



Simulação Biomecânica de Células de Eritrócitos e Ovalócitos utilizando Diferentes Técnicas Numéricas

NELMA MARQUES GOMES

julho de 2021



Simulação Biomecânica de Células de Eritrócitos e Ovalócitos utilizando Diferentes Técnicas Numéricas

NELMA MARQUES GOMES

Julho de 2021

Simulação Biomecânica de Células de Eritrócitos e Ovalócitos utilizando Diferentes Técnicas Numéricas

Nelma Marques Gomes

Engenheira Biomédica pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Prof. Jorge Américo Oliveira Pinto Belinha

Coorientadora: Prof.^a Maria Inês de Araújo Barbosa

Julho de 2021

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao Professor Jorge Belinha agradeço pela oportunidade, por todo o apoio, disponibilidade, incentivo e orientação ao longo da dissertação.

À Professora Inês Barbosa, pela disponibilidade e ajuda que demonstrou para acompanhar este trabalho.

À minha Mãe e ao meu Pai, Conceição e Augusto, por me terem sempre apoiado e incentivado ao longo de todos os anos, assim como pelo carinho e educação que me deram.

À minha irmã Mariana, agradeço todo o apoio, conselhos e incentivo para realizar este percurso.

E por fim, agradeço a todos aqueles que fizeram parte desta caminhada e que contribuíram para alcançar mais uma etapa importante da minha vida.

Resumo

Os eritrócitos saudáveis são células fundamentais do sangue humano, apresentando geralmente a forma de um disco bicôncavo. Devido à sua conformação, estas células possuem capacidades únicas de sofrer deformação celular, o que lhes facilita a passagem por capilares mais pequenos que o seu diâmetro, enquanto transportam o oxigénio e o dióxido de carbono. Cada vez mais, existem estudos que apontam que a deformabilidade dos eritrócitos é afetada por certas condições patológicas, tais como Esferocitose Hereditária, Eliptocitose Hereditária, Ovalócitose Hereditária, Doença Falciforme, entre outras. Estudos indicaram que a deformabilidade dos eritrócitos infetados com *P. falciparum* é mais reduzida, pois existe um aumento na rigidez dos glóbulos vermelhos. A esferocitose hereditária é caracterizada pela presença de eritrócitos de formato esferócito. Por outro lado, na eliptocitose hereditária os eritrócitos apresentam formato elíptico e, na ovalócitose, os eritrócitos são arredondados ou ovoides. Estas irregularidades na forma dos glóbulos vermelhos, assim como outras características, podem fornecer importantes informações na determinação de um diagnóstico.

Esta dissertação tem como objetivo determinar a frequência de vibração livre de modelos tridimensionais de eritrócitos humanos saudáveis e com patologia. Deste modo, é possível compreender como é que estas células reagem quando é induzida uma determinada frequência de vibração, o que pode vir a ser utilizado como forma de diagnóstico. Para isso, recorreu-se à literatura para obter as suas características geométricas e as suas respetivas propriedades mecânicas, tanto para o estado saudável como para a ovalócitose, a patologia considerada para o presente trabalho. As metodologias utilizadas foram o Método dos Elementos Finitos e o Método de Interpolação de Ponto Radial.

Assim, no futuro, pretende-se que o trabalho desenvolvido neste projeto ajude no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e de novas alternativas terapêuticas de modo a combater as doenças associadas a este tipo de células.

Palavras-chave: eritrócitos; deformação celular; condições patológicas; métodos numéricos.

Abstract

Healthy erythrocytes are essential cells of human blood, usually presenting a biconcave disk form. Due to their conformation, these cells present unique capabilities to undergo cellular deformation, which makes it easy for them to pass through capillaries smaller than their diameter, while transporting oxygen and carbon dioxide. Increasingly, there are studies pointing out that red cell deformability is affected by certain pathological conditions, such as Hereditary Spherocytosis, Hereditary Elliptocytosis, Hereditary Ovalocytosis, Sickle Cell Disease, and others. Studies have indicated that the deformability of red blood cells infected with *P. falciparum* is lower, since there is an increase in the stiffness of the red blood cells. Hereditary spherocytosis is characterized by the presence of spherocyte-shaped red blood cells. On the other hand, in hereditary elliptocytosis, the erythrocytes present an elliptical shape, and in ovalocytosis, the erythrocytes are rounded or ovaloid. These irregularities in the shape of red blood cells, as well as other features, can provide important information for diagnosis.

This dissertation aims to determine the free vibration frequency, of three-dimensional models, of healthy and pathological human erythrocytes. In this way, it is possible to understand how these cells react when a determined vibration frequency is induced, which might be used as a way to diagnose this type of diseases. For this, literature was used to obtain their geometric characteristics and mechanical properties, both in healthy form and for ovalocytosis, the pathology under study in the present work. The methodologies used were the Finite Element Method, and the Radial Point Interpolation Method.

Thus, in the future, it is intended that the work developed in this project will help in the development of new diagnostic tools and new therapeutic alternatives, in order to overcome diseases related to this type of cells.

Key words: erythrocytes; cell deformation; pathological conditions; numerical methods.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. MOTIVAÇÃO.....	4
1.2. OBJETIVO.....	4
1.3. ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	5
2. INTRODUÇÃO AOS ERITRÓCITOS.....	9
2.1. ESTRUTURA DOS ERITRÓCITOS.....	9
2.1.1. <i>Membrana de Lipídios</i>	11
2.1.2. <i>Membrana de Proteínas</i>	12
2.1.2.1. Espectrina.....	13
2.1.2.2. Actina.....	14
2.1.2.3. Tropomiosina.....	14
2.1.2.4. Tropomodulina 1.....	14
2.1.2.5. Proteína 4.1R.....	15
2.1.2.6. Aducina.....	15
2.1.2.7. Dematina.....	16
2.2. FUNÇÕES DOS ERITRÓCITOS.....	16
2.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	18
2.3.1. <i>Deformabilidade Celular</i>	20
2.4. PATOLOGIAS.....	21
2.4.1. <i>Impacto Socioeconómico</i>	22
2.4.2. <i>Malária</i>	26
2.4.3. <i>Esferocitose Hereditária</i>	28
2.4.4. <i>Eliptocitose Hereditária</i>	29
2.4.5. <i>Ovalócitose Hereditária</i>	31
2.4.6. <i>Doença Falciforme</i>	31
2.4.7. <i>Diabetes Mellitus</i>	32
2.4.8. <i>Alzheimer</i>	34
2.4.9. <i>Outras Patologias</i>	36

