas com solução de papaína (ID-papain, DiaMed, Lagoa Santa, MG, Brasil) utilizando técnica em 2 estágio (AABB, 2005) e posteriormente preparada a suspensão utilizando como meio diluente soro AB.

O potencializador LISS também foi testado com anticorpo anti-D policlonal (5 µL) (Biotest, Itapicirica da Serra, SP, Brazil).

III.4.B - Metodologia de quantificação da força de agregação eritrocitária

A medida da força de agregação foi realizada através do sistema de pinça óptica dupla com microesferas calibradas. Nessa dissertação o termo agregação foi utilizado para a medida do deslocamento de duas hemácias agregadas. As amostras foram colocadas em câmara de Neubauer e levadas ao microscópio. As hemácias foram escolhidas aleatoriamente, cada célula foi pinçada por um feixe de laser e então aproximadas pelas pinças ópticas para que as hemácias pudessem aglutinar ou, conjuntos de duas hemácias que se formavam espontaneamente foram aleatoriamente escolhidos. Posteriormente, uma das pinças liberou o conjunto de duas células para que uma microesfera pudessem ser capturada. Desta forma o conjunto de hemácias foi aproximado da microesfera, onde ocorreu uma ligação inespecífica (Figura 22). Capturadas as células e a esfera, a segunda hemácia foi arrastada à velocidades constantes (2×10^{-7} , 5×10^{-7} , 7×10^{-7} , 1.2×10^{-6} , 1.8×10^{-6} , 3.2×10^{-6} m/s) através do meio diluente utilizando um estágio de translação que permite movimentar o feixe de laser 1,6 μm de distância para cada uma das velocidades determinadas. Para controlar os movimentos do sistema de translocação foi utilizado um programa na linguagem LabView (National Instruments, Austin, USA) que foi desenvolvido especialmente para facilitar a interface computador-equipamento usando portas paralelas e seriais. (Figura 23)

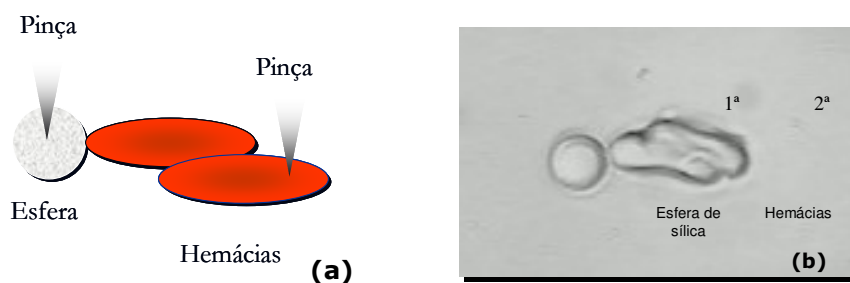


Figura 22 - Medida de agregação de hemácia utilizando pinça óptica dupla. O modelo consiste em uma microesfera de sílica e duas hemácias em uma câmara de Neubauer com meio diluente (soro AB).

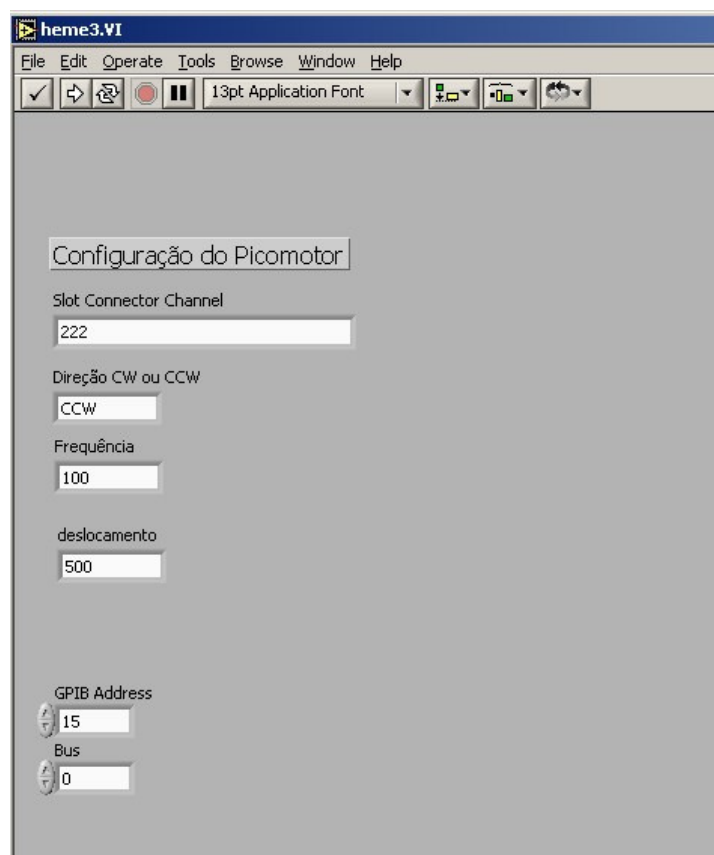


Figura 23 - Tela do controle de velocidade utilizado para medidas de agregação LabView (National Instruments, Austin, USA).

As imagens obtidas foram gravadas em vídeo ao mesmo tempo em que foram digitalizadas usando uma placa de captura de imagens (Pinnacle System, Califórnia USA) e o software Adobe Premier (Adobe Systems Incorporated, Seattle, WA). O experimento consistiu na medida do deslocamento do centro da microesfera em relação à sua posição de equilíbrio. As análises de deslocamento foram realizadas pelo software Image Pró-Plus (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD) (Figura 24) onde foram obtidos os valores do deslocamento da esfera em relação à posição de repouso. Esses dados foram utilizados em um programa matemático (Anexo 4) que converteu deslocamento em força (pN).



Figura 24 - Imagem da tela do programa Image Pró-Plus (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD) utilizado para medida do deslocamento da microesfera no estudo da agregação eritrocitária.

Tabela 4 - Valores obtidos em uma das medidas de agregação eritrocitária. Posição da esfera, deslocamento da esfera em relação ao repouso e a força (pN).

Velocidade ($\mu\text{m/s}$)	Posição esfera Centro-X	Deslocamento	Força (pN)
Repouso	14,36	-----	-----
0.2	15,32	0,95	0,84
0.5	15,51	1,15	1,75
0.7	15,71	1,34	2,63
1.2	15,90	1,54	3,5
1.8	16,29	1,93	5,78

III.4.C - Cálculos da medida de quantificação da força de agregação eritrocitária

A agregação eritrocitária foi determinada pela teoria de Saffman (1975) que propõe um modelo em que considera a membrana como uma camada de fluido viscoso em um plano infinito (lipídios), separando uma região líquida de menor viscosidade (água). As moléculas de proteínas foram consideradas como cilindros com eixos perpendiculares em uma camada plana, realizando movimentos laterais e rotacionais (Figura 25). Esse deslocamento da partícula cilíndrica em um modelo de membrana bilipídica foi calculado por Saffman que, mostrou que a viscosidade, η do meio em que a partícula está deve ser considerada para o cálculo do coeficiente de deslocamento da partícula ser finito no sistema numérico de Reynolds (DIMOVA et al, 2000).

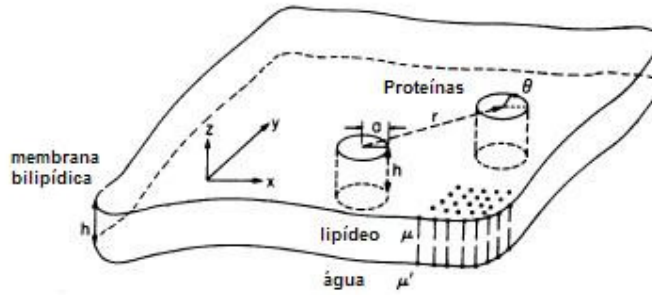


Figura 25 - Modelo de membrana lipídica. Proteínas consideradas como cilindros que realizam movimentos laterais e rotacionais (Saffman et al., 1975).

Na equação 1, η_s é a viscosidade na superfície da membrana, η é a viscosidade do fluido, a , o raio do cilindro, $C = 0.58$ constante de Euler-Masceroni e u a velocidade.

$$F = 4\pi\eta_s \frac{1}{\ln(\eta_s/\eta a) - C} u \quad [\text{Equação 1}]$$

Considerando que N proteínas estão envolvidas, a força será dada por:

$$F = 4\pi\eta_s N \frac{1}{\ln(\eta_s/\eta a) - C} u = \eta_m u \quad [\text{Equação 2}] \quad \text{onde } \eta_m \text{ é a viscosidade aparente da membrana (poise).}$$

Considerando que duas células são analisadas juntas, em cada medida e a força óptica é igual a força viscosa ($\eta_m = 3 \times 10^{-3}$), o valor obtido foi $\eta_m = 1.5 \times 10^{-3}$ poise.cm. A Figura 26 mostra os resultados de força óptica (N) em função da velocidade de deslocamento (m/s) e a linha reta formada pelos pontos ($R^2=0.9879$) com coeficiente angular (N_s/m) é a força da agregação eritrocitária ($1 N_s/m = 1000$ poise.cm).

Força óptica x velocidade deslocamento

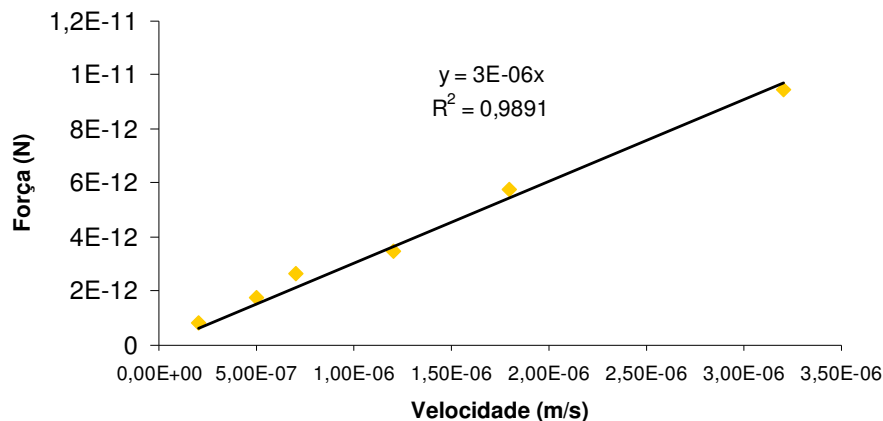


Figura 26 - Força óptica em função da velocidade. A força foi obtida pelo deslocamento da esfera de sílica, quando a segunda hemácia foi submetida a velocidades constantes variando de 2×10^{-7} a 3.2×10^{-6} m/s.

III.5 - Análise Estatística

Os dados foram processados usando o programa estatístico R: A language and enviroment for statistical computing Develpment (R Foundations for Statistical Computing, Vienna, Áustria). Os dados foram apresentados como “Box e whisker plot” que são simples representações diagramáticas dos cinco números sumários: mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior, máximo. A forma básica destes “plots” mostra uma caixa definida pelos quartis superior e inferior com a mediana marcada pela subdivisão da caixa. Os “whiskers” se estendem de ambas as extremidades da caixa mostrando os valores máximo e mínimo. A comparação estatística entre dois grupos relacionados foi realizada pelo método não paramétrico de Wilcoxon (ARMITAGE et al., 1994).

IV - RESULTADOS

IV.1 - Resultados das medidas do tamanho da dupla camada de íons

Amostra de cinco doadores foram analisadas para testar a viabilidade de medidas do tamanho da dupla camada de íons utilizando a metodologia proposta (Tabela 5).

Tabela 5 - Cinco medidas do tamanho da dupla camada de íons (μm) de amostras controle. Os resultados foram calculados pelo deslocamento da esfera (μm) quando aplicadas diferentes voltagens (V).

Hemácia analisada	Dupla camada de íons (μm)
1	0.75
2	1.12
5	1.1
4	0.67
5	0.37

IV.2 - Resultados das medidas do potencial zeta

Amostra de vinte e três doadores foram analisadas para testar a viabilidade de medidas do potencial zeta utilizando a pinça óptica (Tabela 6).

Tabela 6 – Vinte e três medidas do potencial zeta (mV) de amostras controle. Os resultados foram obtidos da mensuração da velocidade terminal da microesfera-hemácia ($\mu\text{m/s}$) em um campo elétrico (V).

Hemácia analisada	Potencial zeta (mV)	Hemácia analisada	Potencial zeta (mV)
1	-14.0	13	-15.5
2	-12.5	14	-31.0
3	-12.5	15	-15.5
4	-12.5	16	-14.0
5	-9.5	17	-31.0
6	-15.5	18	-14.0
7	-15.5	19	-9.5
8	-15.5	20	-14.0
9	-15.5	21	-15.5
10	-15.5	22	-14.0
11	-15.5	23	-15.5
12	-31.1		

IV.3 - Resultado das medidas da força de agregação eritrocitária

Foram realizadas 75 medidas de agregação eritrocitária, sendo 20 controles e 55 medidas utilizando anticorpos (anti-D) com e sem solução potencializadora.

A mediana dos resultados dos controle foi de 1×10^{-3} (1.5×10^{-4} a 2.5×10^{-3}) poise.cm. As amostras analisadas com soro anti-D apresentaram os seguintes resultados: soro anti-D policlonal (5 μL) 2×10^{-3} (1×10^{-3} a 4×10^{-3}) poise.cm, anti-D policlonal (5 μL) e LISS 2×10^{-3} (5×10^{-4} a 4.5×10^{-3}) poise.cm, anti-D policlonal e monoclonal (5 μL) 1.5×10^{-3} (5×10^{-4} a 2×10^{-3}) poise.cm, anti-D policlonal e monoclonal (10 μL) 2×10^{-3} (1×10^{-3} a 4×10^{-3}) poise.cm (Tabela 7).

Tabela 7 - Medidas de agregação eritrocitária (poise.cm) de amostras controle e amostras com diferentes soros anti-D. Os resultados foram obtidos do cálculo do deslocamento da esfera em função da velocidade ($\mu\text{m/s}$)

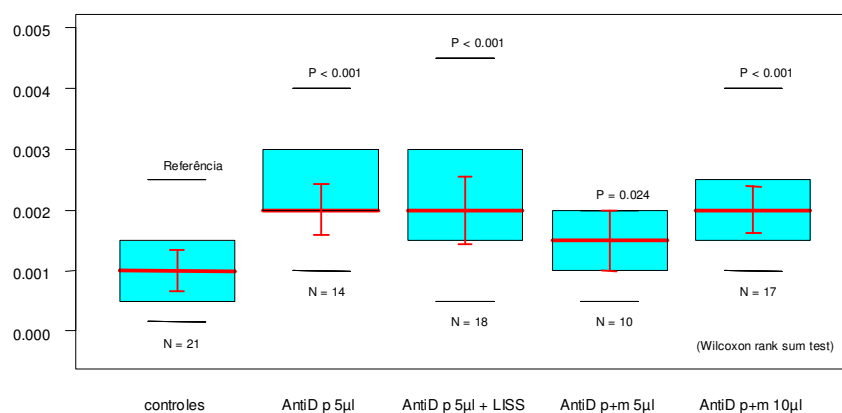
Amostras de hemácias	Número de células analisadas	Agregação eritrocitária poise.cm x 10^{-3} Mediana (min-max)
Controle	20	1.0 (0.1 - 2.5)
Anti-D _p 5 μL	15	2.0 (1.0 - 4.0)
Anti-D _p 5 μL + LISS	15	2.0 (0.5 - 4.5)
Anti-D _{p+m} 5 μL	10	1.5 (0.5 - 2.0)
Anti-D _{p+m} 10 μL	15	2.0 (1.0 - 4.0)

p = policlonal

m = monoclonal

LISS= Solução salina de baixa força iônica

Outra forma de análise desses dados constituiu na comparação estatística dos resultados de amostras sem anticorpo (controle) com amostras com diferentes tipos de anticorpos, onde observou-se uma alteração estatisticamente significativa $p < 0,001$ (*Wilcoxon rank sum test*)(Figura 27).



