

MICROESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A AVALIAÇÃO DE DANOS EM HEMÁCIAS APRISIONADAS POR PINÇA ÓPTICA

Marcos A. S. de Oliveira*, Zachary J. Smith**, Renato E. de Araujo* e Sebastian Wachsmann-Hogiu**

*Laboratório de Biomédica Óptica e Imagens, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50740-530, Brasil

** Center for Biophotonics University of California Davis, Sacramento, CA 95817, Estados Unidos
e-mail: marcos.soliveira@ufpe.br

Resumo: Pinça óptica é uma ferramenta que permite capturar, manipular e avaliar células individualmente. Neste trabalho são avaliados danos causados em hemácias, pelo aprisionamento óptico da célula. Para tal, foram monitoradas alterações nos espectros Raman de eritrócitos aprisionados. Foram obtidas e avaliadas evoluções temporais dos espectros Raman. Verificou-se que estas evoluções são dependentes da potência do laser utilizado para aprisionar a hemácia. Curvas exponenciais foram exploradas na caracterização da dinâmica temporal do sinal Raman. Foram observadas mudanças significativas e irreversíveis em hemácias, associadas ao dano estabelecido pelo aprisionamento óptico da célula. Os resultados obtidos permitem estabelecer parâmetros limites para o uso de pinças ópticas na avaliação de hemácias.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Pinça Óptica, Hemácias.

Abstract: *Optical tweezers is a tool that allows trap and manipulate individual cells. In this work we evaluate damage to red blood cells caused by optical trapping. We monitored time-dependent changes in the Raman spectra of trapped erythrocytes. It was found that these changes are dependent on the laser power used to trap red blood cells. Exponential curves were exploited to characterize the temporal dynamics of the Raman signal. We observed significant and irreversible changes associated to the damage established by the optical trapping of the cell. The results obtained allow to set new limits for optical tweezers parameters used on the evaluation of erythrocytes.*

Keywords: *Raman Spectroscopy, Optical Tweezers, Erythrocytes.*

Introdução

Pinça óptica tem se apresentado como uma ferramenta atraente para a avaliação celular [1-13]. Em particular, verifica-se na literatura uma crescente atenção no uso associado de pinças com técnicas de imagens e de espectroscopia [5,8,9,11,14]. O uso da técnica de espectroscopia Raman com pinça óptica permite obter informações sobre alterações bioquímicas em uma única célula. Contudo, o alto fluxo de fótons, usado em armadilhas ópticas, pode induzir, pelo

processo de absorção óptica, danos às células presas. Esses danos podem conduzir ao processo de apoptose ou afetar a capacidade da célula de desempenhar suas funções normais [2,13].

Alguns estudos mostraram que a captura óptica pode afetar significativamente hemácias [3,6,8,11,12]. Em particular, dois trabalhos exploram espectroscopia Raman na avaliação da degradação de hemácias submetidas ao aprisionamento óptico [6, 8]. Wood *et al* atribuem as mudanças do espectro Raman de hemácias aprisionadas à formação de met-hemoglobina e interações excitônicas induzidas pela agregação de heme [6], enquanto Dasgupta *et al* atribuem as alterações à formação de hemichrome [8]. Estes estudos avaliam espectros Raman de hemácias aprisionadas, limitando-se ao comportamento temporal da intensidade de picos Raman [8,17], o que não permite um entendimento mais abrangente da dinâmica dos processos químicos subjacentes que dão origem a alterações reversíveis ou irreversíveis nas células.

Neste trabalho é feita uma análise multidimensional de variações nos espectros Raman de hemácias aprisionadas opticamente. A técnica aplicada permite monitorar simultaneamente, por longos períodos, as dinâmicas temporais das intensidades e das posições dos picos nos espectros Raman.