2.4.9.1.	Estomatocitose hereditária sobreidratada	36
2.4.9.2.	Hipercolesterolemia	36
2.4.9.3.	Obesidade.....	37
3.	MÉTODOS NUMÉRICOS	39
3.1.	MÉTODO DOS ELEMENTOS FINITOS	39
3.2.	MÉTODOS SEM MALHA.....	41
3.2.1.	<i>Procedimento Genérico</i>	42
3.2.2.	<i>RPIM</i>	43
3.2.2.1.	Conetividade Nodal	43
3.2.2.2.	Integração Numérica.....	44
3.2.3.	<i>Funções de Forma</i>	46
3.3.	MECÂNICA DOS SÓLIDOS	49
3.3.1.	<i>Fundamentos</i>	49
3.3.2.	<i>Forma Fraca de Galerkin</i>	51
3.3.3.	<i>Sistema de Equações Discreto</i>	53
3.3.3.1.	Equações da Dinâmica.....	55
4.	ESTADO DA ARTE	59
4.1.	FEM.....	60
4.1.1.	<i>Origem do FEM</i>	60
4.1.2.	<i>FEM e a Biomecânica</i>	61
4.1.3.	<i>FEM e as Células Biológicas</i>	63
4.1.4.	<i>FEM e os Eritrócitos</i>	65
4.2.	MÉTODOS SEM MALHA.....	66
4.2.1.	<i>Origem dos Métodos sem Malha</i>	66
4.2.2.	<i>Métodos sem Malha e a Biomecânica</i>	67
4.2.3.	<i>Métodos sem Malha e as Células Biológicas</i>	68
4.2.4.	<i>Métodos sem Malha e os Eritrócitos</i>	69
5.	ESTUDO NUMÉRICO DE GLÓBULOS VERMELHOS - VIBRAÇÕES LIVRES.....	73
5.1.	ESTUDO DE CONVERGÊNCIA DE UMA ESFERA	73
5.2.	ESTUDO DE CONVERGÊNCIA DE UM GLÓBULO VERMELHO SAUDÁVEL	80
5.3.	ESTUDO DAS VIBRAÇÕES LIVRES - GLÓBULO VERMELHO SAUDÁVEL COM MEMBRANA CELULAR	89
5.4.	ESTUDO DAS VIBRAÇÕES LIVRES - OVALÓCITOSE	95
5.5.	ESTUDO DAS VIBRAÇÕES LIVRES – OVALÓCITOSE COM MEMBRANA CELULAR.....	109
6.	CONCLUSÕES.....	127
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXOS.....	141
	ANEXO A.....	141

ANEXO B 142

Lista de Figuras

Figura 2.1- Ilustração da membrana dos glóbulos vermelhos. Adaptado de [19][20]... 10	
Figura 2.2- Ligações horizontais entre dímeros de espectrina-espectrina, entre espectrina, actina e proteína 4.1R no complexo juncional no esqueleto de membrana sustentado em espectrina [12]. 14	
Figura 2.3- Proteína 4.1R. (a) Ilustração do domínio de ligação à membrana da proteína 4.1R. (b) Representação da proteína 4.1R, a cor azul, e das duas zonas de junção de espectrina que compreendem um peptídeo de ligação de actina. Adaptado de [17]. 15	
Figura 2.4- Eritrócitos como transportadores de oxigénio para os tecidos. Adaptado de [25]..... 18	
Figura 2.5- Gasto mensal por pessoa em conteúdos de prevenção da malária. Adaptado de [34]. 23	
Figura 2.6- Gasto mensal por pessoa em tratamentos relacionados com a malária. Adaptado de [34]. 24	
Figura 2.7- Percentagem de despesas médicas atribuídas à diabetes para cada complicação crónica nos EUA associada à diabetes. Adaptado de [40]..... 26	
Figura 2.8- Ciclo de vida do hospedeiro <i>P. falciparum</i> e o vetor do mosquito <i>Anopheles</i> . Adaptado de [44]. 27	
Figura 2.9- Morfologia dos glóbulos vermelhos alterada por esferocitose hereditária [12]. 29	
Figura 2.10- Morfologia dos glóbulos vermelhos alterados por (A) eliptocitose hereditária não hemolítica e (B) eliptócitos, poiquilócitos e eritrócitos fragmentados em eliptocitose hereditária hemolítica [12]..... 30	
Figura 2.11- Deformabilidade da membrana alterada por polimerização de Hb S [26]. 32	
Figura 2.12- Morfologia do glóbulo vermelho de um paciente diabético. A) Glóbulo vermelho torcido por fibras de fibrina; B) Estrutura alongada do glóbulo vermelho [30]. 33	
Figura 2.13- (a) Glóbulos vermelhos de um paciente saudável, e (b) glóbulos vermelhos de um paciente com doença de Alzheimer. Adaptado de [53]. 35	
Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento de discretização espacial de um domínio por elementos finitos. Adaptado de [63]. 40	

Figura 3.2- (a) Domínio do problema. (b) Discretização nodal de forma regular. (c) Discretização nodal de forma irregular. Adaptado de [63].	43
Figura 3.3- (a) Domínio de influência retangular fixo. (b) Domínio de influência circular fixo. Adaptado de [63].	44
Figura 3.4- Malha de integração Gaussiana Geral. Adaptado de [63].	45
Figura 3.5- (a) Quadrilátero inicial. (b) Alteração do quadrilátero inicial para um quadrado isoparamétrico e aplicação da regra do ponto de quadratura 2×2 . (c) Regresso para a forma inicial do quadrilátero. Adaptado de [63].	45
Figura 3.6- Sólido, com domínio Ω , submetido a uma força externa t . Adaptado de [63].	51
Figura 5.1- Ilustração das quatro malhas utilizadas no estudo de convergência.	73
Figura 5.2- Gráfico de convergência do primeiro modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.	77
Figura 5.3- Gráfico de convergência do segundo modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.	78
Figura 5.4- Gráfico de convergência do terceiro modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.	78
Figura 5.5- Representação esquemática das dimensões geométricas do glóbulo vermelho saudável.	80
Figura 5.6- Ilustração das quatro malhas utilizadas no estudo de convergência.	80
Figura 5.7- Gráfico de convergência do primeiro modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.	84
Figura 5.8- Gráficos de convergência do segundo modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.	84
Figura 5.9- Gráficos de convergência do terceiro modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.	85
Figura 5.10- Gráficos de convergência do quarto modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.	85
Figura 5.11- Gráficos de convergência dos modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração obtidos com o FEM.	86
Figura 5.12- Gráficos de convergência dos modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração obtidos com o RPIM.	86
Figura 5.13- Gráfico das frequências de vibração correspondentes a cada modo de vibração para a malha com 6001 nós.	87