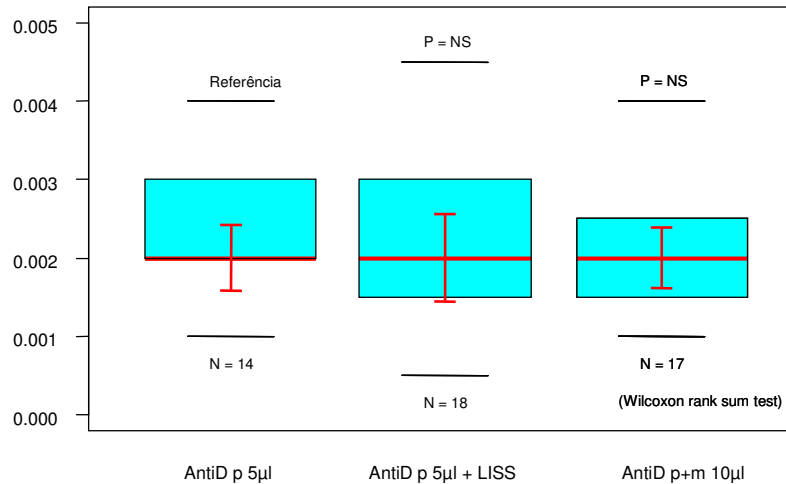
p = policlonal

m = monoclonal

LISS = Solução salina de baixa força iônica

Figura 27 - “Box e whisker plot” comparando a distribuição das medidas de agregação eritrocitária de amostras controle e amostras analisadas com diferentes soros anti-D anti-D policlonal (5 μL), anti-D policlonal (5 μL) e LISS, anti-D policlonal e monoclonal (5 μL), anti-D policlonal e monoclonal (10 μL).

Resultados não estatisticamente significativos foram observados quando analisado comparativamente amostras contendo o anticorpos anti-D policlonal (5 µL) com as amostras: anti-D Policlonal (5 µL) com LISS e anti-D Policlonal e monoclonal (10 µL) (Figura 28).



p = policlonal
m = monoclonal
LISS= Solução salina de baixa força iônica

Figura 28 - “Box e whisker plot” comparando a distribuição de agregação eritrocitária com soros anti-D policlonal (5 µl) em meio de baixa força iônica (LISS) e soro anti-D policlonal e monoclonal (10 µl).

Amostras de hemácias analisadas com Dextran 0.15%, Bromelina e LISS sem anticorpo anti-D não apresentaram aglutinação.

Hemácias tratadas com solução de papaína apresentaram alta aderência entre as células impossibilitando a realização e avaliação da agregação eritrocitária utilizando a pinça óptica dupla.

As amostras analisadas com solução de PEG apresentaram uma densa precipitação ao redor da célula também impedindo a utilização da pinça óptica dupla como ferramenta de medida (Figura 29).

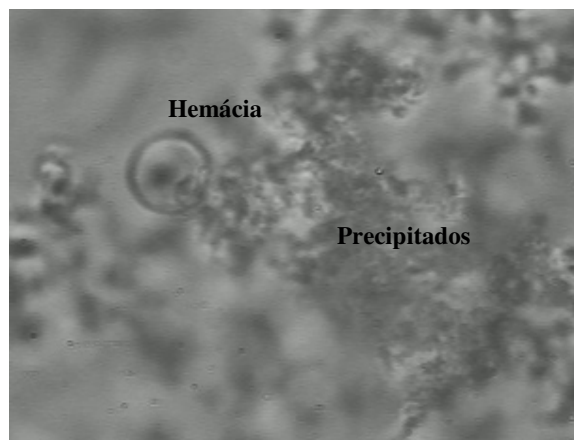


Figura 29 - Imagem de uma hemácia em solução de PEG. Observa-se formação de precipitados ao redor da célula.

V - DISCUSSÃO

A membrana eritrocitária contém proteínas e glicoproteínas imersas em uma bicamada lipídica que possui um comportamento viscoelástico. Algumas glicoproteínas contém ácido siálico, que é o principal responsável pelas cargas negativas na superfície da hemácia e conseqüentemente pela criação de um potencial elétrico (ζ) repulsivo que mantém uma certa distância entre as células. Desta forma quanto maior o potencial maior será a tendência de repulsão das hemácias carregadas, evitando assim a adesão. O estudo das forças envolvidas na adesão e agregação eritrocitária está intimamente relacionado ao conhecimento das características físico-químicas das hemácias e dos meios em que estão inseridas.

A hemácia torna-se eletricamente carregada em contato com um meio aquoso polar. As cargas negativas da superfície eritrocitária influenciam a distribuição espacial dos íons do meio, que estão próximos à célula, atraindo íons de carga oposta (cátions) e repelindo íons de mesma carga (ânions). Assim, forma-se uma camada elétrica positiva, na interface da hemácia com o líquido, que tem como objetivo neutralizar eletricamente as cargas eritrocitárias. Afastando-se da superfície é formada outra camada composta de ânions distribuídos de maneira difusa no meio polar até que a concentração de cargas elétricas seja igualada. Quanto maior for a concentração iônica do meio, maior será a espessura dessa dupla camada de íons e conseqüentemente maior será o potencial zeta (Hunter, 1981).

Diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de melhor caracterizar o potencial zeta de partículas e de células carregadas eletricamente quando estão em soluções. No campo da biologia existem trabalhos que avaliaram este potencial da superfície da bactéria (WILSON, et al., 2001; CHIA et al, 2008; ZHAO et al., 2009), de plaquetas (KHOO et al, 2009) e de interações entre células normais e neoplasias com nanopartículas (ZHANG, et al., 2008).

A técnica mais utilizada para medir o potencial zeta se baseia na mobilidade eletroforética de partículas ou células submetidas a um campo elétrico. A relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado, é convertido em potencial zeta (Jovtchev et al, 2000, Ichiki et al, 2002, Sze et al, 2003, Omatsu et al, 2005). No entanto não há estudos sobre tamanho da dupla camada iônica eritrocitária. Neste trabalho, pela primeira vez tentou-se medir o tamanho desta dupla camada utilizando a pinça óptica dupla. Esta metodologia permitiu que essa medida fosse realizada em associação à medida do potencial zeta, uma vez que ambas estão intimamente relacionadas.

As duas técnicas propostas para avaliar as propriedades elétricas da hemácia, utilizando a pinça óptica, foram testadas em amostras controles e no caso do potencial zeta os resultados foram comparados com valores descritos na literatura.

Na medida da espessura da dupla camada de íons na hemácia obtivemos mediana de 0.85 μm . Não há descrito nenhum estudo dessa mensuração em sistemas biológicos, impossibilitando assim a comparação com valores pré-estabelecidos e também uma avaliação mais criteriosa desse método. A continuidade deste estudo poderá contribuir para a melhor compreensão das propriedades elétricas de diferentes células, incluindo relação entre alterações de cargas e determinadas patologias. A possibilidade de mensuração da dupla camada iônica na hemácia em diferentes meios (soluções), acrescentará importantes informações relacionadas à reação de hemaglutinação, técnica muito utilizada nas grandes rotinas transfusionais. Nestas avaliações imuno-hematológicas acrescentamos substâncias potencializadoras de reação que interferem na carga elétrica da hemácia e do meio. A melhor compreensão desta dinâmica envolvendo cargas proporcionará uma melhora da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados atualmente assim como na investigação de novos meios potencializadores. Importante enfatizar que apesar das existências de várias

técnicas que possibilitam a investigação imuno-hematológica transfusional, a reação de hemoaglutinação continua ocupando lugar de destaque pela simplicidade, baixo custo, boa sensibilidade e reprodutibilidade além de possibilidade de automação, fatores importantes em grandes rotinas assistenciais.

No estudo do potencial zeta, o valor mediano encontrado foi de -14mV e está de acordo com parâmetros previamente publicados por POLLACK et. al., (1965) . Estes autores trabalharam com mobilidades eletroforética da membrana de eritrócitos humanos e encontraram o resultado do potencial zeta de -12mV . A maior vantagem na nova metodologia proposta utilizando a pinça óptica é a possibilidade de avaliar hemácias íntegras, diferente da técnica proposta por Pollack e colaboradores que analisaram membranas isoladas (ghost). Em um estudo realizado por OMI et al., (1994) utilizando “Doppler Electrophoretic Light Scattering Analysis”, os autores analisaram dez amostras e encontraram o valor médio do potencial zeta de hemácias de $-13.07 \pm 0.61 \text{ mV}$. Recentemente OMASU et al., (2005) determinaram o potencial zeta de eritrócitos de ovelhas obtendo -15mV , nesse estudo foi avaliado a mobilidade eletroforética em chips com microcapilares.

As metodologias propostas para a medida do potencial zeta e o tamanho da dupla camada de íons utilizando uma câmara especialmente desenvolvida para este fim e a pinça óptica simples apresentam como vantagens a possibilidade de análise de hemácias íntegras, a obtenção de resultados individuais que são considerados mais sensíveis para pequenas diferenças do que valores médios

A mensuração das forças entre hemácias também contribui na avaliação das interações que ocorrem durante o processo de adesão e aglutinação eritrocitária. O modelo apresentado foi chamado de força de agregação eritrocitária e avalia o deslocamento de proteínas e lipídios da membrana da hemácia. Essa força está

intimamente ligada ao número de proteínas envolvidas na aglutinação e dessa forma permite também avaliar a relação direta da ligação do anticorpo na membrana da célula, bem como a influência das diferentes soluções potencializadoras nas duas fases da aglutinação.

Os resultados obtidos da agregação eritrocitária de amostras controles foram semelhantes aos valores descritos por Hochmuth et al, 1979. Estes autores, utilizaram o tempo de alongamento celular e encontraram resultados entre $6 \text{ e } 8 \times 10^{-4}$ poise.cm.

A análise dos resultados das medidas da agregação eritrocitária sem a presença do anticorpo comparados com valores obtidos com anticorpos, de diferentes origens (mono e/ou policlonal) e distintas concentrações (anti-D policlonal 5 μL e anti-D policlonal + monoclonal 5 μL e 10 μL) mostraram diferenças estatisticamente significativas. Importante realçar que foi analisado pequeno número de células e futuros estudos com grandes casuísticas serão necessários.

Amostras de hemácias também foram analisadas com diferentes meios potencializadores de reação utilizados na rotina assistencial como, Dextran 0.15%, Bromelina e LISS e neste estudo não foi acrescentado anticorpos. A aglutinação não foi observada demonstrando que na ausência de anticorpos que reconhecem antígenos eritrocitários, estes meios não acarretaram aglutinações inespecíficas. Os resultados obtidos são coerentes com o comportamento destes reagentes na prática imunohematológica, tanto em rotinas manuais como automatizadas.

A solução de papaína também é muito utilizada como meio potencializador na prática transfusional. O estudo da agregação de hemácias tratadas com esta enzima nas mesmas condições utilizadas em laboratórios assistenciais demonstrou alta aderência entre as células. Este comportamento impossibilitou medir a agregação eritrocitária

utilizando a pinça óptica dupla. Esse resultado é compatível com a alta inespecificidade encontrada na avaliação imunohematológica transfusional quando hemácias são incubadas com papaína antes da reação.

Estudos experimentais realizados por OMI e colaboradores (1994) comparado hemácias sem tratamento enzimático (controle) com células analisadas após a adição de enzimas bromelina e papaína mostraram redução do potencial zeta de 55.8% e 37.8%, respectivamente. Em geral um valor de potencial zeta baixo reflete em uma diminuição das forças repulsivas e conseqüentemente um aumento na agregação. No presente trabalho foi avaliado, hemácias tratadas com enzimas conforme protocolos utilizados na prática transfusional, ou seja, papaína incubada com as células e no caso da bromelina a enzima foi apenas adicionada a reação. Os resultados mostraram uma ausência de aglutinação quando adicionado bromelina e uma forte agregação com células tratadas (incubadas) com papaína. O tipo de enzima e a técnica utilizada no tratamento da hemácia influencia diretamente na redução das cargas elétricas da célula e conseqüentemente no potencial zeta.

As amostras analisadas com solução de PEG, outro meio potencializador de reação bastante comum nos de Bancos de Sangue, apresentaram uma densa precipitação ao redor da célula, impedindo a utilização da pinça óptica dupla como ferramenta de medida. Este resultado também é compatível com a prática imunohematológica, onde rotineiramente realiza-se a lavagens das hemácias após a incubação, removendo o PEG residual e evitando resultados errôneos.

Este modelo desenvolvido utilizando a pinça óptica dupla para a mensuração da força de agregação entre hemácias pode ser considerado simples além de apresentar como vantagem o fato de permitir a avaliação da agregação em diferentes condições da

reação de hemaglutinação como, distintos meios potencializadores incluindo a presença de anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários.

Finalizando, as medidas obtidas pelas três metodologias propostas mostraram apresentar sensibilidade e passível de reprodução. Portanto, podem ser consideradas viáveis não apenas para o estudo de fatores que influenciam na aglutinação e na interação entre hemácias, mas também para a avaliação de alterações da membrana que interferem cargas elétricas da célula.

VI - CONCLUSÕES

- As metodologias propostas para a mensuração do potencial zeta e o tamanho da dupla camada de íons de hemácias íntegras, utilizando a pinça óptica mostraram ser simples e sensíveis permitindo a obtenção de resultados reprodutíveis e individuais
- A modelo desenvolvido utilizando pinça óptica dupla para a mensuração da força de agregação entre hemácias mostrou ser simples e reprodutível, além de possibilitar a avaliação da agregação em diferentes condições de reação de hemaglutinação como na presença de anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários e com meio potencializador de reação.
- As medidas obtidas pelas três metodologias propostas são consideradas viáveis para o estudo de propriedades elétricas das hemácias e fatores que influenciam interação entre as células.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. Imunologia celular e molecular. 5ª Edição Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2005. 580 p.