Materiais e métodos

O aparato experimental de microespectroscopia Raman associado à pinça óptica utilizado neste trabalho foi descrito em detalhes na referência [9]. Brevemente, um laser de diodo centrado em 785 nm foi acoplado em um microscópio invertido equipado com uma objetiva 60x e 1.2 de abertura numérica, produzindo um feixe limitado por difração. O sistema permite incidir uma potência máxima de 22 mW na amostra, capaz de prender uma única célula. Filtros de densidades neutras foram usados no sistema para variar a potência do laser incidente. O sinal Raman emitido pela amostra foi coletado pela mesma objetiva e enviado a um espectrômetro associado a uma câmera. O algoritmo LADS (Localization Analysis of Dynamics Spectra) [18], que usa curvas espectrais para determinar com precisão as intensidades e posições dos picos em função do tempo, foi utilizado no processamento dos dados

através do MATLAB (The Mathworks, Natick, MA).

Para a preparação das amostras contendo hemácias, coletou-se sangue, por punção venosa, de voluntários saudáveis utilizando recipiente sob vácuo para armazenagem. Minutos antes das medições, diluía-se o sangue em DPBS (Dulbecco Phosphate-Buffered Salina). Esta solução tampão mantém a osmolaridade do meio suspenso e inibe a aderência das células nas lâminas de vidro. Grandes diluições das células na solução tampão (~ 250.000 vezes) foram usadas nos experimentos de forma a assegurar que todos os espectros fossem originados de uma única célula e para reduzir a chance de que outras células suspensas, flutuantes na amostra, interferissem na armadilha óptica durante os longos tempos de medição.

Para cada célula estudada, foram adquiridos espectros Raman (~ 400 a 1700 cm^{-1}) continuamente por aproximadamente 40 minutos. As células foram aprisionadas com potências do laser de 22 mW, 13 mW, 10 mW, 4,5 mW e 2 mW, e medições foram realizadas com tempos de integração para espectros individuais de 5 s, 10 s, 15 s, 35 s e 50 s, respectivamente. Cada célula foi medida apenas uma vez, e os experimentos foram repetidos dez vezes para cada potência.

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra uma representação dos espectros Raman adquiridos a partir de uma única hemácia presa pelo laser com uma potência de aprisionamento /excitação de 10 mW, com um tempo de 15s de aquisição para cada espectro, ao longo de 40 minutos. Com o algoritmo LADS, foi acompanhada a evolução temporal dos picos em 673, 753, 1002, 1220, 1244, 1339, 1396, 1451 e 1544 cm^{-1} . Todos estes picos dos espectros Raman mostraram variações temporais em suas posições e intensidades. Baseado nas dinâmicas das posições dos picos, os resultados foram agrupados em duas categorias. No grupo I (picos 673, 753, 1396 e 1544 cm^{-1}), os números de onda dos picos Raman deslocaram para valores menores ao longo do tempo. No grupo II (picos 1002, 1220, 1244, 1339 e 1451 cm^{-1}), os picos mudaram para números de onda superiores.

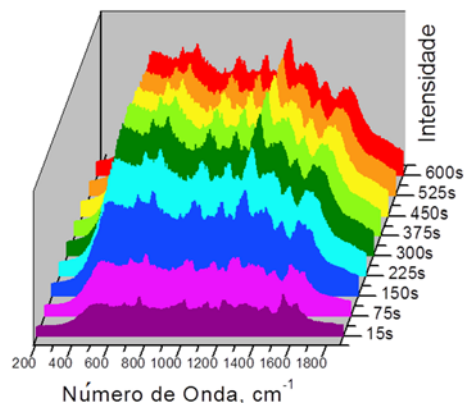


Figura 1: Espectros Raman de uma hemácia aprisionada por um laser, utilizando 10 mW de potência.