Figura 5.14- Tempo de processamento total que o FEMAS leva a gerar resultados para as diferentes malhas.	88
Figura 5.15- Representação esquemática da membrana celular do glóbulo vermelho saudável, representada a amarelo, e do seu citoplasma, representado a azul.	89
Figura 5.16- Ilustração das seis geometrias diferentes utilizadas no estudo da ovalócitose.	95
Figura 5.17- Frequências de vibração correspondentes ao primeiro modo de vibração para os modelos da célula com ovalócitose com diferentes geometrias.	107
Figura 5.18- Frequências de vibração do modelo da célula saudável.	108
Figura 5.19- Frequências de vibração correspondentes ao primeiro modo de vibração para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose, considerando as diferentes geometrias.	122

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Propriedades mecânicas e geométricas dos glóbulos vermelhos saudáveis. Adaptado de [3].	20
Tabela 2.2- Comparação das dimensões dos eritrócitos saudáveis e infectados em diferentes estágios de infecção. Onde $s_e = S/(4\pi a^2)$ corresponde à razão da área de superfície em excesso da célula, a é o raio efetivo da célula e V corresponde ao volume da célula. Na última coluna são referidas as dimensões do parasita. Adaptado de [48].	28
Tabela 2.3- Parâmetros dos eritrócitos saudáveis e diabéticos. Adaptado de [30].	34
Tabela 2.4- Propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos quando afetados por esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, ovalócitose e estomatocitose. Adaptado de [3].	35
Tabela 5.1- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre da esfera, obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.	74
Tabela 5.2- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre da esfera obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.	75
Tabela 5.3- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre da esfera obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.	76
Tabela 5.4- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.	81
Tabela 5.5- Mapa de cores dos modos de vibração livre associados a uma energia mais elevada, obtidos com o FEM.	82
Tabela 5.6- Mapa de cores dos modos de vibração livre associados a uma energia mais elevada, obtidos com o RPIM.	83
Tabela 5.7- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável, obtidos com o FEM e o RPIM.	90
Tabela 5.8- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável, obtidos com o FEM e RPIM.	91
Tabela 5.9- Frequências de vibração, expressas em rad/s, da fração volúmica da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável e do citoplasma homogeneizado, obtidos com o FEM.	92

Tabela 5.10- Frequências de vibração, expressas em rad/s, da fração volúmica da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável com os valores do citoplasma homogeneizado obtidos com o RPIM.....	93
Tabela 5.11- Cálculo da diferença das frequências de vibração, utilizando a Eq. 5.6, para os dois métodos estudados.	94
Tabela 5.12- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 3 μm de altura.	96
Tabela 5.13- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 3 μm de altura.....	96
Tabela 5.14- Frequências de vibração obtidas com o FEM e com o RPIM para o modelo com 3 μm de altura.	97
Tabela 5.15- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 4 μm de altura.	97
Tabela 5.16- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 4 μm de altura.....	98
Tabela 5.17- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com 4 μm de altura.	98
Tabela 5.18- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 5 μm de altura.	99
Tabela 5.19- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 5 μm de altura.....	99
Tabela 5.20- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com 5 μm de altura.	100
Tabela 5.21- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 6 μm de altura.	101
Tabela 5.22- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 6 μm de altura.....	101
Tabela 5.23- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com 6 μm de altura.	102
Tabela 5.24- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 7 μm de altura.	103
Tabela 5.25- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com 7 μm de altura.....	103

Tabela 5.26- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com 7 μm de altura.	104
Tabela 5.27- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para o modelo com 8 μm de altura.	105
Tabela 5.28- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre obtido com os dois métodos estudados: o FEM e o RPIM para o modelo com 8 μm de altura.	105
Tabela 5.29- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para o modelo com 8 μm de altura.	106
Tabela 5.30- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com 8 μm de altura.	106
Tabela 5.31- Propriedades mecânicas inseridas no FEMAS para a fração volúmica da membrana da célula ovoide.	109
Tabela 5.32- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 3 μm de altura.	110
Tabela 5.33- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 3 μm de altura.	110
Tabela 5.34- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 3 μm de altura.	111
Tabela 5.35- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 4 μm de altura.	112
Tabela 5.36- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 4 μm de altura.	112
Tabela 5.37- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 4 μm de altura.	113
Tabela 5.38- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 5 μm de altura.	114

Tabela 5.39- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 5 μm de altura.....	114
Tabela 5.40- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 5 μm de altura.....	115
Tabela 5.41- Mapa de cores dos primeiros cinco modos de vibração livre obtidos com o FEM e RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 6 μm de altura.....	116
Tabela 5.42- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 6 μm de altura.....	116
Tabela 5.43- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 6 μm de altura.....	117
Tabela 5.44- Mapa de cores dos primeiros três modos de vibração livre obtidos com o FEM e RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 7 μm de altura.....	118
Tabela 5.45- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 7 μm de altura.....	118
Tabela 5.46- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 7 μm de altura.....	119
Tabela 5.47- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 8 μm de altura.....	120
Tabela 5.48- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre obtido com os dois métodos estudados: FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 8 μm de altura.....	120
Tabela 5.49- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 8 μm de altura.....	121

Tabela 5.50- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 8 μm de altura.....	121
Tabela 5.51- Frequências de vibração da fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável.	123
Tabela A.0.1- Frequências de vibração, expressas em rad/s, obtidas no estudo de convergência do glóbulo vermelho saudável.	141
Tabela B.0.2- Tempo de processamento total que o FEMAS leva a gerar resultados para as malhas com diferentes números de nós.	142