ABUCHOWSKI A, VAN ES T, PALCZUK NC, DAVIS FF, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. The journal of biological chemistry 1977; 252(11): 3578-3581.

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

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS: Technical manual, 14ª edition. USA: Bethesda Maryland, 2002.

ARMITAGE P, BERRY G. Statistical methods in medical research. The sope of statistics. Oxford : Blac Wall, 1994. p. 32-35.

ASHKIN A, DZIEDZIC JM, BJORKHOLM JE, CHU S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dieletric particles. Optic Lett. 1986; 11:288-290.

ATKINS P, PAULA J. Interações moleculares. In: Atkins Físico-química. 7ª Edição Rio de Janeiro: Livros Tecnicos e Científicos, 2004. Cap. 21, pág 408-426 v2.

BARJAS-CASTRO ML, BRANDÃO MM, FONTES A, COSTA FF, CESAR CL, SAAD STO. Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. Transfusion. 2000; 42: 1196-1199.

BARRET AJ, RAWLINGS ND, WOESSNER JF. Handbook of proteolytic enzyme. San Diego: Academic, 1998. 1666p.

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

BEYNON R.J., BOND, J.S., Proteolytic enzymes: a pratical approach. Oxford: IRL : Oxford Univ., 1989. 259p.

BRANDÃO MM, FONTES A, BARJAS-CASTRO ML, BARBOSA LC, COSTA FF, CESAR CL, SAAD ST. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. Eur J Haematol. 2003a; 70(4):207-11.

BRANDÃO MM, SAAD STO, CESAR CL, FONTES A, COSTA FF, BARJAS-CASTRO ML. Elastic properties of stored red blood cells from sickle trait donor units. *Vox sanguinis*. 2003b; 85(3): 213-215.

BROOKS DE, SEAMAN GVF. The effects of neutral polymers on the eletrokinetic potential of cells and other charged particles. *Journal of colloid and interface science*. 1973; 43: 714-726.

BUER CS, GAHAGAN KT, GROVER A et al. Insertion of *Agrobacterium rhizogenes* into *Ginkgo biloba* using lasers as optical tweezers and scalpel. *Plant Physiol*. 1997; 114:1613.

CHELIDZE T. Dielectric spectroscopy of blood. *J. Non-Crystalline Solids*. 2002; 305: 285 – 294.

CHIA TW, FEGAN N, MCMEEKIN TA, DYKES GA. *Salmonella* Sofia differs from other poultry-associated *Salmonella* serovars with respect to cell surface hydrophobicity, *J Food Prot*. 2008 Dec;71(12):2421-8.

CHIEN S, JAN KM. Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvascular Res*. 1973; 5:155–166.

CHIEN S, SUNG LA, SIMCHON SS, LEE MM, JAN K-M, SKALAK R. Energy balance in red cell interactions. *Ann NY Acad Sci*. 1983; 416:190–206.

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

DANIELS GL, CASTILHO L, FLEGEL WA, FLETCHER A, GARRATTY G, LEVENE C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sang*. 2009; 96:153-156.

DANIELS GL, FLETCHER A, GARRATTY G, HENRY S, JORGENSEN J, JUDD WJ, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*. 2004; 87(4):304-16.

DAVIES DR, PADLAN EA. Antibodies-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochen*. 1990; 59:439-73.

DEMAN AJM, OVERBEEKE MAM. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. Vox Sang. 1990; 58:207-10.

DIMOVA R, DANOV K, POULIGNY B, IVANOV IB. Drag of a solid particle trapped in a thin film or at an interface: influence of surface viscosity and elasticity. J. Colloid and Interface Science. 2000; 226: 35 – 43.

EYLAR EH., MADOFF MA, BRODY OV, ONCLEY JL. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J Biol Chem. 1962; 237:1992-2000.

FELGNER H, FRANK R, SCHLIWA M. Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers, J Cell Sci. 1996; 109: 509-516.

FONTES A, FERNANDES HP, THOMAZ AA, BARBOSA LC, BARJAS-CASTRO ML, CÉSAR CL. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. Journal of biomedical optics. 2008 13(1):014001.

FONTES, A. Sistema de micromanipulação e microanálise com pinças ópticas [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

FREY BM, REID ME. Clinical and laboratory impact of blood group antigens and antibodies. In: REID, M.E., NANCE, S.J. Red Cell transfusion: a practical guide. Totawa, New Jersey: HumanPress, 1998 Pag 206.

HALLIDAY D, RESNICK R, WALKER J. Fundamentals of Physics, 6. ed. New York: J. Wiley, 2001. 1144p.

HARRIS JM. Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. New York ; London: Plenum, 1992. 385p.

HOCHMUTH RM, WORTHY PR, EVANS EA. Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity. J. Biophys. 1979; 26:101-114.

HUNTER RJ. Zeta potential in colloid science: principles and applications. London: Academic, 1981, 386p.

HURUTA RR, BARJAS-CASTRO ML, SAAD STO, COSTA FF, CESAR CL. A new method to study mechanical properties of red blood cells using optical tweezers. Blood. 1997; 90:6a (abstr, suppl 1).

HURUTA RR, BARJAS-CASTRO ML, SAAD STO, COSTA FF, FONTES A, BARBOSA LC, CESAR CL. Mechanical properties of stored red cell using optical tweezers. *Blood*. 1998; 92(8):2975-7.

ICHIKI T, UJIIE T, SHINBASHI S, OKUDA T, HORIIKE Y. Immunoelectrophoresis of red blood cells performed on microcapillary chips. *Electrophoresis*. 2002 Jul; 23(13):2029-34.

JOVTCHEV S, DJENEV I, STOEFF S, STOYLOV S. Role of electrical and mechanical properties of red blood cells for their aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2000; 164: 95–104.

KHOO KS, THE EJ, LEONG YK, ONG BC. Hydrogen Bonding and Interparticle Forces in Platelet γ -Al₂O₃ Dispersions: Yield Stress and Zeta Potential. *Langmuir*. 2009; 25:3418-3424.

KONIG K, SVAASAND L, LIU YG. et al. Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap, *Cell Mol Biol* . 1996; 42(4): 501-9.

LI LC; TIAU Y. Zeta Potential. In: SWARBRICK J. and BOYLAN JC, Editors. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3^a Ed New York: Marcel Dekker 2006. p.429–458.

LÖW B, MESSETER L. Antiglobulin test in low ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. *Vox Sang*. 1974; 26(1):53-61.

LUNER SJ, STURGEON P, SZKLAREK K, McQUISTON DT. Effects of proteases and neuramidase on RBC surface charge and agglutination. *Vox Sanguinis*. 1975; 28(3): 184-199.

MOLLISON PL. *Blood Transfusion in clinical medicine*. 11 ed. Oxford: Blackwell, 2005. 891p

MOORE HC, MOLLISON PL. Use of a Low-Ionic-Strength Medium in Manual Test for Antibody Detection. *Transfusion*. 1976 Jul-Aug;16(4):291-6.

NEU B, WENBY R, MEISELMAN HJ. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophys. J*. 2008 sept; 95(6): 3059–3065.

NI H, AMME RC. Ion redistribution in a electric double layer. *Journal of colloid and interface science*. 2003; 260: 344-348.

OBRUCA A, STROHMER H, BLASCHITZ A, et al. Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. Hum. Reprod. 1997; 12:2242-45.

OMASU F, NAKANO Y, ICHIKI T. Measurement of the electrophoretic mobility of sheep erythrocytes using microcapillary chips. Electrophoresis. 2005; 26:1163-67.

OMI T, KAJI E, IKEMOTO S. The electrokinetic behavior of red blood cells from a patient with Tn syndrome by doppler electrophoretic light scattering analysis. Tohoku J. Exp. Med. 1994; 174(4):369-77.

PARSLOW TG, STITES DP, TERR AI, IMBODEN JB. Imunologia Médica. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PETZ LD, SWISHER SN, KLEINMAN S, SPENCE RK, STRAUSS RG. Clinical Practice of transfusion medicine. 3th Edition, New York: Churchill Livingstone 1996.

POLLACK W, HAGER HJ, RECKEL R, TOREN DA, SINGHER HO. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. Transfusion. 1965; (5) 158-83.

POLLACK W, RECKEL RP. A reappraisal of the forces involved in Hemagglutination. Int Archs Allergy Appl. Immun. 1977; 54(1):29-42.

POPOV M, TAM LY, LI J, REITHMEIER RAF. Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. The journal of biological chemistry. 1997; 272 (29):18325-32.

POZZO, LY. Desenvolvimento de metodologia de medida vetorial de forças em tempo real de microorganismos utilizando pinças ópticas para estudos de quimiotaxia de parasitas [Dissertação - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

PRIBUSH A, ZILBERMAN-KRAVITS D, MEYERSTEIN N. The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation. Journal Eur Biophys. 2007; 36:85-94.

Brasil. RESOLUÇÃO RDC n° 153. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 14 de junho de 2004 ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Disponível em: URL: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>

ROUGER P, SALMON C. La pratique de l'agglutination des érythrocytes et du test de coombs. Paris: Masson, 1981.

SAFFMAN PG, DELBRUCK M. "Brownian motion in biological membranes", Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975; 72(8): 3111-13.

SAKATA-SOGAWA K, KURACHI M, SOGAWA K, et al. Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. Eur Biophys J Biophys. 1998; 27, 55-61.

STITES, D., TERR, A., *Imunologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 689p.

STRATTON F, RAWLINSON, VI, GUNSON HH, PHILLIPS PK. The role of Zeta Potential in Rh agglutination. Vox Sanguinis. 1973; 24:273-79.

SUGIURA S, KOBAYAKAWA N, FUJITA H, et. al. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique - Molecular basis for cardiac adaptation. Circ Res. 1998; 82:1029-34.

SZE A, ERICKSON D, REN L, LI D. Zeta-potential measurements using Smoluchowski equation and slope of the current-time relationship in electrosmotic flow. J. Colloid Interface Sci. 2003; 261: 402-10.

THOMAS N, THORNHILL RA. The physics of biological molecular motors. J. Phys. D: Appl. Phys. 1998; 31:253-66.

VAN OSS CJ, ABSOLON DR. Zeta potential, Van der Walls Forces and hemagglutination. Vox sanguinis. 1983; 44:183-90.

VOET D, VOET JG, PRATT CW. *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931p.

WILSON WW, WADE MM, HOLMAN SC, CHAMPLIN FR. Status os methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. Journal of Microbiological Methods. 2001; 43:153-64.

ZHANG Y, YANG M, PORTNEY NG, CUI D, BUDAK G, OZBAY E, OZKAN M, OZKAN CS. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. Biomed Microdevices. 2008; 10(2):321-28.

ZHAO H, BAU HH. The polarization of a nanoparticle surrounded by a thick electric double layer. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009; 333: 663–71.

VI - ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento pós informado

Autorizo o Hemocentro da UNICAMP utilizar o sangue que doarei para o que for necessário, inclusive para a produção de insumos e hemoderivados, conforme legislação do Ministério da Saúde em vigor. Declaro que respondi com a verdade a todas as perguntas constantes no roteiro da entrevista a que fui submetido(a). Estou ciente de que serão feitos os teste de triagem sorológica de doadores e avaliação imunohematológica em meu sangue e se algum resultado se apresentar alterado, serei convocado(a) pelo Hemocentro para receber orientações e se necessário, repetir os exames. Tenho ciência também que os testes sorológicos podem ter resultados inconclusivos ou falsos positivos , havendo sempre a necessidade de confirmação dos mesmos. Fui orientado(a) também sobre o significado dessa triagem e esclarecido(a) sobre minha aptidão – inaptidão para esta doação de sangue. Estou ainda ciente de que posso vir sofrer alguma reação à doação e que fui orientado sobre ela.

Anexo 2 - Conceitos físicos²

2.A - Conceitos de Mecânica: energia cinética, potencial e trabalho.

Teorema trabalho-energia cinética afirma que o trabalho W é igual à variação da energia cinética, ou seja, $W = \Delta\left(\frac{1}{2}mv^2\right)$ ³. As forças conservativas são definidas como as forças em que o trabalho não depende da trajetória, mas apenas da variação de uma grandeza chamada energia potencial, ou seja, $W_{conservativas} = -\Delta U_{potencial}$. Quando só existem forças conservativas o teorema trabalho-energia cinética implica na conservação da Energia Mecânica, $E_{mec} = \frac{1}{2}mv^2 + U_{pot}$, pois $\Delta\left(\frac{1}{2}mv^2 + U_{pot}\right) = 0$. Já o trabalho de forças dissipativas depende da trajetória e não pode ser expresso como a variação de uma energia potencial. Na ausência de forças dissipativas, portanto, a energia mecânica se conserva, e existe uma função, chamada energia potencial, da qual se pode calcular a força pela expressão $F = -\frac{\Delta U_{pot}}{\Delta x}$, pois $F\Delta x = -\Delta U_{pot}$. No sistema MKS a unidade de energia é o Joule, dada por $1 \text{ Joule} = 1 \text{ Newton} \times 1 \text{ m} = 1 \text{ Nm}$. Sabendo a força podemos calcular o potencial e vice-versa. Considere um potencial do tipo

² Revisão baseada em HALLIDAY D, RESNICK R, WALKER J. Fundamentals of Physics, 6. ed. New York: J. Wiley, 2001. 1144p

³ Substituindo $F = ma = m \frac{\Delta v}{\Delta t}$ e $\Delta x = v \Delta t$ na expressão do trabalho $W = F\Delta x$ obtemos

$$W = F v \Delta t = m v \frac{\Delta v}{\Delta t} \Delta t = m v \Delta v, \text{ onde } v \text{ é a velocidade e } \Delta \text{ tem a aceção usual de que}$$

$\Delta(\text{Algo}) = (\text{Algo}_{\text{final}} - \text{Algo}_{\text{inicial}})$. Considere que $v_{\text{final}} = v_{\text{inicial}} + \Delta v$ com Δv muito pequeno, tendendo a zero. Então

$$v_{\text{final}}^2 = (v_{\text{inicial}} + \Delta v)^2 = v_{\text{inicial}}^2 + 2v_{\text{inicial}}\Delta v + \Delta v^2 \cong v_{\text{inicial}}^2 + 2v_{\text{inicial}}\Delta v \quad e$$

$$\Delta(v^2) = v_{\text{final}}^2 - v_{\text{inicial}}^2 \cong 2v\Delta v. \text{ No limite do } \Delta v \text{ tendendo a zero a aproximação é exata, e pode-se}$$

$$\text{usar } \cong \text{ em lugar de } \cong. \text{ Neste caso } \Delta(v^2) = 2v\Delta v, \text{ e } W = m v \Delta v = \frac{1}{2} m \Delta v^2 = \Delta\left(\frac{1}{2} m v^2\right).$$

$U_{pot} = \frac{1}{x}$. Nesse caso, $F = \frac{1}{x^2}$ ⁴. A força entre duas cargas é dada, em uma dimensão, por $F = k \frac{q_1 q_2}{x^2}$, logo o potencial será dado por $U_{pot} = k \frac{q_1 q_2}{x}$. Se o sinal das cargas for o mesmo, a força e o potencial são positivos. Esse é o caso de forças repulsivas. Se os sinais forem diferentes, a força e o potencial são negativos, que é o caso de forças atrativas.