Na Figura 2 é apresentada a evolução temporal do pico 753 cm^{-1} , do grupo I. O comportamento transiente dos picos Raman é determinado pela potência do laser, como mostrado na Figura 2(a). Maiores potências do laser de aprisionamento levam a mudanças mais rápidas nas posições dos picos Raman. Para quantificar o efeito da potência do laser sobre a evolução temporal dos picos Raman, foram ajustadas curvas exponenciais da forma $\exp(-t/\tau_0)$, aos gráficos experimentais da dinâmica temporal da posição do pico, linhas na Figura 2(a), sendo τ_0 o tempo característico de cada dinâmica. Os valores obtidos para τ_0 , em diferentes potências do laser, para o pico 753 cm^{-1} , são apresentados graficamente na Figura 2(b).

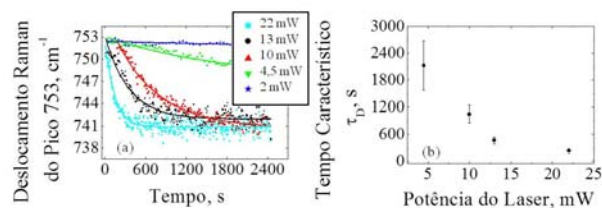


Figura 2. (a) Dinâmica da variação na posição do pico 753 cm^{-1} (b) e comportamento de τ_0 para diferentes potências do laser.

Os valores de τ_0 para os picos 673, 753, 1339, e 1451 cm^{-1} são mostrados na Tabela 1. Nota-se pela Tabela 1, que os picos Raman possuem diferentes constantes τ_0 , indicando dinâmicas temporais distintas, para a mesma potência do laser. O sinal dos tempos característicos, positivos e negativos, apresentados na Tabela 1, indicam um deslocamento dos picos Raman para números de onda menores ou maiores, respectivamente. Verifica-se também pela Tabela 1, que o uso de diferentes potências do laser de aprisionamento leva a modificações do tempo característico, τ_0 .

Tabela 1: Tempo característico τ_0 (em segundos) para o deslocamento dos picos Raman, em função da potência do laser de aprisionamento. Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.

Potência do Laser (mW)	Tempo característico τ_0 (s) dos Picos Raman			
	673 cm^{-1}	753 cm^{-1}	1002 cm^{-1}	1451 cm^{-1}
22	67 ± 20	219 ± 66	-143 ± 39	-193 ± 55
13	132 ± 37	452 ± 76	-266 ± 80	-429 ± 118
10	272 ± 71	1048 ± 197	-315 ± 47	-518 ± 116
4,5	1003 ± 189	2121 ± 549	-1564 ± 389	-2155 ± 300

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, observa-se uma variabilidade significativa nos dados. Atribui-se esta variação à fonte doadora das hemácias. Ajustes temporais foram mais similares para um mesmo doador em dias diferentes do que para diferentes doadores no mesmo dia.

Para analisar a reversibilidade das mudanças espectrais, foram acompanhados os deslocamentos das

posições do pico Raman em uma hemácia exposta a 22 mW de potência de laser. Após cada período de medição de 1000 segundos foi realizada uma interrupção do laser por 15 minutos. Em seguida a hemácia foi exposta ao laser por mais uma vez durante 1000 segundos, seguido de uma segunda pausa de 15 minutos (laser desligado). Por fim, um último período exposição de 1000 segundos foi estabelecido. A Figura 3 mostra o comportamento do pico Raman de 753 cm^{-1} durante este processo.

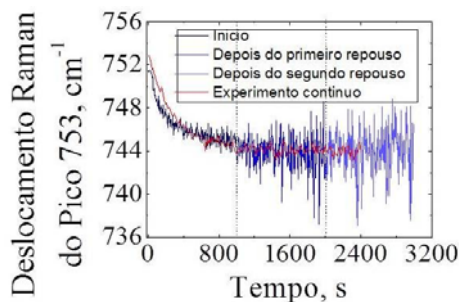


Figura 3: Deslocamento do pico Raman em 753 cm^{-1} . Experimento contínuo (vermelho) e com interrupção (azul).

Pode-se verificar que a mudança não só é irreversível, sem recuperação notável após 15 minutos de descanso, mas também que ao se ignorar as lacunas temporais devido ao descanso, o resultado obtido possui um comportamento semelhante à dinâmica de um experimento contínuo.