Lista de Abreviaturas

AGLT	Acidified Glycerol Lysis Time
H ₂ CO ₃	Ácido Carbónico
HCl	Ácido Clorídrico
ATPase	Adenosinatrifosfatases
ATP	Adenosina Trifosfato
Dm _{CO}	Capacidade de Difusão de Membrana
DL _{CO}	Capacidade de Difusão do Monóxido de Carbono
MSCs	Células Estaminais Mesenquimais
CAD	Desenho Assistido por Computador
CFD	Dinâmica de Fluidos Computacional
CO ₂	Dióxido de carbono
SABD	Domínio de Ligação Espectrina-Actina
2D	Duas Dimensões Espaciais
EFGM	Element Free Galerkin Method
EUA	Estados Unidos da América
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
FEMAS	Finite Element and Meshless Method Analysis Software
MQ-RBF	Função de Base Radial Multiquadrática
RhAG	Glicoproteína Rh-associada
HCO ₃ ⁻	Ião Bicarbonato
Ca ⁺⁺	Ião Cálcio
Cl ⁻	Ião Cloreto
H ⁺	Ião Hidrogénio
K ⁺	Ião Potássio

Na ⁺	Ião Sódio
EMA	Ligação eosina-5-maleimida
LRPI	Local Radial Point Interpolation Method
MLPG	Meshless Local Petrov-Galerkin
FDM	Método de Diferenças Finitas
PIM	Método de Interpolação Pontual
IMLS- Ritz	Método de Ritz Móvel de Mínimos Quadrados Aprimorado
FVM	Método de Volumes Finitos
FEM	Método dos Elementos Finitos
AFM	Microscopia de Força Atômica
TFM	Microscopia de Força de Tração
ICAM-4	Molécula de Adesão Intercelular-4
O ₂	Molécula de Oxigénio
NO	Monóxido de Azoto
CO	Monóxido de Carbono
NEM	Natural Element Method
NNRPIM	Natural Neighbour Radial Point Interpolation Method
NREM	Natural Radial Element Method
HbO ₂	Oxihemoglobina
pH	Potencial Hidrogeniónico
RPIM	Radial Point Interpolation Method
RPI	Radial Point Interpolators
RKPM	Reproducing Kernel Particle Method
SPH	Smoothed Particle Hydrodynamics
CT	Tomografia Computadorizada

- 3D Três Dimensões Espaciais
- FDV Variação dependentes do campo de fluxo

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

O sangue apresenta uma fração volumétrica elevada de glóbulos vermelhos, que controlam as propriedades de fluxo [1].

Os glóbulos vermelhos, também conhecidos como eritrócitos ou hemácias, apresentam elevada importância no transporte de oxigênio, na regulação do fluxo sanguíneo local e no transporte de dióxido de carbono [2]. Para além disso, a sua capacidade única de sofrer deformação celular permite que estas passem por capilares menores que o seu diâmetro, enquanto transportam o oxigênio e o dióxido de carbono [3][4]. Estas capacidades de deformação das hemácias dependem de vários fatores, envolvendo as características geométricas da célula, as propriedades reológicas do fluido intracelular e as propriedades reológicas da membrana celular [5].

Existem fundamentos, cada vez mais crescentes, de que a deformabilidade dos glóbulos vermelhos é afetada por certas condições patológicas. Desta forma, as hemácias têm sido cada vez mais alvo de estudos nas últimas décadas [3]. Estes avanços científicos indicam que certas patologias estão associadas a alterações na forma dos glóbulos vermelhos. Estas irregularidades na forma dos glóbulos vermelhos, assim como outras características, podem fornecer importantes informações na determinação de um diagnóstico [6]. Entre estas doenças é possível destacar a Malária, a Esferocitose Hereditária, a Eliptocitose Hereditária, a Ovalócitose Hereditária, a Doença Falciforme, a Diabetes *Mellitus* e a Doença de Alzheimer.

Considerando, por exemplo, a Malária, esta é uma doença bastante antiga e muito estudada, no entanto, nos dias de hoje, continua a provocar uma morbidade e mortalidade humana significativa [7]. O Relatório Mundial de 2015 sobre a Malária, publicado pela Organização Mundial da Saúde, divulgou que, só nesse ano, apareceram cerca de 214 milhões de novos casos de infeção por Malária e aproximadamente 438 000 mortes em todo o mundo [8]. Todos os sintomas clínicos da Malária são consequência da infeção dos eritrócitos humanos [7]. Portanto, a compreensão dos mecanismos que conduzem à invasão, remodelação, crescimento e reinvasão do parasita no eritrócito devem ser conhecidos, para ser possível aplicar um novo diagnóstico e novo tratamento [7].

Devido ao elevado número de diagnósticos e de mortes associadas a estas doenças, a investigação científica destas doenças é essencial, existindo a necessidade de conhecer e perceber as causas, os métodos de progressão e os respetivos tratamentos, com o

objetivo de prevenir o seu aparecimento. Uma forma de o fazer é recorrendo a métodos numéricos e simulações computacionais.

Nas últimas décadas, a aplicação do Método dos Elementos Finitos a problemas biomédicos tem aumentado significativamente [9], sendo um dos mais populares na resolução de problemas de engenharia [10]. Alternativamente a este método, surgiram os métodos sem malha. Estes são técnicas de discretização, que permitem obter o modelo geométrico diretamente de imagens médicas, tais como tomografias axiais computadorizadas ou técnicas de ressonância magnética, e posteriormente analisar o comportamento biomecânico das estruturas biológicas. Estes métodos são capazes de produzir campos de tensão e deformação mais suaves e precisos, quando comparados com outros métodos, como é o caso do Método dos Elementos Finitos. Desta forma, os métodos sem malha tornaram-se um foco de interesse na comunidade científica [11].

Em suma, nesta dissertação será realizada a simulação computacional de eritrócitos saudáveis e patológicos, recorrendo a diferentes métodos numéricos, de forma a determinar a frequência de vibração livre destas células.

1.1.Motivação

É extremamente importante estudar os mecanismos, as funções e a estrutura dos glóbulos vermelhos, devido às suas propriedades biomecânicas únicas. As propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos podem ser afetadas por alterações da sua forma e das suas características, tendo normalmente graves implicações na funcionalidade da mesma, e resultando em defeitos hereditários ou estados de doença. Por isso, torna-se importante a implementação de simulações biomecânicas de glóbulos vermelhos, uma vez que estas permitem analisar este tipo de alterações e as suas implicações nestas células e, conseqüentemente, no resto do corpo. Assim, o estudo das frequências e modos de vibração naturais dos glóbulos vermelhos permitem comparar as frequências de vibração dos glóbulos vermelhos saudáveis com as da célula com ovalócitose, possibilitando o diagnóstico, por ressonância, desta patologia.