2.B - Conceitos de campo e potencial elétrico.

Quando existe uma força de interação à distância entre dois corpos pode-se dizer que eles criam um campo de força no espaço e que cada um dos corpos interage, localmente, com o campo de força do outro corpo. Com isso evita-se a idéia de uma interação instantânea à distância. Dessa forma na lei de Coulomb $F = k \frac{q_1 q_2}{x^2}$ pode-se

dizer que a carga q_1 cria o campo elétrico $E_1 = k \frac{q_1}{x^2}$, o qual interage com a carga q_2

para gerar a força de Coulomb, $F = q_2 E = k \frac{q_1}{x^2} q_2$. A relação entre a força e o campo elétrico é $F = qE$. O campo elétrico tem dimensão de força por unidade de carga e o potencial elétrico é o potencial mecânico por unidade carga. No MKS carga é dada em Coulomb, e a unidade do potencial elétrico é o Volt, dada por $1 \text{ Volt} = \frac{1 \text{ Joule}}{1 \text{ Coulomb}} = \frac{J}{C}$.

O campo elétrico é usualmente expresso em unidades de $\frac{\text{Volt}}{\text{metro}} = \frac{V}{m}$.

⁴ A variação da energia potencial é $\Delta U_{pot} = \frac{1}{x_{fin}} - \frac{1}{x_{in}} = \frac{x_{in} - x_{fin}}{x_{fin} x_{in}} = -\frac{x_{fin} - x_{in}}{x_{fin} x_{in}} = -\frac{\Delta x}{x_{fin} x_{in}}$, mas

como Δx tende a zero, e $x_{fin} = x_{in} + \Delta x$ então $x_{fin} x_{in} \cong x_{in}^2$. Logo $\Delta U_{pot} = -\frac{\Delta x}{x^2}$.

2.C - Condutores e dielétricos.

Em um material condutor, as cargas podem se movimentar livremente dentro do mesmo. Isso significa que não pode haver campo elétrico no interior de um condutor no caso estático, pois se houvesse campo, as cargas estariam se movimentando devido às forças $F = qE$. Só pode existir campo na superfície do condutor e perpendicular à mesma. Se houvesse campo elétrico paralelo à superfície as cargas estariam se movimentando nessa direção. Na perpendicular não há problema porque as cargas não podem abandonar o condutor. Como o campo se anula no condutor? Pelo movimento das cargas livres. Um campo elétrico externo atrai as cargas negativas na sua direção e repele as positivas na direção contrária, como mostra a Figura 30. Mas essas cargas de superfície criam um campo elétrico no interior do condutor de mesma intensidade e sentido contrário ao campo externo, anulando o campo interior.

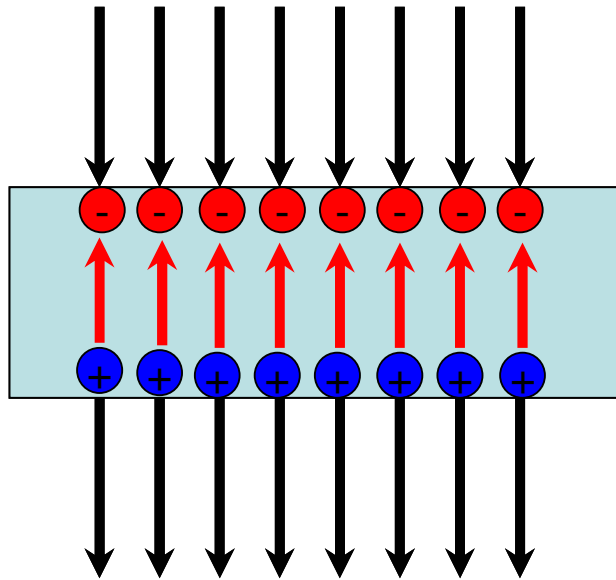


Figura 30 - Cargas superficiais anulando o campo elétrico no interior de um condutor.

Um dipolo é formado por duas cargas de mesmo valor q mas com sinais contrários separadas por uma distância d . O momento de dipolo é definido como $P = qd$. Um campo elétrico externo aplicado em um dipolo tende a girá-lo na forma mostrada na Figura 31. Nessa situação o dipolo também cria um campo elétrico oposto ao campo externo mas não suficiente para anulá-lo.

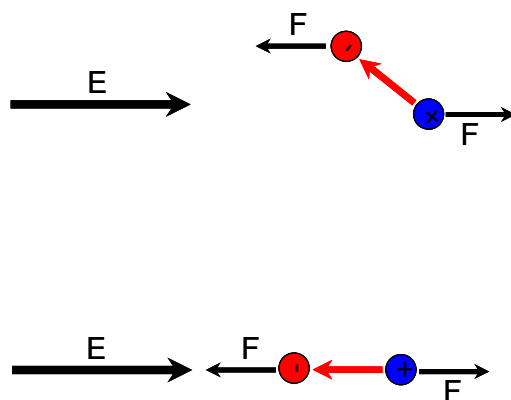


Figura 31 - Esquema representativo de movimento de dipolo quando aplicado campo elétrico

O exemplo acima foi aplicado a moléculas polares em que já existe um momento de dipolo, como é o caso da molécula de água. Sem um campo externo aplicado, entretanto, esses dipolos estão orientados aleatoriamente anulando o campo elétrico macroscópico. Mesmo moléculas não polares criam dipolos que se contrapõem ao campo externo por indução. A nuvem atômica dos elétrons é atraída em uma direção deixando carga positiva líquida na extremidade oposta da molécula criando o dipolo que se contrapõem ao campo externo. Um meio dielétrico diminui o campo elétrico no seu interior mas sem chegar a anulá-lo como os condutores. Esse efeito de “blindagem” do campo externo aparece na constante k da lei de Coulomb, $F = k \frac{q_1 q_2}{x^2}$. O k é dado por

$k = \frac{1}{4\pi\epsilon}$, onde ϵ é a constante dielétrica do meio. Note que, quanto maior ϵ , menor

a k e menor a força de interação entre os dois corpos. Isso acontece porque o meio dielétrico entre as cargas diminui o campo que cada uma delas percebe através do alinhamento contrário de seus dipolos. A constante dielétrica aumenta com a polarizabilidade das moléculas do meio. As mais polarizáveis são as moléculas polares, pois o campo externo só precisa girar essas moléculas para alinhar os dipolos. Já as moléculas não polares são menos polarizáveis, pois o campo externo precisa criar os dipolos por indução. Existem algumas regras práticas para a tendência da polarizabilidade dessas moléculas. Moléculas grandes tendem a serem mais polarizáveis

porque a distância entre os centros de cargas negativa e positiva tende a aumentar. Isso é especialmente verdadeiro em moléculas com carga delocalizada, como os elétrons do orbitais π das ligações duplas. As conjugações, uma ligação dupla seguida de uma simples, tendem a delocalizar os elétrons, permitindo que se movimentem quase livremente ao longo da cadeia de conjugações Figura 32. Cadeias desse tipo tendem a aumentar a constante dielétrica do meio.

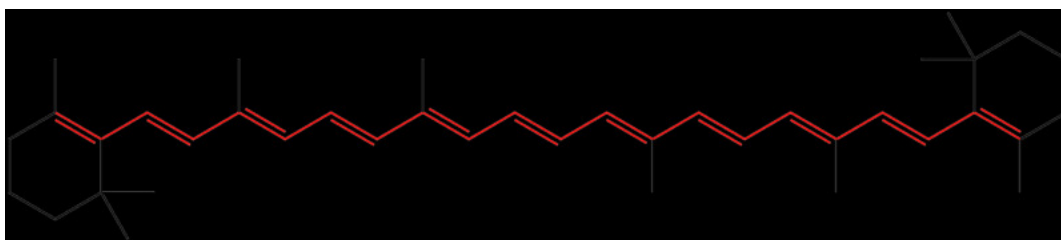


Figura 32 - Estrutura de conjugações do beta caroteno.

Anexo 3 - Cálculos da medida do tamanho da dupla camada de íons e potencial zeta

Quando um campo elétrico externo E é aplicado à célula há uma força elétrica $F_{elet} = \Delta q E = \rho(x) A \Delta x E$ que atua na fina dupla camada de área A e espessura Δx . Como a velocidade dos íons aumenta, também há uma força viscosa $F_{vis} = -\eta A d/dx [dv/dx] \Delta x$ equilibrando a força elétrica e mantendo constante a velocidade dos íons. Assim, para uma condição de equilíbrio tem,

$$\rho(x) A E \Delta x = -\eta A \frac{d^2 v}{dx^2} \Delta x \rightarrow \rho(x) E = -\eta \frac{d^2 v}{dx^2} \quad [\text{Equação 3}]$$

Considerando uma hemácia como um disco com o diâmetro muito maior que sua espessura, podemos descrever a dependência do potencial com a densidade de cargas de uma solução eletrolítica pela equação de Poisson em uma dimensão, $d^2 \Psi(x)/dx^2 = -\rho(x)/\varepsilon$ que resulta em

$$\frac{d^2 v}{dx^2} = \frac{\varepsilon E}{\eta} \frac{d^2 \Psi(x)}{dx^2} \rightarrow v = \frac{\varepsilon E}{\eta} \Psi(x) \quad [\text{Equação 4}]$$

A fina camada de cátions formada ao redor da célula movimenta juntamente com a célula e com a mesma velocidade (V_p). Assim sendo, o potencial é dado por:

$$v_p = (\varepsilon E / \eta) \zeta, \quad [\text{Equação 5}]$$

que é conhecido com equação de “Smoluchowski equation” (HUNTER, 1981), onde η é a viscosidade e ε é a permissividade elétrica da solução eletrolítica. Também é possível mostrar que o potencial zeta e o potencial elétrico podem ser escritos como:

$$\zeta = \sigma_s d / \varepsilon \quad \text{e} \quad \Psi(x) = (\sigma_s / \varepsilon k) e^{-kx} \quad [\text{Equação 6}]$$

onde σ_s é a densidade das cargas na superfície da dupla camada, $d = 1/k$ é o tamanho da dupla camada, $k^2 = (2n_o z^2 e^2 / \varepsilon k_B T)$, n_o e ze são a concentração e a força iônica do íon, T é a temperatura e k_B é a constante de Boltzmann (POLLACK et al., 1965). Usando a força viscosa da Equação 2 e 4 obtemos:

$$F_{visc} = -\eta A [dv/dx] = -A \varepsilon E [d\Psi(x)/dx] = A \varepsilon E k \Psi(x) \quad [\text{Equação 7}]$$

No plano de deslizamento, $\Psi(x) = \zeta$ e em equilíbrio a força óptica F_{op} é igual a força viscosa F_{vis} , que leva a:

$$F_{op} = (A \varepsilon \zeta / d) E \quad [\text{Equação 8}]$$

O potencial zeta foi obtido então usando a velocidade terminal medida, aplicada na Equação 3. A permissividade elétrica (CHELIDZE, et al., 2002) foi $\varepsilon = 1.06 \times 10^{-9} C^2 / N m^2$. O campo elétrico foi obtido dividindo a voltagem pela distância entre os eletrodos ($V = E \times d$) e o tamanho da dupla camada usando a Equação 6. O valor do potencial zeta usado na equação 6 foi o obtido pela Equação 5. As forças ópticas foram determinadas segundo o procedimento experimental descrito na seção anterior. A área eritrocitária usada foi $A = 50 \mu m^2$ e neste caso então, usando a Equação 5 e 6 podemos obter simultaneamente ambas as medidas (ζ e d) para a mesma célula.

Anexo 4 - Programa Matemático



```
SetOptions[NIntegrate,AccuracyGoal→2,PrecisionGoal→2,WorkingPrecision→3];
```

```
v[γ_]:= {Sin[γ],0,Cos[γ]};
```

```
δ[θ_,φ_,γ_,r_]:=,((Sin[γ] Sin[θ] Cos[φ]+Cos[θ] Cos[γ])^2-1+1/r^2)+(Sin[γ] Sin[θ]  
Cos[φ]+Cos[θ] Cos[γ]);
```

```
cσ[θ_,φ_,γ_,r_]:= (1+(r δ[θ,φ,γ,r])^2-r^2)/(2 r δ[θ,φ,γ,r]);
```

```
sσ[θ_,φ_,γ_,r_]:= (1-cσ[θ,φ,γ,r]^2);
```

```
eσ[θ_,φ_,γ_,r_]:=cσ[θ,φ,γ,r]+I sσ[θ,φ,γ,r];
```

```
sx[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:=n sσ[θ,φ,γ,r];
```

```
cx[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:= (1-sx[θ,φ,γ,r,n]^2);
```

```
ex[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:=cx[θ,φ,γ,r,n]+I sx[θ,φ,γ,r,n];
```

```
eα[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:= (eσ[θ,φ,γ,r]/ex[θ,φ,γ,r,n])^2;
```

```
eβ[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:= -1/ex[θ,φ,γ,r,n]^2;
```

```
Rs[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:= (Im[eσ[θ,φ,γ,r]/ex[θ,φ,γ,r,n]]/Im[eσ[θ,φ,γ,r]*ex[θ,φ,γ,r,n]])^2;
```

```
Rp[θ_,φ_,γ_,r_,n_]:= (Tan[Arg[eσ[θ,φ,γ,r]/ex[θ,φ,γ,r,n]]]/Tan[Arg[eσ[θ,φ,γ,r]*ex[θ,φ,γ,  
r,n]]])^2;
```

```
fc[θ_,φ_,γ_,r_,n_,R_]:= 1+R eσ[θ,φ,γ,r]^2-((1-R)^2 eα[θ,φ,γ,r,n])/(1-R eβ[θ,φ,γ,r,n]);
```

```
fz[θ_,φ_,γ_,r_,n_,R_]:= Re[fc[θ,φ,γ,r,n,R]];
```

```
fy[θ_,φ_,γ_,r_,n_,R_]:= Im[fc[θ,φ,γ,r,n,R]];
```


$z[\theta_,\varphi_]:=\{-\sin[\theta] \cos[\varphi], -\sin[\theta] \sin[\varphi], -\cos[\theta]\};$

$y[\theta_,\varphi_,\gamma_]:=z[\theta,\varphi] \cdot (v[\gamma] \cdot z[\theta,\varphi]);$

$yn[\theta_,\varphi_,\gamma_]:=y[\theta,\varphi,\gamma]/(y[\theta,\varphi,\gamma] \cdot y[\theta,\varphi,\gamma]+0.0001);$

$fs[\theta_,\varphi_,\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_}]:=fy[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},Rs[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}]] \cdot yn[\theta,\varphi,\gamma]+fz[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},Rs[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}]] \cdot z[\theta,\varphi];$