O algoritmo de análise, LADS, permitiu acompanhar os deslocamentos espectrais dos picos Raman, como também as variações de intensidades dos picos ao longo do tempo. A Figura 4(a) mostra a dinâmica temporal da intensidade do pico 1451 cm^{-1} , para diferentes potências do laser. Os comportamentos temporais das intensidades dos picos foram descritos por uma exponencial dupla, com um aumento rápido e um decaimento lento, como descrito na Equação (1),

$$I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) - A_2 \exp(-t/\tau_S) + A_3, \quad (1)$$

com A_1 , A_2 e A_3 sendo constantes de ajuste e τ_S e τ_D os tempos característicos de subida e de descida, respectivamente. Este comportamento é dependente da potência do laser de aprisionamento. A Figura 4(b) mostra a dependência do tempo de subida, τ_S , em função da potência do laser.

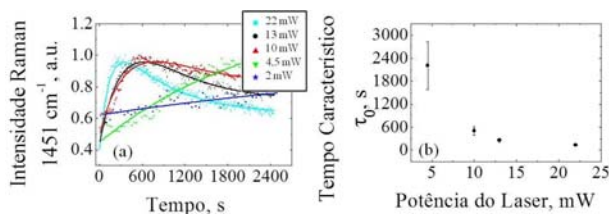


Figura 4. (a) Dinâmicas de variação das intensidades do pico 1451 cm^{-1} e dos (b) tempos de subida, τ_S , para diferentes potências do laser.

Para potências de laser menores do que 10 mW, apenas o comportamento de subida foi observado. Para potências de 2 mW, as pequenas alterações na intensidade dos picos não forneceram resultados robustos para τ_S . Uma das vantagens do uso de uma análise multidimensional, obtida com o algoritmo LADS, é a obtenção simultânea das informações sobre a intensidade e sobre a posição de cada pico do espectro Raman. A combinação destas informações pode ajudar a elucidar os efeitos fotoinduzidos sobre as células. Na Figura 5 são apresentadas simultaneamente as dinâmicas temporais de intensidade e espectral do pico 1451 cm^{-1} utilizando 10 mW de potência do laser. Observa-se que a intensidade do pico Raman alcança seu máximo por volta de 600 s, durante aprisionamento. Após este ponto, existe uma deterioração lenta da intensidade do sinal, enquanto a posição do pico permanece praticamente constante. O aumento de intensidade e a mudança na posição do pico indicam uma modificação fotoquímica na hemoglobina. No segundo momento, que não possui mudança na posição do pico ou mudanças químicas na hemácia, a redução da intensidade do pico Raman é um indicativo da diminuição da concentração (difusão) de hemoglobina na hemácia.

As variações na posição e na intensidade do pico, representadas por τ_0 e τ_S respectivamente, são indicativos das mudanças químicas foto-induzidas na célula, enquanto a dinâmica da intensidade do pico, representada por τ_D , indica uma possível difusão de hemoglobina para fora da célula, devido a um provável aumento na permeabilidade da membrana celular.

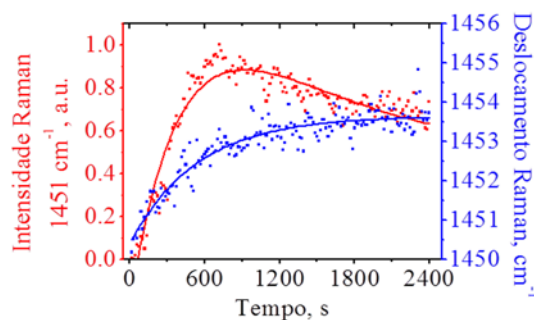


Figura 5. Comportamento temporal simultâneo da intensidade e da posição espectral do pico Raman centrado em 1451 cm^{-1} . Os pontos representam os dados experimentais e as linhas representam os ajustes exponenciais.