1.2.Objetivo

O objetivo principal deste trabalho é construir e analisar modelos tridimensionais, de eritrócitos humanos saudáveis e com ovalócitose, utilizando o Método dos Elementos Finitos (FEM) e o “Radial Point Interpolation Method” (RPIM), de forma a criar um novo

método de diagnóstico. Posteriormente, pretende-se também adicionar, a estes modelos, a membrana celular. Após a construção dos modelos saudáveis e patológicos pretende-se determinar as respectivas frequências de vibração livres e comparar os resultados obtidos com os dois métodos numéricos utilizados.

1.3.Estrutura do Documento

A presente dissertação está organizada em seis capítulos, sendo estes divididos em diversos tópicos. No Capítulo 1 é apresentada uma introdução e contextualização do tema em estudo. Além disso, é apresentada a motivação para este trabalho e são definidos os principais objetivos. O Capítulo 2 apresenta uma introdução aos eritrócitos, iniciado com uma breve descrição da estrutura, da membrana de lípidos e de proteínas, da função, das suas propriedades mecânicas e de patologias associadas, assim como, o respetivo impacto socioeconómico. O Capítulo 3 apresenta as técnicas discretas, e descreve os métodos numéricos utilizados no presente trabalho para a simulação dos glóbulos vermelhos. O Capítulo 4 corresponde ao estado da arte de estudos científicos mais relevantes, desenvolvidos nas últimas décadas, para simulação de glóbulos vermelhos. O Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos, como simulações dos modos de vibração de eritrócitos saudáveis com e sem membrana, assim como de ovalócitos. Por fim, no Capítulo 6 são apresentadas as conclusões obtidas.

CAPÍTULO 2 – ERITRÓCITOS

2. Introdução aos Eritrócitos

As hemácias, também designadas por glóbulos vermelhos ou eritrócitos, apresentam uma estrutura única entre os diferentes tipos de células. Para além de não apresentarem núcleo, a sua membrana é a única componente estrutural responsável pelas suas diversas características antigénicas, de transporte e mecânicas [12].

Em 1668, Jan Swammerdam, um biólogo holandês, analisou e descreveu os glóbulos vermelhos pela primeira vez, no entanto só passados alguns anos é que os seus estudos foram divulgados publicamente. Antonie van Leeuwenhoek, foi o primeiro a publicar uma descrição das características únicas dos glóbulos vermelhos, na revista *Philosophical Transactions of the Royal Society* em 1675 [12]. Atualmente continuam a surgir novas e inesperadas funções da membrana dos glóbulos vermelhos [12].

Ao longo deste capítulo será abordada a estrutura dos eritrócitos, como a membrana de lípidos, a membrana de proteínas e as respetivas proteínas existentes nesta membrana, assim como as funções dos eritrócitos, as propriedades mecânicas e as patologias associadas com os glóbulos vermelhos.

2.1. Estrutura dos Eritrócitos

Os glóbulos vermelhos são elementos fundamentais do sangue humano, não só por representarem cerca de 99% das partículas no sangue e por ocuparem entre 40 e 45% do volume de sangue, mas também devido à sua ligação única com o sangue vivo saudável [13]. Esta célula humana possui uma forma de disco bicôncavo e um diâmetro médio de 8 μm , com uma vida útil normal de 120 dias, circulando pelo corpo humano quase meio milhão de vezes [5], [14]. Esta forma bicôncava fornece-lhe uma superfície deformável e resiliente, que lhe permite atravessar capilares com menos de metade do seu diâmetro [15]. Relativamente à sua geometria, sabe-se ainda que a espessura máxima é 2,02 μm e a espessura mínima no centro é 1,02 μm [9]. Como já referido, esta célula não apresenta núcleo e o seu interior é preenchido por uma solução concentrada de hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigénio para todo o corpo e, pela eliminação do dióxido de carbono [16][1]. Esta solução está rodeada por uma membrana viscoelástica flexível, que consiste na bicamada lipídica e no citoesqueleto [1].

A membrana dos glóbulos vermelhos é uma malha pseudo-hexagonal constituída por espectrina, actina, proteína 4.1R, anquirina e outras proteínas associadas à actina que

se ligam à bicamada lipídica através da banda 3. O esqueleto desta membrana fortalece a bicamada lipídica proporcionando durabilidade e flexibilidade para sobreviver durante a circulação [17].

A organização estrutural da membrana possibilita que os glóbulos vermelhos sofram deformações rápidas e reversíveis em elevado número, mantendo a sua integridade mecânica durante a sua vida útil. A membrana dos glóbulos vermelhos apresenta como características biofísicas, a elevada elasticidade e a capacidade de rápida resposta a tensões de corte impostas externamente no meio circulatório [18]. Devido às suas funções únicas de transporte e à sua permeabilidade seletiva aos cátions, a membrana dos eritrócitos regula o seu conteúdo e conserva um gradiente iônico entre o ambiente intracelular e extracelular [15].

Bioquimicamente, a membrana dos glóbulos vermelhos é constituída por proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Aproximadamente 48% do peso seco da membrana dos eritrócitos corresponde a proteínas, enquanto 44% do peso seco é lipídico e os restantes 8% da massa são constituídos por hidratos de carbono [15].

A **Figura 2.1** representa esquematicamente a membrana dos glóbulos vermelhos, onde se pode visualizar algumas proteínas como a banda 3, anquirina, actina, tropomiosina, tropomodulina e, α e β espectrina.