$fp[\theta_,\varphi_,\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_}]:=fy[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},Rp[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}]] \cdot yn[\theta,\varphi,\gamma]+fz[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},Rp[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}]] \cdot z[\theta,\varphi];$

$constante[\theta_{max_}]:=Integrate[\sin[\theta] \cos[\theta],\{\theta,0,\theta_{max}\},\{\varphi,0,2 \pi\}];$

$ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_},\phi_{1_},\phi_{2_}]:=NIntegrate[fs[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}][[1]] \sin[\theta] \cos[\theta],\{\theta,0,\theta_{max}\},\{\varphi,\phi_1,\phi_2\}];$

$ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_},\phi_{1_},\phi_{2_}]:=NIntegrate[fs[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}][[3]] \sin[\theta] \cos[\theta],\{\theta,0,\theta_{max}\},\{\varphi,\phi_1,\phi_2\}];$

$ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_},\phi_{1_},\phi_{2_}]:=NIntegrate[fp[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}][[1]] \sin[\theta] \cos[\theta],\{\theta,0,\theta_{max}\},\{\varphi,\phi_1,\phi_2\}];$

$ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_},\phi_{1_},\phi_{2_}]:=NIntegrate[fp[\theta,\varphi,\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n}][[3]] \sin[\theta] \cos[\theta],\{\theta,0,\theta_{max}\},\{\varphi,\phi_1,\phi_2\}];$

$ComponenteXPolariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_}] := (ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},0,\pi/2]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi/2,\pi]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi,3 \pi/2]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},3 \pi/2,2 \pi])/constante[\theta_{max}];$

$ComponenteZPolariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_}] := (ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},0,\pi/2]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi/2,\pi]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi,3 \pi/2]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}S[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},3 \pi/2,2 \pi])/constante[\theta_{max}];$

$ComponenteXPolariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_}] := (ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},0,\pi/2]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi/2,\pi]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi,3 \pi/2]+ComponenteXQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},3 \pi/2,2 \pi])/constante[\theta_{max}];$

$ComponenteZPolariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma_,\mathbf{r_},\mathbf{n_},\theta_{max_}] := (ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},0,\pi/2]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi/2,\pi]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},\pi,3 \pi/2]+ComponenteZQuadrante\phi_1\phi_2Polariza\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}P[\gamma,\mathbf{r},\mathbf{n},\theta_{max},3 \pi/2,2 \pi])/constante[\theta_{max}];$

$\text{Pi}/2] + \text{ComponenteZQuadrante} \phi_1 \phi_2 \text{PolarizaçãoP}[\gamma, r, n, \theta_{\max}, 3 \text{ Pi}/2, 2 \text{ Pi}]) / \text{constante}[\theta_{\max}];$

(*01/2006*)

SetAttributes[ComponenteXPolarizaçãoP, Listable];

a=ComponenteXPolarizaçãoP[Pi/2,

```
{
  0.39,
  0.59,
  0.98,
  1.37,
  1.48,
  1.36
}/2, 1.33/1.37, 57*Pi/180]
```

{-0.01, -0.015, -0.026, -0.042, -0.049, -0.042}

$F = (38 \cdot 10^{-3} \cdot 1.33 \cdot \{0.01, 0.015, 0.026, 0.042, 0.049, 0.042\}) / ((3 \cdot 10^8) / 10^{12})$

{1.68467, 2.527, 4.38013, 7.0756, 8.25487, 7.0756}

(*F=(P*1.33*{Q})/((3*10^8)/10^12)*)

Anexo 5 - Publicações e trabalhos apresentados

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Volume 28 - Suplemento 2 - Novembro 2006

ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA HEMO 2006

29º CONGRESSO DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

22º CONGRESSO DO COLÉGIO
BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA

5º CONGRESSO BRASILEIRO
DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA

6º ENCONTRO DE ENFERMAGEM EM HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA
E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

X SIMPÓSIO NACIONAL DE CAPTADORES DE DOADORES DE SANGUE

8º SIMPÓSIO DE ODONTOLOGIA EM HEMATOLOGIA

2º SIMPÓSIO DE PSICOLOGIA HOSPITALAR EM HEMATOLOGIA

1º SIMPÓSIO MULTIDISCIPLINAR EM HEMATOLOGIA

RECIFE - 3 A 6 DE NOVEMBRO DE 2006



Órgão Científico
Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia

ção da RP. **Objetivos:** Reconhecimento da RP e suas causas em um serviço de referência regional em Hematologia. **Materiais e Métodos:** foram avaliados pacientes com suspeita clínica de RP dos Serviços de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea (TMO) da Unicamp, no período de julho/05 a julho/06. A confirmação da RP foi baseada em um CCI após 60 minutos da transfusão (CCI 1) menor que 7.500 ou 24 horas (CCI 24) menor que 4.500, em pelo menos duas transfusões consecutivas. Foi realizada a pesquisa de anticorpos nos pacientes por imunofluorescência (PIFT) e linfotoxicidade. **Resultados:** Durante um período de 12 meses, 192 pacientes da Hematologia/TMO receberam transfusão de plaquetas. Destes pacientes, 14 (7,3%) apresentaram suspeita clínica de refratariedade. Em 7 pacientes (3,6% dos casos) a RP foi confirmada e em 3 (1,6%), afastada. Não foi possível o cálculo do CCI em 4 pacientes (2,1%): 3 por não necessitarem de transfusões após a suspeita clínica e 1 por falta de encaminhamento das amostras necessárias. A pesquisa de anticorpos anti-plaquetários (PAP) foi positiva em 5 (71,4%) dos pacientes com RP confirmada (incidência de refratariedade imune = 2,6%). Um paciente dos 4 sem confirmação de RP também apresentou PAP positiva. Fatores não imunes para RP puderam ser identificados em todos os pacientes. Dos 14 pacientes avaliados, 11 evoluíram para óbito. **Conclusões:** A refratariedade plaquetária acomete em geral pacientes graves, que necessitam de transfusões frequentes, sendo portanto esperado os altos índices de fatores associados e mortalidade observados. A incidência de refratariedade imune observada no presente estudo foi pouco inferior à descrita na literatura embora a casuística disponível seja pequena. Merece atenção a dificuldade logística para o diagnóstico da RP. A identificação da presença de anticorpos foi importante para a seleção de componentes apropriados para a transfusão, através de 'crossmatch', reforçando a necessidade do diagnóstico correto da RP.

845

Measurements of zeta potential and the compact layer of charge size in Red Blood Cells (RBC)

HP Fernandes¹, A Fontes², LY Pozzo², LC Barbosa², CL Cesar², V Castro³, ML Barjas-Castro³

¹Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

²Instituto de Física Gleb Wataghin - Unicamp

³Hemocentro da Unicamp

The red blood cell (RBC) membrane contains proteins and glycoproteins embedded in, or attached to, a fluid lipid bilayer that confers to it viscoelastic behaviour. The glycoprotein of the RBC membrane also leads to a negatively charged surface, which creates a repulsive electric (zeta) potential between the cells and prevents their aggregation in the blood stream. The interaction between erythrocyte antigens and antibodies causes cell agglutination, which is the basis of most of the immunohematologic tests in transfusion centers. Hemagglutination reactions can be induced by increasing the dielectric constant of the solution and decreasing the zeta potential (ζ) through the introduction of artificial substances such as dextran, albumin and polyvinylpyrrolidone. The aim of this study was to measure the RBC zeta potential (ζ) and the size (d) of the compact layer of charge (CLC) formed around the cell. The CLC is the first ion layer, rigidly bound to the membrane and could be moved together when the cell is dragged in a hydrodynamic flow. To perform the ζ -potential and CLC measurements a special chamber was built with an internal channel. This reservoir was 25 mm long, 1 mm wide, 75 mm deep and had 2 platinum electrodes connected to 50-100 V voltage power supply. Five samples of the RBC units were diluted (1 in 1.000 μ L) in AB plasma; with a viscosity (η) of 1,65 cP measured

at 25°C. Silica beads diluted (50 in 1000 μ L) in physiological serum 0,9% (10 μ L) were added to a RBC solution. These beads were trapped in the special chamber by optical tweezers. The zeta potential (ζ) was obtained by measuring the RBC terminal velocity after being released from an optical tweezers in an external constant electric field. The CLC size (d) was obtained measuring the displacement of the silica bead attached to the RBC (force as a function of applied voltage). The average of the zeta potential was $\zeta = -12,5$ mV and the size of CLC (d) 0,85 μ m. The results allowed us to characterize each cell individually, obtaining the zeta potential (ζ) and the size of the compact layer for the same RBC. Individual cell analysis methods are always more sensitive to small differences than those based on average values. In conclusion, we believe that the methodology proposed can provide information regarding cell agglutination that could improve the immunohematologic tests usually performed in transfusion centers.

846

Monitoramento de pacientes submetidos à transfusão sanguínea

RG Nogueira¹, LF Belém¹, MO Simões¹, ISC Silva²

¹Universidade Estadual da Paraíba

²Fundação Assistencial da Paraíba

A transfusão sanguínea pode ser uma intervenção que salva vidas, no entanto, como a maioria dos tratamentos, sempre traz riscos ao paciente, podendo resultar em um espectro de reações transfusionais que vai desde as mais leves até aquelas que podem ser fatais, como a incompatibilidade ABO. Com a finalidade de detectar as causas e prevenir as recorrências destas reações transfusionais, a hemovigilância baseia-se no monitoramento da utilização do sangue. Neste contexto, entende-se por segurança transfusional o conjunto de medidas adotadas que vise um menor risco aos doadores e receptores de sangue, a qual depende dos inúmeros fatores que constituem as etapas do ciclo hemoterápico. Esta pesquisa teve como objetivo detectar sinais e sintomas que evidenciassem reações adversas a hemocomponentes utilizados por pacientes atendidos num hospital do Estado da Paraíba, avaliando-se os serviços prestados por sua agência transfusional. A amostra da pesquisa compreendeu pacientes que receberam transfusão de sangue na clínica médica, oncológica, ambulatório de transfusão e UTI adulto. O estudo foi baseado em conceitos de hemovigilância e alternativas complementares que auxiliaram na análise da segurança transfusional da instituição. Durante o período de estudo foram analisadas 547 transfusões sanguíneas, distribuídas num total de 137 receptores. Foram encontrados registros de sinais e sintomas que transparecessem reações adversas a hemocomponentes em 18 transfusões, destas, 8 foram realizadas na Clínica Oncológica e a maior parte estava relacionada com concentrado de hemácias. Todos os quadros notificados caracterizaram reações transfusionais agudas leves: reação febril não-hemolítica e reação alérgica leve do tipo urticária. Os sintomas mais citados foram calafrios e febre. Quanto à segurança transfusional no hospital, notou-se que a equipe envolvida na cadeia transfusional ainda não possuía capacitação adequada, entretanto esforços estão sendo realizados para a melhoria dos serviços. As suspeitas de reações transfusionais não foram confirmadas/descartadas, logo sugere-se a disponibilidade de materiais essenciais para a realização dos testes pós-transfusionais. Apesar de este estudo ter alcançado dados estatísticos relevantes, as notificações de possíveis reações transfusionais podem ter sido subestimadas. Tal fato decorre de que a estrutura organizacional do hospital ainda não permite o funcionamento de uma hemovigilância eficaz, além de alguns pacientes não estarem conscientes e/ou serem incapazes de citar alguns sintomas difíceis de serem detectados.

Studying Red Blood Cell Agglutination by Measuring Membrane Viscosity with Optical Tweezers

Heloise P. Fernandes¹, Adriana Fontes², André A. de Thomaz³, Luiz C. Barbosa³, Maria L. Barjas-Castro⁴ and Carlos L. Cesar³

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Eletrônica Quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

⁴ Hematology and Transfusion Center, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

ABSTRACT:

The red blood cell (RBC) viscoelastic membrane contains proteins and glycoproteins embedded in a fluid lipid bilayer that are responsible for cell agglutination. Manipulating RBCs rouleaux with a double optical tweezers, we observed that the cells slide easily one over the others but are strongly connected by their edges. An explanation for this behavior could be the fact that when the cells slide one over the others, proteins are dragged through the membrane. It confers to the movement a viscous characteristic that is dependent of the velocity between the RBCs and justifies why is so easy to slide them apart. Therefore, in a first step of this work, by measuring the force as a function of the relative velocity between two cells, we confirmed this assumption and used this viscous characteristic of the RBC rouleaux to determine the apparent membrane viscosity of the cell. As this behavior is related to the proteins interactions, we can use the apparent membrane viscosity to obtain a better understanding about cell agglutination. Methods related to cell agglutination induced by antigen-antibody interactions are the basis of most of tests used in transfusion centers. Then, in a second step of this work, we measured the apparent membrane viscosity using antibodies. We observed that this methodology is sensitive to different kinds of bindings between RBCs. Better comprehension of the forces and

bindings between RBCs could improve the sensibility and specificity of the hemagglutination reactions and also guides the development of new potentiator substances.

KEYWORDS: Optical Tweezers, Red Blood Cell, Agglutination, Membrane Viscosity.

INTRODUCTION:

The red blood cell (RBC) viscoelastic membrane contains proteins and glycoproteins embedded in a fluid lipid bilayer that are responsible for cell agglutination. In cell agglutination some proteins from one cell link to other red blood cells. Mechanical measurements performed in agglutinated RBCs can provide valuable information about the type of cell agglutination and the number of bonds between the cells.

It was shown in previous work that when the RBC cells are dragged in a shear movement one over the other using a double optical tweezers, the proteins and/or the antigens that link the cells are dragged through their lipidic membrane and the force involved in this movement is of viscous nature [1]. Because the viscous forces are proportional to the drag velocity, an apparent membrane viscosity can be extracted from the curve force vs drag velocity. From this measurement it is possible to have information not only on the number and type of the bonds between the cells, but also on the whole membrane protein/antigen network that are dragged together. In this work, we show that we can use the measurement of the apparent membrane viscosity to differentiate RBC agglutination obtained using antibodies against erythrocyte antigens of the Rh system and control cells (RBCs).

Methods related to cell agglutination caused by antigen-antibody interactions are the basis of most of immunohematologic tests used in transfusion centers. Besides the protein binding, however, there are a set of barriers to prevent that the agglutination process would happen spontaneously in the blood stream. Due to the presence of the glycolipids, the RBC membrane surface is negatively charged and creates a repulsive electric (zeta) potential between the cells that prevents them to come close and, therefore, their aggregation [2, 3]. Better comprehension of the forces and bindings between RBCs could improve the sensibility and specificity of the hemagglutination reactions and also guides the development of new potentiator substances.