A Tabela II apresenta os tempos característicos de subida e de descida obtidos para os picos 673 cm^{-1} (grupo I) e 1451 cm^{-1} (grupo II), para diferentes potências do laser.

Tabela 2: τ_S e τ_D dos picos Raman (em segundos) em função da potência do laser para os picos 673 e 1451 cm^{-1} . Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.

Potência do Laser (mW)	673 cm ⁻¹		1451 cm ⁻¹	
	τ_s (s)	τ_D (s)	τ_s (s)	τ_D (s)
22	248 ± 100	435 ± 115	133 ± 25	1033 ± 154
13	302 ± 68	1017 ± 293	261 ± 52	1745 ± 801
10	440 ± 81	1385 ± 372	500 ± 110	1462 ± 559
4,5	1434 ± 368	-	2207 ± 619	-

Conclusão

A associação da pinça óptica à técnica de microespectroscopia Raman permite um monitoramento das modificações químicas e físicas de hemácias. Neste trabalho, com uma análise multidimensional, obtida com o algoritmo LADS, caracterizou-se mudanças significativas no espectro Raman de hemácias. Foi verificado que os danos estabelecidos são determinados pela potência do laser utilizado. Verificou-se que as modificações induzidas nas células pelo aprisionamento óptico podem ser irreversíveis. Os resultados obtidos com este trabalho permitem estabelecer parâmetros limites para o uso de pinças ópticas na avaliação de hemácias e entender melhor a interação de luz com a célula aprisionada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do CNPq, INCT Fotônica, e Center for Biophotonics and Technology da Universidade da Califórnia.

Referências

- [1] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. 1987; *Science* 235, 1517.
- [2] Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane. 1987; *Nature* 330, 769.
- [3] B. R. Wood, B. Tait, and D. McNaughton. 2001; *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1539, 58.
- [4] C. G. Xie, M. A. Dinno, and Y. Q. Li. 2002; *Optics Letters* 27, 249.
- [5] C. G. Xie, Y. Q. Li, W. Tang, and R. J. Newton. 2003; *Journal of Applied Physics* 94, 6138.
- [6] B. R. Wood, L. Hammer, L. Davis, and D. McNaughton. 2005; *Journal of Biomedical Optics* 10.
- [7] B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels, S. Pandiancherri, and D. McNaughton. 2007; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1691.
- [8] R. Dasgupta, S. Ahlawat, R. S. Verma, A. Uppal, and P. K. Gupta. 2010; *Journal of Biomedical Optics* 15.
- [9] T. J. Moritz, J. A. Brunberg, D. M. Krol, S. Wachsmann-Hogiu, S. M. Lane, and J. W. Chan. 2010; *Journal of Raman Spectroscopy* 41, 33.
- [10] A. Fontes, *et al.* 2011; *Journal of Optics* 13.
- [11] R. Liu, L. N. Zheng, D. L. Matthews, N. Satake, and J. W. Chan. 2011; *Applied Physics Letters* 99.
- [12] R. Liu, *et al.* 2013; *Experimental Hematology* 41, 656.
- [13] C. L. Wang, S. Chowdhury, S. K. Gupta, and W. Losert. 2013; *Journal of Biomedical Optics* 18.
- [14] Z. J. Smith, J. C. E. Wang, S. A. Quataert, and A. J. Berger. 2010; *Journal of Biomedical Optics* 15.
- [15] D. Chen, S.-s. Huang, and Y.-q. Li. 2006; *Analytical Chemistry* 78, 6936.
- [16] P. Zhang, L. Kong, P. Setlow, and Y. qing Li. 2010; *Optics Letters* 35, 3321.
- [17] I. Del_no, A. R. Bizzarri, and S. Cannistraro. 2006; *Chemical Physics* 326, 356.
- [18] Z. J. Smith, C. W. Chang, L. S. Lawson, S. M. Lane, and S. Wachsmann-Hogiu. 2013; *Appl Spectrosc* 67, 187.