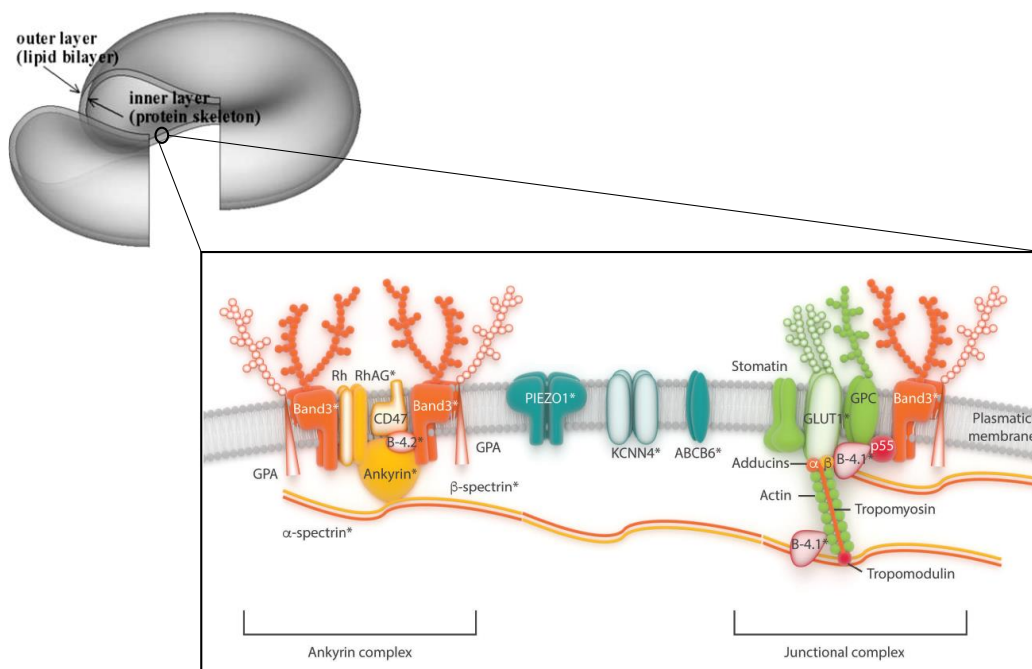


Figura 2.1- Ilustração da membrana dos glóbulos vermelhos. Adaptado de [19][20].

2.1.1. Membrana de Lipídios

Atualmente, o modelo de estrutura da membrana utilizado é o modelo de mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson em 1972 [15]. Neste modelo, a bicamada lipídica é formada por quantidades iguais de colesterol e fosfolípidos. No entanto, apesar da distribuição de colesterol ser simétrica nos dois folhetos, o mesmo não acontece com os quatro principais fosfolípidos [12].

Sabe-se que tanto a fosfatidilcolina como a esfingomiéline são maioritariamente localizadas na monocamada externa, em contrapartida grande parte da fosfatidiletanolamina e toda a fosfatidilserina, em conjunto com os constituintes fosfoinosítídeos menores, estão limitados à monocamada interna [12].

Na orientação das moléculas de fosfolípidos, os grupos hidrófobos não polares das duas camadas são direcionadas um para o outro, originando interações lípido-lipídicas [15]. Relativamente aos grupos polares hidrofílicos, estes são dirigidos para fora, tanto nas superfícies extracelulares como intracelulares [15].

Como os macrófagos identificam e fagocitam os eritrócitos que expõem a fosfatidilserina na sua superfície externa, torna-se essencial a conservação deste lípido na monocamada interna, de forma a garantir a sobrevivência da célula quando se encontram com os macrófagos do sistema reticuloendotelial, particularmente o baço. Assim, a perda de assimetria lipídica que expõe a fosfatidilserina na monocamada externa foi indicada para desempenhar um papel na destruição prematura dos eritrócitos. Além disso, a limitação da fosfatidilserina à monocamada interna impossibilita a adesão dos eritrócitos normais às células endoteliais vasculares, garantindo assim uma livre circulação através da microvasculatura [12].

Diversos tipos de proteínas de transporte de fosfolípidos dependentes ou independentes de energia têm sido envolvidos na geração e manutenção da assimetria dos fosfolípidos. As filípases deslocam os fosfolípidos da monocamada externa para a interna, enquanto as flopases fazem o inverso, contra um gradiente de concentração e dependendo de energia. Em contraste, a scramblases transportam os fosfolípidos bidirecionalmente, a favor dos seus gradientes de concentração, utilizando assim uma via independente de energia [12].

2.1.2. Membrana de Proteínas

O citoesqueleto eritrocitário consiste em várias proteínas que formam uma rede filamentosa sob a bicamada lipídica [21].

As proteínas da membrana são organizadas em dois grupos: as proteínas integrais e as proteínas periféricas [22]. As proteínas integrais atravessam a bicamada lipídica e podem ser divididas em duas classes: as proteínas que cruzam a bicamada com um único segmento, como as glicoforinas e, as proteínas que originam um canal com vários segmentos e servem como proteínas de transporte, como a proteína de banda 3 [22]. Quanto às proteínas periféricas, estas também são divididas em duas classes: uma localizada na metade externa ou interna da bicamada lipídica, sendo a maioria recetores e enzimas, as outras interagem com a metade citoplasmática da bicamada e formam a rede citoesquelética, sendo por isso designadas por proteínas citoesqueléticas [22]. Esta rede, por baixo da camada lipídica, é responsável pelas propriedades mecânicas das células e pela conservação da forma das mesmas [22].

Os principais constituintes proteicos da rede de membrana esquelética bidimensional são espectrina, anquirina, actina e proteína 4.1. Estas proteínas citoesqueléticas interagem com as proteínas integrais e lípidos da bicamada para manter a integridade da membrana. Por isso, o citoesqueleto tem um papel importante na forma, flexibilidade e organização lipídica dos eritrócitos [21]. Estas proteínas de membrana apresentam uma grande variedade de funções, servindo como proteínas de transporte, como proteínas de adesão envolvidas nas interações das hemácias com outras células sanguíneas e células endoteliais, como recetores de sinalização, e outras atividades ainda indefinidas [12], [18].

As proteínas de membrana com função de transporte envolvem banda 3 (transportador de aniões), aquaporina 1 (transportador de água), Glut1 (transportador de glicose e ácido L-desidroascórbico), proteína do antígeno Kidd (transportador de ureia), RhAG (transportador de gás, provavelmente de dióxido de carbono), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{++}\text{ ATPase}$, cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, cotransportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+$, cotransportador $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ e Canal de Gardos. Proteínas de membrana com função adesiva incluem ICAM-4, que interage com integrinas e com a proteína de ligação à laminina [12].