MATERIALS AND METHODS:

The RBC units were obtained from Hematology and Transfusion Center UNICAMP. Samples were diluted in plasma ABO compatible (0.5:1000 μL) with known refractive index (Abbe refractometer). The performed test was also analyzed using antibodies against erythrocyte antigen (system Rh), samples without antibodies were analyzed as control. Silica beads (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA) diluted in physiological serum was added to 10 μL of RBC solution. These silica beads act as a pico-Newton force transducer after a calibration using the displacement of the bead from the equilibrium position assuming a geometrical optics model. The displacement of the center of the bead under the presence of external forces was quantified with the software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Baltimore, MD, USA). Previous calibration of this procedure against hydrodynamic force showed good results [4]. All the measurements were carried out at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$). All the measurements were recorded in real time and captured by the computer.

The double optical tweezers consisted of a Nd:YAG laser strongly focused through a 100X oil immersion objective (NA = 1.25) of an upright Olympus microscope equipped with a CCD camera and a x-y-z motorized stage controlled by a computer or a joystick. The laser beam is divided once and recombined using polarizer beam-splitters. Two sets of telescopes are used in the system to capture particles in the same focal plane. Two gimbal mounts are used to steer the beam position in the focal plane and the extra telescope is used to translate the steer pivot to the back aperture of the objective, avoiding power losses. This means that the gimbal mounts and the back aperture are conjugated optical planes.

For the measurement of the apparent membrane viscosity the spatially fixed optical tweezers trap a silica bead binded to one RBC of a set of two cells agglutinated by nonspecific and specific bonds, while the second optical tweezers trap directly the other RBC. By moving the second optical tweezers with a computer controlled piezoelectric actuator it was possible to imprint any velocity between the RBCs and, at the same time, to measure the displacement of the trapped silica bead, as shown in figure 1. With this procedure we measured the optical force as a function of the velocity between the RBCs.

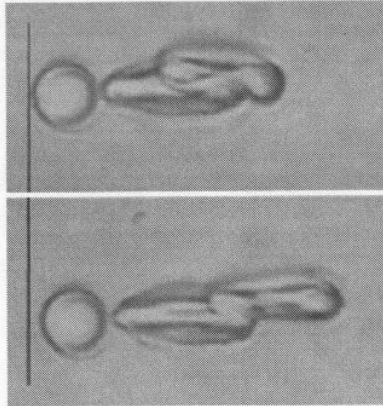


Figure 1. The measurement of the apparent membrane viscosity.

RESULTS:

The apparent membrane viscosity was determined using the Saffman Theory [5 - 6]. Basically, Saffman modeled a protein in a membrane as a cylindrical inclusion in a continuous film and computed the drag force on the cylindrical particle undergoing translational and rotational motion. He found for the force of a protein in translational movement:

$$F = 4\pi\eta_s \frac{1}{\ln(\eta_s/\eta a) - C} u \quad (1)$$

where η_s is the intrinsic membrane shear surface viscosity, η is the fluid viscosity, a is the radius of the cylinder, $C = 0.58$ is the Euler-Mascheroni Constant and u is the velocity. Considering that there are N proteins involved, we have:

$$F = 4\pi\eta_s N \frac{1}{\ln(\eta_s/\eta a) - C} u = \eta_m u \quad (2)$$

The unit of the parameter that incorporate the number of proteins and the other factors η_m , called apparent membrane viscosity, is poise. Figure 2 shows the plot of the force versus velocity that confirms the expected viscous behavior for the movement of one cell on top of the other. From this chart we can obtain the apparent membrane viscosity. Figure 3 shows the apparent membrane viscosity using antibodies against erythrocyte antigens - Rh system and control cells. From this figure, we observe that this methodology is sensitive to different kinds of bindings between RBCs. The result obtained for control RBC membrane viscosity median was 1×10^{-3} poise.cm and the samples analyzed with antibodies showed 2×10^{-3} poise.cm (Table 1).

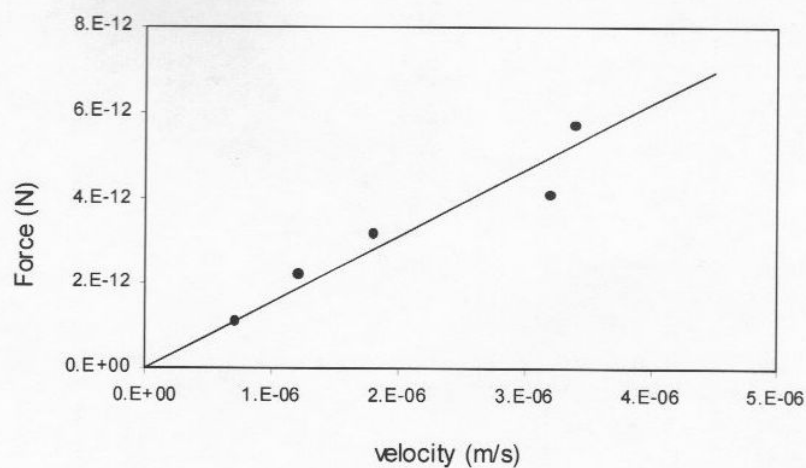


Figure 2. Plot of the optical force in function of the velocity between the cells.

Table 1. Results obtained for membrane viscosity for control RBCs and RBC plus antibodies.

	Number of cells analyzed	Membrane viscosity (poise.cm x 10 ⁻⁴)	Median (min-max)
Control	20	10	(0.1 - 2.5)
Antibodies	15	20	(1.0 - 4.0)

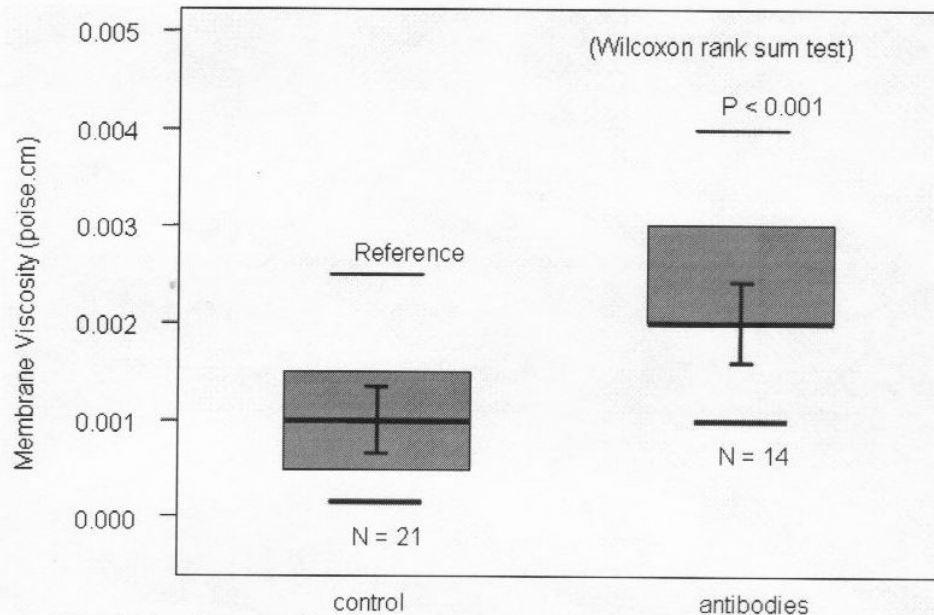


Figure 3. Plot of the results obtained for membrane viscosity for control and RBC plus antibodies.

CONCLUSION:

The results presented in this article demonstrated a new methodology using a double optical tweezers to determine the apparent membrane viscosity. The measurements of the apparent membrane viscosity are in agreement with values found in the literature. We observed that this methodology is sensitive to different kinds of bindings between RBCs. We were able to differentiate the apparent membrane viscosity measurements when compared control cells and RBCs linked to antibodies. The results showed that when antibodies were used on reaction, the membrane viscosity increased comparing to the control measurement (without antibodies). This demonstrates that these methodology is sensitive to a variety of factors that can interfere in agglutination reactions performance. Better comprehension of the forces and bindings between RBCs could improve the sensibility and specificity of the hemagglutination reactions and also guides the development of new potentiator substances.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors are grateful to CAPES, CNPq and FAPESP. This work is also linked with the CEPOF (Optics and Photonics Research Center, FAPESP).

REFERENCES:

1. A. Fontes, H. P. Fernandes, M.L. Barjas-Castro, A. A. Thomaz, L. Pozzo, L. C. Barbosa, C.L. Cesar, "Red blood cell membrane viscoelasticity, agglutination and zeta potential measurements with double optical tweezers". *Proceedings of SPIE* **6088**, 296 – 305, 2006.
2. E. H. Eylar, M. A. Madoff, O. V. Brody, J. L. Oncley, "The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte", *J. Biol. Chem.* **237**, 1992 – 2000, 1962.
3. W. Pollack, R. P. Reckel, "A reappraisal of the forces involved in Hemagglutination", *Int Archs Allergy Appl. Immun.* **54**, 29 – 42, 1977.
4. A. Fontes, S. Giorgio, A. B. de Castro Jr., V. M. Neto, L. Y. Pozzo, G. P. Marques, L. C. Barbosa, C. L. Cesar, "Determination of femto Newton forces and fluid viscosity using optical tweezers: application to *Leishmania amazonensis*", *Proceedings of SPIE* **5699**, 419 – 425, 2005.
5. P. G. Saffman, M. Delbruck, "Brownian motion in biological membranes", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3111 – 3113, 1975.

6. R. Dimova, K. Danov, B. Pouligny, I. B. Ivanov, "Drag of a solid particle trapped in a thin film or at an interface: influence of surface viscosity and elasticity", *J. Colloid and Interface Science* **226**, 35 – 43, 2000.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Volume 29 – Suplemento 3 - Novembro 2007

ANAIS DO
CONGRESSO BRASILEIRO DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
HEMO 2007

30º CONGRESSO DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

23º CONGRESSO NACIONAL
DO COLÉGIO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA

07 A 10 DE NOVEMBRO DE 2007
SÃO PAULO - SP - BRASIL



Órgão Científico
Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia

ANTÍGENOS DAS CÉLULAS DO SANGUE

0879

A experiência da Fundação Hemominas na fenotipagem Rh/Kell automatizada

LC Schmidt¹, ZM Vieira¹, MCF Silva¹, MEO Araújo¹, FV Basques¹, JM Cioffi¹¹Fundação Hemominas – Serviço de Imuno-Hematologia / Hemocentro de Belo Horizonte

Introdução: O sistema Rh é um dos mais polimórficos e imunogênicos sistemas de grupos sanguíneos em humanos. Os principais antígenos do sistema Rh são C, c, E, e. O antígeno D é responsável por cerca de 50% dos casos de aloimunização materno-fetal, seguidos principalmente dos antígenos K, c, C/G, E e Fya. Depois do sistema ABO, o sistema Rh é o de maior importância clínica na medicina transfusional. Atualmente o Hemocentro de Belo Horizonte é responsável pelo fornecimento de bolsas fenotipadas para todo o Estado de Minas Gerais e possui na sua base de dados 40.007 doadores fenotipados. A Fundação Hemominas implantou em 2006 a fenotipagem Rh/Kell automatizada, centralizada no Hemocentro de Belo Horizonte, para os doadores de 07 de suas 23 Unidades Regionais, com previsão de estender a todas as Unidades até o final de 2007. **Objetivo:** Avaliar a implantação da Fenotipagem Rh/Kell automatizada. **Material e Métodos:** Após rigoroso processo de validação foi implementada a fenotipagem eritrocitária nos sistemas Rh (C,c,E,e,Cw) e Kell (K), no PK 7200 (Olympus America, Inc.) para os doadores com 6 ou mais doações. Esse procedimento utiliza microplacas microterracadas. Os tubos e microplacas são identificados com código de barras. As amostras e reagentes são pipetados automaticamente. A leitura dos 24.000 pontos em cada poço da microplaca é realizada por um sistema de análise de imagens utilizando câmera CCD. Os dados são analisados por um microprocessador através de algoritmo padronizado pelo laboratório e interfaceados com o sistema Informatizado de Doadores. **Resultados:** No período de 06/03/06 a 19/08/07 foram fenotipados 6.611 doadores. Os testes foram analisados em duplicata para evitar falso positivo, 5% das amostras foram retestadas pela metodologia gel teste (Diamed, Brasil) e comparadas com amostras de fenótipo conhecido. A reprodutibilidade entre as amostras analisadas em duplicata e quando comparadas com as amostras de fenótipo conhecido foi de 100%. A redução média de reagentes foi de 900%, gerando considerável economia para a Instituição. O aumento de fenotipagens realizadas diariamente foi de 500%. Foi detectado 01 doador de fenótipo muito raro (CCDEE). **Conclusão:** O método de fenotipagem Rh/Kell automatizado mostrou-se eficiente, sensível e de alta reprodutibilidade. Permite conhecer o perfil fenotípico dos doadores e o encontro de fenótipos raros com maior eficácia. Foi demonstrado importante aumento na realização de testes por dia com redução significativa do consumo de reagentes e do tempo gasto na execução dos testes.

0880

A study of red blood cell agglutination forces using double optical tweezers

HP Fernandes¹, A Fontes², A Thomaz², LC Barbosa², CL César², ML Barjascastro³¹Instituto de Farmacologia²Instituto de Física Gleb Wataghin³Hemocentro Unicamp

Classic immunohematology approaches have been used in ma-

nual and automated transfusion laboratory routines. Red blood cell (RBC) agglutination depends on intermolecular attractive forces (hydrophobic bonds, Van der Waals, electrostatic forces and hydrogen bonds) and repulsive forces such as zeta potential. Dextran and enzymes can enhance agglutination and provide immunohematology investigation. Proteolytic enzymes reduce the red cell surface charge by cleaving sialic acid and dextran probably causes RBC aggregation by the formation of bridges between the cells. Better comprehension of the forces and bindings between RBCs could help to improve the sensibility and specificity of the immunohematological techniques. The aim of this study was to measure the force involved in RBC aggregation, using double optical tweezers, in normal plasma, in the presence of erythrocyte antibodies and associated to agglutination potentiators. The optical tweezers trapped RBC directly and dragged RBC at constant velocities (2, 5, 7, 1.2, 1.8 and 3.2×10^{-7} m/s) through the plasma fluid. The silica acts as a pico-Newton force transducer after a calibration using the displacement of the bead from the equilibrium position. Assuming a geometrical optical model, the displacement of the silica beads when the RBC was dragged provided a viscous force involved in agglutination (Fontes A. et al., 2006). Samples from RBC units from donor group O Rh(D) positive were diluted in serum AB (0.5:500 μ L) and/or Dextran 0,15% (1:1 v/v) and/or Bromelain 20%. Silica beads 4 μ m in diameter were added (10 μ L) to the RBC suspension. Samples with anti-D polyclonal (10 μ L) antibodies and with papain treated RBC were also analysed. The result of control RBC median viscous force was 1×10^{-3} (0.1-2.5) poise.cm. The samples analysed with anti-D serum showed 2×10^{-3} (1.0-4.0) poise.cm. RBC with dextran 0,15% and bromelain without anti-D did not present agglutination. High adherence was observed when RBCs were treated with papain. The hemagglutination forces obtained from RBC with antibodies were statistically higher ($p < 0.001$) when compared to controls. The results of RBC associated with enzymes were in agreement with the method used for treating the cell (bromelain one step and papain two steps). Dextran is considered the chosen potentiator associated to bromelain for automated tests. Recently, Pribush et al 2007 provided an argument that dextran forms bridges between the cells, however it was not possible to observe and measure the bridges in this sensitive model. In conclusion, the model can help to standard automated hemagglutination test using different potentiator solutions, to improve the sensibility and specificity of the reactions and also guide the development of new potentiator substances.

0881

Aloimunização anti-JS(B) identificada em paciente idosa com utilização de reagente ZZAP

TIBB Kühn¹, MJ Silva¹, DA Pires¹, HR Soares¹, EJ Sekiya², A Alves²¹Hemolife – Instituto de Pesquisas Imunohematológicas²Hemocentro São Lucas

Introdução: O Hemocentro São Lucas realiza o atendimento transfusional em 42 hospitais de São Paulo, ABC, Osasco e Guarulhos, realizando cerca de 40.000 transfusões anuais. Nos últimos 4 anos, o Hemocentro São Lucas enviou amostras de 2.450 pacientes que demandaram a identificação de anticorpos irregulares ao Hemolife – Instituto de Pesquisas Imunohematológicas, sendo verificado apenas um caso no qual o anticorpo envolvido era o anti-Jsb (0,04%). Segundo dados publicados na literatura pesquisada, a presença do antígeno Jsb pode chegar a 98% em indivíduos negróides e 99,9% em caucasianos, o que torna rara a frequência dos anticorpos dirigidos contra esse antígeno. Assim como os outros anticorpos contra antígenos do sistema Kell o Anti-Jsb (anti-K7) também é considerado anticorpo com importância clínica. **Relato de Caso:** No dia 19/06/2007 foi



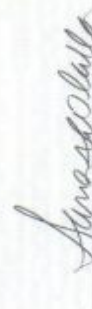
C E R T I F I C A D O

Certificamos que **Heloise Fernandes** participou do Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2007, realizado no período de 7 a 10 de novembro, como congressista.



30º Congresso
da Sociedade Brasileira
de Hematologia
e Hemoterapia

São Paulo, 10 de novembro de 2007


Sara Tercinha Olalla Saad
Presidente



23º Congresso
Nacional do
Colégio Brasileiro
de Hematologia



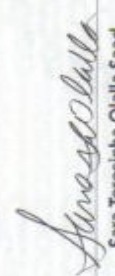
C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho intitulado “A STUDY OF RED BLOOD CELL AG-
GLUTINATION FORCES USING DOUBLE OPTICAL TWEEZERS” de autoria
de HP Fernandes, A Fontes, A Thomaz, LC Barbosa, CL César, ML Barjas-castro,
foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2007, reali-
zado no período de 7 a 10 de novembro, na categoria oral.



30º Congresso
da Sociedade Brasileira
de Hematologia
e Hemoterapia

São Paulo, 10 de novembro de 2007


Sara Teresinha Olalla Saad
Presidente



23º Congresso
Nacional do
Colégio Brasileiro
de Hematologia

blood

JOURNAL OF
THE AMERICAN
SOCIETY OF
HEMATOLOGY

VOLUME 112
NUMBER 11
16 NOVEMBER 2008

American Society of
Hematology

Fiftieth annual meeting
abstracts

December 6-9, 2008

San Francisco, California

www.bloodjournal.org



in an extremely remote risk of prion transmission by the VWF / FVIII product Haemate® P / Humate-P®.

Disclosures: Groener: CSL Behring. Employment. Groschup: CSL Behring. Research Funding. Schäfer: CSL Behring. Employment.

Abstract 996

Poster Board I-101

Platelet Activation Rather Than Apoptosis Contributes Most to the Platelet Storage Lesion during Conventional and Extended Storage of Platelet Concentrates. VALÉRY LEYDIN¹, David J. Allen¹, Asuman Mutlu¹, Sergiy Mykhaylov¹, Elena Lyubimov¹, Armen V. Gyulkhandanyan¹ and John Freedman, MD², ¹Transfusion and Laboratory Medicine, The Keenan Research Centre in the Li Ka Shing Knowledge Institute of St. Michael's Hospital, Toronto, ON, Canada, ²Departments of Laboratory Medicine and Pathobiology, Medicine, St. Michael's Hospital and University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Platelet storage lesion is a serious problem limiting clinical use of platelet concentrates (PC) after extended and long-term storage. Platelet activation is a well-known manifestation of platelet storage lesion. However, over the last decade, platelet apoptosis has been also recognized in stored PCs and in platelets following exposure to thrombin, calcium ionophores, anti-platelet antibodies and very high shear stresses. The aim of this study was to elucidate the contribution of platelet activation and apoptosis to the platelet storage lesion during conventional (Days 2-5), extended (Days 6-8) and long-term (Days 11-16) PC storage. We prepared seven prestorage-leukoreduced PC by the platelet-rich plasma (PRP) method, stored PC for 2-16 days at 22°C, and used flow cytometry for determining platelet activation as P-selectin (CD62) exposure and platelet apoptosis as depolarization of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\psi_m$), activation of executioner caspase-3, exposure of phosphatidylserine (PS) and release of apoptotic platelet fragments microparticles (MP). Platelet activation and apoptotic responses were also determined in fresh (Day 0) PRP using thrombin titration. We found a significant increase of platelet activation under conventional PC storage for 2-5 days ($38.6 \pm 3.1\%$ CD62 positive cells, $P < 0.0001$). With extended (Days 6-8) storage, platelet activation was increased to $66.5 \pm 5.3\%$ and reached the maximal level of $92.0 \pm 1.1\%$ after 11-12 storage days ($P < 0.0001$). In contrast, $\Delta\psi_m$ depolarization and caspase-3 activation did not increase in comparison with Day 0 platelets, even after PC storage for 12 days ($P > 0.05$) and storage for 13-16 days was required for significant triggering these apoptotic events ($P < 0.05-0.0001$). Similarly, although we observed a slight increase of PS exposure (5-10%) and MP release (9-11%) during PC storage for 2-12 days, incubation for 13-16 days was required for a stronger (30-60%) stimulation of these apoptotic manifestations ($P < 0.001-0.0001$). Paired comparison between the effects of PC storage on CD62 exposure and apoptotic events clearly demonstrated for all storage times a significantly higher level of platelet activation than levels of $\Delta\psi_m$ depolarization, caspase-3 activation, PS exposure and MP release ($P < 0.01-0.0001$). Furthermore, we found that when fresh (Day 0) PRP was treated with different thrombin doses, ranging from 0.05 to 10 U/ml, a much higher maximal level of platelet activation (~90%) was reached, in comparison to the level of apoptosis (30-40%), and 100- to 200-fold lower dose of thrombin were required for maximal induction of activation (0.05-0.1 U/ml) than for stimulation of apoptosis (10 U/ml). Taken together, these data indicate that (i) during PC storage, platelet activation is triggered much earlier than platelet apoptosis, (ii) platelet activation rather than apoptosis contributes most to the platelet storage lesion during conventional (Days 2-5) and extended (Days 6-8) PC storage whereas during long-term (Days 13-16) storage both responses are involved in platelet deterioration, and (iii) platelet activation and apoptosis are different phenomena; they may be induced by different mechanisms and/or require quite different levels of triggering stimuli.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Abstract 997

Poster Board I-102

Dynamic Pattern of Adhesion Receptor Expression during the Maturation of Ex-Vivo Generated Human Adult and Neonatal Erythroid Cells. GIOVANNI MIGLIACCIO, Ph.D.¹, Massimo Sanchez, Ph.D.¹, Francesca Masiello, Ph.D.¹, Valentina Tirelli, Ph.D.¹, Katija Ilicic, Ph.D.², Annalisa Mancini, Ph.D.³, Paul S. Frenette, MD³ and Anna Rita Migliaccio, Ph.D.³, ¹Cell Biology and Neuroscience, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy, ²Hematology/Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy, ³Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

The maturation of erythroid cells occurs in specialized areas of the marrow in close proximity to macrophages. The mature cell, the reticulocyte, loses its association with the macrophages and egresses into the blood stream. This dynamic pattern of cellular interactions is mediated by specific adhesion receptors, such as CXCR4 (CD184), VLA-4 ($\alpha 4$ integrin, CD49d) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1 or CD162). Culture conditions capable to generate ex vivo human erythroblasts in numbers sufficient for transfusion have been recently established by several investigators. The aim of this study was to evaluate whether these ex vivo-generated erythroblasts would express the adhesion receptor profile required for establishing, once injected in vivo, the cellular interactions necessary to complete their maturation. For this purpose, the pattern of CD184, CD49d and CD162 expression during the maturation of human erythroblasts generated ex vivo from adult and cord blood was investigated. Erythroblasts were divided into 4 classes of maturation by cytofluorimetric criteria based on the levels of CD36 and CD235a (glycophorin A) expression: class 1, CD36^{low}CD235a^{neg} (CFU-E); class 2, CD36^{high}CD235a^{low} (pro-erythroblasts); class 3, CD36^{high}CD235a^{high} (basophilic-polychromatic erythroblasts) and

class 4, CD36^{low}CD235a^{high} (orthochromatic erythroblasts). The transition of the different cell populations through the maturation process was tracked by cell cycle analyses and CFSE staining. Large numbers ($> 5 \times 10^7$) of erythroblasts were generated from as little as 10 mL of either cord- or adult blood after 10-11 days of culture in the presence of hematopoietic growth factors, dexamethasone and estradiol (Migliaccio et al, BMD 28: 169, 2002). Cord blood-derived cells remained significantly more immature than the adult blood-derived ones (e.g. 60% vs 10% in class 1). Class 1-2 cells were mostly in G1 (G1=74%, S=21% and G2=3-5%) while a large proportion of the class 3 cells were in S (G1=34-56, S=43-56% and G2=10-11%). Changes in the levels of CFSE staining indicated that class 3 cells completed one division within 24 hrs and did not divide further. On the other hand, class 1-2 cells completed one division in 24 hr and their progeny was composed both by class 1-2 and class 3 cells (in a 50% ratio). The class 1-2 progeny divided at least one more time in the following 24 hrs while the class 3 progeny did not divide progressing directly toward the mature class 4. The majority of class 1-2 cells expressed low level of CD184 (80-85% CD184^{low} and 15-20% CD184^{high}) and high levels of CD49d and CD162. When these cells were induced to mature by exposure to EPO alone, they rapidly (within 24 hrs) expressed high levels of CD184 and CD49d while the expression of CD162 was reduced. By the end of 4 days of the maturation culture in the presence of EPO, most of the cells had progressed to the mature class 3-4 phenotype. These mature class 4 cells were CD184^{low}, CD49d^{low} and CD162^{low}. Therefore, in vitro maturation of ex vivo-generated cord and adult blood erythroblasts was associated with a dynamic pattern of adhesion receptor expression. Although, the changes observed with cord and adult blood-derived erythroblasts were similar, they occurred more rapidly and with a higher magnitude in cord blood-derived cells. In conclusion, the pattern of CD184, CD49d and CD162 expressed by ex vivo-derived human erythroblasts suggests that these cells might be capable to establish proper cellular interactions and to progress in their maturation following in vivo infusion.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Abstract 998

Poster Board I-103

Sensitive and Simple Methodologies for Measuring of Red Blood Cell (RBC) Electrical Properties and Cell Aggregation. Heloise Pockel Fernandes, Bsc.¹, Adriana Fontes, PhD², André A Thomaz, Msc³, Luiz C Barbosa, PhD³, Vagner Castro, MD, PhD⁴, Carlos Lenz Cesar, PhD³ and MARIA LOURDES BARIAS-CASTRO, MD, PhD⁵, ¹Department of Pharmacology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brazil, ²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife - PE, Brazil, ³Departamento de Eletrônica Quântica, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brazil, ⁴Dept. of Hematology/Transf Medicine Ctr., State Univ. of Campinas - UNICAMP, Campinas, Brazil, ⁵Trans. Med., Carlos Chagas 480, Hem. Unicamp - State Univ. of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil

The red blood cell membrane contains proteins and glycoproteins embedded in a fluid lipid bilayer that confers viscoelastic behaviour. Sialylated glycoproteins of the RBC membrane are responsible for a negatively charged surface, which creates a repulsive electric zeta potential (ζ) between the cells.

The compact layer of charge or Stern consists of ions rigidly bonded to the cell and the double layer includes ions diffusely distributed around the cell. Measurement of RBC layer of charge and zeta potential can be used as a marker of RBC membrane injury. Study of membrane electrical properties and forces and bindings between cells, can provide a better comprehension of membrane injury presented in RBC unit storage, after RBC unit irradiation, cell senescence process and in addition, also to improve the sensitivity and specificity of the hemoagglutination reaction. The aim of this study was to measure the RBC double layer thickness of the charge (DLC) around the cell, zeta potential (ζ) and cell aggregation force, using optical tweezers.

To measure DLC (d) and zeta potential (ζ) a special chamber was built consisting of 2 platinum electrodes separated by a channel. An external electrical field (E) was applied with a voltage power supply connected to the electrodes. The optical tweezers consisted of Nd:YAG laser beam focused through the 100x objective of a microscope equipped with a minicam, which registered the trapped cell image in real time. These images were recorded in VHIS and captured in a computer where they could be analyzed using Image Pro Plus software. Optical tweezers utilizes the light momentum transfer to trap the silica beads with pico Newtons forces (10^{-11}). Ten RBC units from healthy blood donors were collected in CPDA-1. Samples were diluted (1:1000) in AB plasma. Silica beads were added to a RBC solution (10 μ l). DLC thickness (d) was obtained measuring, in the special chamber, the force on the silica bead attached to a single RBC in response to an applied voltage (50-100V). Zeta potential (ζ) was obtained by measuring the RBC terminal velocity (Tv) after being released from the optical trap at a constant voltage applied supply (100V) $Tv = (eE/\eta)\zeta$, ϵ - medium dielectric constant; η - viscosity). The DLC was calculated by the equation $Pop = (A\zeta/d)/E$ (Pop = optical force; A = RBC area). DLC median size (d) was 0.85 μ m (min 0.4/max 1.3) and zeta potential was $\zeta = -12.5$ mV (min -9.3/max -15). These results were in accordance with the data in literature, where other methods to measure the same property were used.