Estas ligações de proteínas de membrana com proteínas esqueléticas podem desempenhar um papel na regulação da coesão entre a bicamada lipídica e o esqueleto da membrana, permitindo ao glóbulo vermelho manter a sua área de superfície de membrana favorável, evitando a sua vesiculação [12].

2.1.2.1. Espectrina

A espectrina é considerada uma proteína longa, flexível, composta por duas cadeias paralelas (α - e β -espectrina) com orientação em direções opostas [17], [23]. Esta proteína está localizada no lado interno da membrana dos eritrócitos [23].

A espectrina é uma proteína muito abundante dos glóbulos vermelhos (30% do total das proteínas) [23]. As extremidades dos tetrâmeros de espectrina vão interagir com a anquirina ou com a própria sindeína, relacionada com a proteína transmembranar principal, banda 3, que é uma proteína de ancoragem da rede de espectrina. A espectrina apresenta também uma forte interação com outras duas proteínas de membrana, a banda 4.1 e a actina. Todas estas proteínas produzem uma rede complexa, nomeada de citoesqueleto, que desempenha um papel decisivo na integridade da estrutura da membrana da célula, e na sua forma e deformabilidade [23].

Cada cadeia α - e β - espectrina contém numerosas repetições do tipo espectrina. É notável a presença de domínios funcionais especializados na extremidade designada por cabeça, originando associações de espectrina dímero-tetrâmero e ligações da anquirina eritrocitária (também conhecida como anquirina-1 ou anquirina-R). Nos domínios da extremidade designada por cauda existe a ligação com a proteína 4.1R, proteína 4.2, filamentos curtos de actina, e outras proteínas. Geralmente, a ligação de seis espectrinas por filamento de actina, origina um arranjo pseudo-hexagonal [17].

Na **Figura 2.2** estão representadas as ligações horizontais entre dímeros de espectrina-espectrina, entre espectrina, actina e proteína 4.1R no complexo juncional no esqueleto de membrana sustentado por espectrina. As repetições de α -espectrina estão representadas a cinza e as de β -espectrina estão a verde-claro. A única repetição helicoidal no terminal N da α -espectrina do primeiro dímero relaciona-se com a repetição helicoidal no terminal C da β -espectrina do segundo dímero para formar a interação dímero-dímero da espectrina, representado na figura pela cor rosa [12].

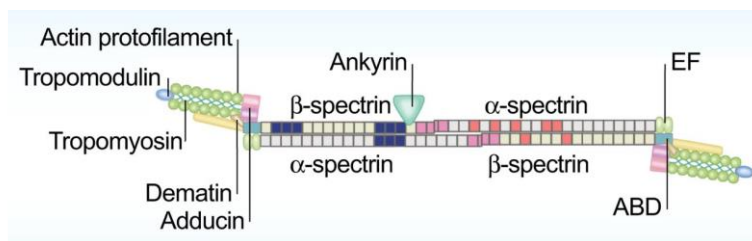


Figura 2.2- Ligações horizontais entre dímeros de espectrina-espectrina, entre espectrina, actina e proteína 4.1R no complexo juncional no esqueleto de membrana sustentado em espectrina [12].

2.1.2.2. Actina

Os glóbulos vermelhos englobam filamentos curtos de dupla hélice não muscular ou β -actina, denominados protofilamentos. Estes ficam quase paralelos ao plano da membrana ($\pm 20^\circ$) e apresentam orientação aleatória. Há cerca de 30 000 a 40 000 protofilamentos por glóbulo vermelho, com 6 a 8 monómeros de actina em cada uma das 2 fitas [17].

2.1.2.3. Tropomiosina

A tropomiosina de eritrócitos é um longo dímero com forma de haste. Um dímero de tropomiosina apresenta a capacidade de se ligar a cada uma das duas vertentes do protofilamento de actina. Esta ligação é dependente de íons de magnésio. As isoformas de células vermelhas da tropomiosina também se ligam à tropomodulina. No entanto, as isoformas de células vermelhas que não apresentam tropomiosina são mais frágeis do que o normal, e apenas a tropomiosina endógena, e as não isoformas musculares mais longas, podem recuperar a estabilidade. A tropomiosina de células vermelhas só é suficientemente longa (~ 34 nm) para cobrir os 7 monómeros de actina estimados em 1 filamento do protofilamento F-actina, o que indica que a tropomiosina tem a função de “régua” molecular na montagem do filamento, fortalecendo-o depois da montagem [17].

2.1.2.4. Tropomodulina 1

A Tropomodulina 1 apresenta duas funções: a capacidade de fechar a extremidade pontiaguda ou de crescimento lento dos filamentos de actina, e a de ligar à tropomiosina, reforçando muito a limitação da actina. Existem 30 000 cópias por glóbulo vermelho, ou uma por protofilamento de actina. Uma Tropomodulina liga-se a ambos os filamentos de actina e a ambos os dímeros de tropomiosina no protofilamento de actina [17].

A tropomodulina 3 é uma proteína que desempenha múltiplos papéis na eritropoiese definitiva, como a ligação do eritroblasto aos macrófagos nutridores, no entanto normalmente não está presente nos eritrócitos maduros [17].

2.1.2.5. Proteína 4.1R

A proteína 4.1R ajuda na ligação de espectrina-actina e fixa o esqueleto da membrana à membrana. Esta proteína une-se tanto à espectrina como à actina e origina um complexo ternário de alta afinidade [17].

A actividade do co-factor está contida num domínio de ligação de 10-kDa espectrina-actina (SABD) no meio da molécula. O local de ligação de actina no SABD é unido por um local de ligação de espectrina de 2 partes formando um único peptídeo linear. Os eritrócitos que têm falta de proteína 4.1R são muito frágeis, mas a sua resistência de membrana é regularizada pelo peptídeo SABD [17]. Na **Figura 2.3** está ilustrada a estrutura da proteína 4.1R.