For measuring RBC aggregation, a silica bead attached to RBCs was trapped and the force needed to slide one RBC over the other, as a function of the velocities (2.5, 7.12, 18, 32 $\times 10^{-3}$ m/s) was determined. RBC O Rh(D) positive were diluted (1:1000) in plasma AB (control group) and in agglutination potentiator solutions, used in immunohematological tests (dextran 0.15%, low ionic strength solution-LISS, bromelain and papain enzymes). Aggregation was also analyzed using anti-D antibodies serum (5 μ l). The median aggregation force obtained of 20 RBC control samples was 1×10^{-3} (0.1-2.5) poise.cm. Samples analyzed with dextran 0.15%, LISS and bromelain lacking antibodies showed no agglutination. RBCs treated with papain enzyme presented high adherence preventing the capability of separating cells. The 20 samples analyzed with anti-D serum showed median aggregation force 2×10^{-3} (1.0-4.0) poise.cm. These results obtained from RBC with antibodies were statistically higher ($p < 0.001$) when compared to control. The method revealed to be sensitive and results were in accord with serological tests used in transfusion

routine, where false positive results could be frequently found in RBC treated with papain, however rarely obtained with dextran and bromelain. In conclusion, the methodologies proposed are simple and may provide specific information on RBC interaction in addition to cell aggregation. Individual cell analyze methods are always more sensitive to small differences than those based on average values. This is the first time that the size of the double layer was measured using optical tweezers and the ability of the optical trap also allowed us to obtain the zeta potential and DLC thickness for the same RBC.

ACKNOWLEDGEMENTS: CAPES, CNPq and FAPESP

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Abstract 999

Poster Board I-104

Effect of Storage on Levels of Nitric Oxide Derivatives in Blood Components. Fabiola G Rizzatti, MD¹, MELISSA A QAZI, BS¹, David Stroncek, MD², Nathawut Sibmooh, MD¹, Barbora Pkynova, PhD¹ and Alan N Schechter, MD¹, ¹Molecular Medicine Branch, National Institutes of Health - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA, ²Transfusion Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

In light of recent papers stressing the importance of decreased levels of SNO-hemoglobin (SNO-Hb) to the pronounced nature of deleterious effects of transfusion of stored red blood cells (RBCs), there has been an increased interest in the practice of blood storage. Dejam et al. (Blood, 2005) previously demonstrated the critical nature of RBCs in NO physiology; they serve as the major intravascular stores of nitrite, which is eventually converted to NO, an important player in vasoregulation. The purpose of this study is to quantify the NO metabolites, nitrite and nitrate, in three blood components and evaluate their levels over time of storage. Blood obtained from 6 healthy volunteer donors was split into whole blood, leukoreduced, and non-leukoreduced packed RBCs and stored in polyvinyl chloride (PVC) bags for 42 days at 4°C. PVC bags were maintained in either room air or an argon chamber. Nitrite, nitrate, and SNO-Hb/nitrosyl-hemoglobin (HbNO) were measured using reductive gas-phase chemiluminescence. In all blood components, the nitrite and nitrate were detected in higher concentrations in RBCs than in the extracellular fluid compartment. Mean nitrite value immediately before storage was 152±13nM, but fell rapidly upon storage. Nitrite levels continued to decrease with storage time, while nitrate levels remained constant for the duration of storage. In the leukoreduced blood product, nitrite levels were 75±8nM on day 1 and 50±9nM by day 42; the concentration of nitrate in the leukoreduced blood product was 34±3uM on day 1 and 34±4uM on day 42. The nitrite levels in non-leukoreduced blood product were 76±12nM on day 1 and 37±7 by day 42; the nitrate concentration in the non-leukoreduced blood product was 35±3uM on day 1 and 32±0.4uM on day 42. In whole blood, nitrite levels were 64±11nM on day 1 and 44±9nM by day 42; the nitrate concentration was 47±2uM on day 1 and 43±6uM on day 42. SNO-Hb levels were very low in fresh blood and virtually undetectable after one day of storage. Interestingly, nitrite levels never reached zero. Enzyme inhibitors—L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor), acetazolamide (carbonic anhydrase inhibitor), and oxypurinol (xanthine oxidase inhibitor)—did not lower nitrite levels enough to explain the remaining nitrite present in the PVC bags after 42 days. pH decreased slightly, while pO₂ increased in all three components during storage; this is likely due to the diffusion of oxygen from room air into the PVC bags. Control experiments with saline showed an increase in nitrite levels, while nitrate levels remained stable over 42 days. When stored in an argon chamber, both blood and saline samples showed relatively lower nitrite levels than their room air counterparts. Thus, during blood bank storage, nitrite levels decrease in blood while nitrate levels remain stable. The diffusion of nitrogenous gases may explain why nitrite does not completely disappear under standard storage conditions. Our results suggest that most of the NO pathway is initially retained, but greater changes occur with prolonged storage. These measurements of NO derivatives may have implications for transfusion therapy, explaining some of the adverse effects seen with RBC transfusion and providing a foundation for enhancing blood preservation through improvement of storage practices.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

BioLogic Therapies for NHL (Excluding Pre-clinical Models) Poster I

Abstract 1000

Poster Board I-105

A Phase 2 Clinical Trial of SGN-40 Monotherapy in Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma. RANJANA ADVANI, MD¹, Sven De Vos, MD, PhD², Stephen M. Ansell, MD³, Brad Kahl, MD⁴, Bruce D. Cheson, MD⁵, Nancy L. Bartlett, MD⁶, Richard R. Furman, MD⁷, Jane N. Winter, MD⁸, Henry Kaplan, MD⁹, David Dornan, PhD¹⁰, Nancy Whiting, PharmD, BCOP¹¹, Jonathan Drachman, MD¹² and Andres Forero-Torres, MD¹³, ¹Stanford University, Stanford, CA, USA, ²David Geffen School of Med. at UCLA, Los Angeles, CA, USA, ³Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, ⁴University of Wisconsin, Madison, WI, USA, ⁵Lombardi Cancer Ctr., Georgetown Univ. Hosp., Washington, DC, USA, ⁶Washington University, Saint Louis, MO, USA, ⁷Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA, ⁸Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA, ⁹Swedish Cancer Institute, Seattle, WA, USA, ¹⁰Research Oncology Diagnostics, Genentech, South San Francisco, CA, USA, ¹¹Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA, USA, ¹²Seattle Genetics, Bothell, WA, USA, ¹³University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

BACKGROUND: SGN-40 is a humanized monoclonal antibody that targets CD40. Upon binding to CD40, SGN-40 triggers pro-apoptotic signal transduction pathways and mediates effector cell functions (ADCC and ADPCP). SGN-40 demonstrated

preliminary anti-tumor activity in a phase 1 study of non-Hodgkin lymphoma, including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients (ASH 2006, Abstract 695). **METHODS:** We conducted a multicenter, phase 2, open-label study to determine the overall response rate and toxicity profile of SGN-40 in patients with relapsed DLBCL. Tumor samples were assessed by a central lab for pathology confirmation and CD40 expression. Eligible patients had de novo or transformed DLBCL at diagnosis and were excluded if previously treated for indolent lymphoma. Required prior therapy consisted of combination chemotherapy with rituximab and, if eligible, autologous stem cell transplantation. Patients received 6 intravenous infusions of SGN-40 over 5 weeks (Cycle 1) with intrapatient dose loading (1 mg/kg on Day 1; 2 mg/kg on Day 4; 4 mg/kg on Day 8) and 8 mg/kg/wk thereafter. Responding patients and those with stable disease were eligible to continue therapy until disease progression or a maximum of 12 cycles. **RESULTS:** Forty-six patients (28 M, 18 F), with a median age of 72 years (range 17-85), were enrolled at 10 centers in the US. Patients were heavily pre-treated, with a median of 4 prior systemic chemotherapy regimens (range 1-10). Immunohistochemistry analysis of patient tumor samples demonstrated high expression of CD40 in all patients with the exception of 1 patient who was negative. Thirty-eight of the 46 patients met predefined criteria for evaluation (completed dose loading and had no major protocol violations). Best responses seen were CR (n=2, 5%) and PR (n=2, 5%), yielding an ORR of 10%. Furthermore, 9 (24%) patients had SD as best response. Reductions in tumor size were seen in approximately one-third of patients. Twenty (53%) patients had PD and 5 (13%) patients have yet to be assessed. Treatment with SGN-40 was generally well tolerated. Grade 3/4 events that occurred in more than 1 patient in the intent-to-treat population (N=46), regardless of drug attribution were thrombocytopenia (n=5); neutropenia (n=4); and anemia, fatigue, pneumonia, hyponatremia, DVT, and disease progression (n=2 pts each). Of these events, only fatigue (n=2) and neutropenia (n=2) were considered drug related by the investigator. **CONCLUSION:** Monotherapy with SGN-40 in DLBCL patients is well tolerated and resulted in objective responses consistent with the previous phase 1 experience. These data support further evaluation of SGN-40 in combination with chemotherapy in non-Hodgkin lymphoma; 3 combination clinical trials are ongoing. Retrospective correlation of clinical outcome and a gene signature that includes baseline CD40 activation status are planned.

Disclosures: Advani: Seattle Genetics, Inc.: Research Funding. De Vos: Seattle Genetics, Inc.: Consultancy. Kahl: Seattle Genetics, Inc.: Research Funding. Cheson: Seattle Genetics, Inc.: Membership on an entity's Board of Directors or advisory committees. Winter: Seattle Genetics, Inc.: Research Funding. Dornan: Genentech, Inc.: Employment. Whiting: Seattle Genetics, Inc.: Employment, Equity Ownership. Drachman: Seattle Genetics, Inc.: Employment, Equity Ownership. Forero-Torres: Seattle Genetics, Inc.: Research Funding.

Abstract 1001

Poster Board I-106

Elderly Patients with Mantle Cell Lymphoma (MCL) – Efficacy and Feasibility of Prolonged Immunochemotherapy with Rituximab, Cytarabine and Fludarabine Added to CHOP and Followed by Rituximab Maintenance Treatment. A Prospective Study by the Finnish Lymphoma Group. ERKKI ELONEN¹, Riikka Rätty², Tuomo Honkanen³, Esa Jantunen³, Sirkku Jyrkkio⁴, Marja-Liisa Karjalainen-Lindsberg⁵, Outi Kuittinen⁶, Minna Lehto⁷, Eira Poikonen⁸, Auvo Rauhala⁹, Johanna Rimpiläinen⁸, Anu Räsänen⁹, Sanna Siitonen¹⁰, Merja Suominen¹¹ and Mirja Vapaatalo¹, ¹Department of Hematology, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland, ²Department of Medicine, Päijät-Häme Central Hospital, Lahti, Finland, ³Department of Hematology, Kuopio University Hospital, Kuopio, Finland, ⁴Department of Oncology, Turku University Central Hospital, Turku, Finland, ⁵Huslab, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland, ⁶Department of Oncology, Oulu University Hospital, Oulu, Finland, ⁷Department of Medicine, Vaasa Central Hospital, Vaasa, Finland, ⁸Department of Medicine, Pohjois-Karjala Central Hospital, Joensuu, Finland, ⁹Department of Medicine, Kymenlaakso Central Hospital, Kotka, Finland, ¹⁰Lab. (Hem.) Dept., Helsinki Univ. Ctr. Hosp., Helsinki, Finland, ¹¹Department of Medicine, Kanta-Häme Central Hospital, Hämeenlinna, Finland

Background: The Nordic Lymphoma Group has shown that adding cytarabine (AraC) and rituximab (R) to high dose CHOP and autologous stem cell transplantation increases response rate, event free survival (EFS), progression free survival (PFS) and overall survival (OS) of patients (pts) with MCL < 65 years (Geisler et al, Blood 2008). About 50% of pts with MCL are older than 65 years. Most of them are not candidates for high dose chemotherapy or transplantations and no satisfactory standard treatment is known for them. In this prospective pilot trial for elderly pts we explored the feasibility and efficacy of a prolonged standard dose induction treatment (10 cycles) with potentially synergistic combinations followed by R maintenance. **Methods:** Eligible were pts with histologically confirmed MCL (WHO criteria), CD5+, CD19/20+, cyclinD1+, age > 65 years, with adequate organ functions and performance status < 4. Induction: standard dose R-CHOP (cycles 1, 3, 5), R-AraC (R 375mg/m² x 1, AraC 1g/m² 4 doses with 12 hrs intervals, cycles 2, 4), R-AraC with fludarabine (F) (2 doses of F 25 mg/m², cycles 6 - 8), CHOP (cycles 9-10). Maintenance for pts with CR/PR: R 375 mg/m² bimonthly x 12. Diagnostic workup included physical examination, CT scan, histological lymph node biopsy, bone marrow aspiration and biopsy, and immunohistology or flow cytometry of the diagnostic material. Endoscopies were performed for symptomatic patients. Responses were evaluated according to revised criteria (Cheson et al JCO 2007) after 5th, 8th, 10th cycles and after that every 6 months. **Results:** Thirty four pts were recruited. Age median 74 years (67-79 years). Performance status 0 n=12, 1 n=16, 2 n=3, 3 n=3. Stage IIA n=1, IVA n=20,

Abstract Control Id: 646078
Abstract Publication #: SP228
Abstract Title: Measuring Red Blood Cells Electrical Membrane Charges Using Optical Tweezers

Dear Dr. Maria Barjas-Castro,

The AABB Selection of Abstracts Program Unit has selected the abstracts for presentation at the 2009 AABB Annual Meeting that will take place October 24 - 27, 2009 in New Orleans, Louisiana. I am pleased to inform you that your abstract has been selected as a Poster Presentation and will be displayed starting on Saturday, October 24, 2009 at 7:30 am to Tuesday, October 27, 2009 at 2:00 pm. In addition, all accepted abstract posters will be available to annual meeting attendees via the ePoster/Online Abstract web-based system from Friday, October 23 until Monday, November 30, 2009. During the meeting, online posters may be reviewed from the Cyber Connection located in Hall I1 (eye-one) near the AABB Action Center and Bookstore, in the Abstract Theater located in the hall with the physical poster boards, and from a laptop or computer anywhere at any time. The site for viewing online posters will be accessible only for 2009 AABB Annual Meeting attendees.

There will only be one poster session this year. Details regarding your presentation are listed below:

Display Group Title: Red Blood Cells: Molecular Genetics

Abstract # and Title: SP228 Measuring Red Blood Cells Electrical Membrane Charges Using Optical Tweezers

Location: New Orleans Convention Center, Hall I2 (eye-two)

1. Hang your poster Friday, October 23 between 3:00 pm - 6:00 pm.
2. The Selection of Abstracts Program Unit is hosting an abstract poster reception on Saturday, October 24, 5:30 pm - 6:30 pm. Please plan to attend and make yourself available by your poster for discussions regarding your abstract.
3. On Tuesday, October 27, posters must be removed between 2:00 pm and 5:30pm. Posters not removed by 5:30pm will be discarded. AABB will not accept liability for lost or damaged posters.
4. Please look for an e-mail in mid-August with further details regarding hanging your physical poster and uploading your abstract poster to the ePoster system.
5. Please read the AABB Guidelines for Abstract Poster Presentations located at http://www.aabb.org/documents/Meetings_and_Events/Annual_Meeting_and_TXPO/2009/absguidelinesposter.pdf for a listing of presentation format guidelines.

If you have any questions regarding your abstract, please contact the AABB Department of Education in the AABB National Office at +1.301.215.6482 or email to education@aabb.org. We look forward to seeing you in New Orleans!

Sincerely,

Dana Devine, PhD
Chair, Selection of Abstracts Program Unit