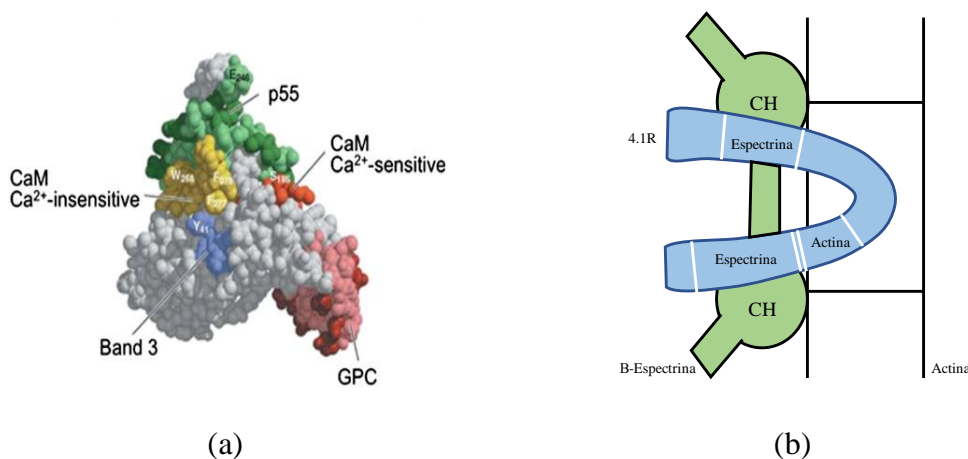


Figura 2.3- Proteína 4.1R. (a) Ilustração do domínio de ligação à membrana da proteína 4.1R. (b) Representação da proteína 4.1R, a cor azul, e das duas zonas de junção de espectrina que compreendem um peptídeo de ligação de actina. Adaptado de [17].

2.1.2.6. Aducina

A aducina é uma proteína multifuncional complexa constituída por uma subunidade α , uma subunidade β , e por uma subunidade γ menos frequente. Estas subunidades apresentam um domínio globular da cabeça e uma cauda alongada e flexível [17].

A extremidade de crescimento rápido dos protofilamentos de actina nas células vermelhas é coberta pela aducina, recrutando espectrina para sítios vizinhos na actina. Estas funções são reguladas pela calmodulina e por várias proteínas quinases [17].

A aducina também proporciona a fixação do esqueleto de membrana à bicamada lipídica através de interações com o canal de troca de aniões (banda 3) e o transportador de glicose tipo 1. A ligação da banda 3 está localizada nas caudas de α - e β -aducina [17].

2.1.2.7. Dematina

A dematina é uma proteína que se liga em 2 locais à actina, um na cabeça e outro na cauda. Inicialmente, esta proteína foi identificada pela capacidade de reunir filamentos de actina em cabos. No entanto, nos eritrócitos maduros, como não apresentam cabos, a dematina apresenta duas funções. Primeiro, a dematina não modificada liga-se à espectrina e aperfeiçoa a ligação espectrina-actina. É observada a perda desta função quando a dematina é fosforilada pela proteína quinase A. Em segundo lugar, a dematina junta-se ao transportador de glicose e dá suporte na fixação da actina à membrana [17].

2.2. Funções dos Eritrócitos

A função principal dos glóbulos vermelhos é o transporte de oxigénio para os tecidos [2], [24], [25]. Anteriormente, considerava-se que os glóbulos vermelhos transportavam exclusivamente oxigénio e nutrientes para os tecidos [24]. No entanto, ainda apresentam outras funções menores na regulação do fluxo sanguíneo local e no transporte do dióxido de carbono [2], [24]. Estudos recentes revelam que estas células são importantes entre órgãos com comunicações adicionais, incluindo a participação no controlo do metabolismo sistémico do NO, regulação redox, reologia sanguínea e viscosidade [24].

O oxigénio é necessário, mas demasiado oxigénio pode ser prejudicial provocando danos nos tecidos. Assim, os seres vivos apresentam um sistema capaz de fornecer a quantidade apropriada de oxigénio aos tecidos no momento adequado. Com a contribuição da hemoglobina, anidrase carbónica e a troca de aniões da proteína da banda 3, estas células desempenham um papel relevante neste sistema, proporcionando um transporte ideal no fornecimento de oxigénio para os tecidos, dependendo da sua atividade metabólica [25].

Para além disto, os sistemas antioxidantes presentes nas hemácias, contribuem para a sua função e integridade. Fundamentos clínicos e experimentais recentes mostram que as hemácias podem estar diretamente incluídas na proteção dos tecidos e na regulação da homeostasia cardiovascular, desempenhando outras funções não canónicas, envolvendo

o metabolismo do NO, a verificação da reologia do sangue, assim como a função eritrocina (libertação de moléculas bioativas, incluindo NO, metabolitos NO, e ATP) [24].

Como já referido, o eritrócito tem a capacidade de transportar dióxido de carbono da periferia para os pulmões, ligando o dióxido de carbono, como carbamato, à extremidade N-terminal da cadeia α -globina, libertando-se na forma de dióxido de carbono nos pulmões. No entanto, esta célula é apenas responsável por transportar 15% do dióxido de carbono, sendo o restante transportado no plasma. A desoxihemoglobina também gera óxido nítrico a partir de nitritos, contribuindo assim para a vasodilatação nos tecidos periféricos. A restrição da hemoglobina ao interior do eritrócito permite a sua proteção contra a capacidade da oxiemoglobina de inativar o óxido nítrico, que ocorre quando há hemólise intravascular, originando vasoconstrição e uma tendência trombótica [2].

A bicamada lipídica age como uma barreira para a retenção de catiões e aniões dentro destas células, permitindo assim que as moléculas de água passem livremente. Os eritrócitos humanos apresentam elevado nível de K^+ intracelular e baixo nível de Na^+ intracelular quando comparados com as concentrações de iões correspondentes no plasma. A manutenção deste gradiente de catiões entre a célula e o seu ambiente envolve um movimento passivo de K^+ para o exterior, que é bombeado de volta pela ação de uma bomba Na^+/K^+ dependente de ATP em troca de iões Na^+ [19].

A **Figura 2.4** indica que quando o sangue arterial chega aos capilares periféricos ocorre a anidrase carbónica, onde o CO_2 é hidratado para H_2CO_3 dentro dos glóbulos vermelhos. Posteriormente, o H_2CO_3 dissocia-se em H^+ e HCO_3^- . A proteína da banda 3 troca o HCO_3^- celular pelo Cl^- no plasma. Assim, o ácido fraco (H_2CO_3) é convertido num ácido forte (HCl), e por consequência o pH intracelular dos glóbulos vermelhos fica ácido. Esta acidificação é responsável pela dissociação do O_2 da oxihemoglobina (HbO_2), sendo o O_2 dissociado facultado aos tecidos que originam metabolicamente CO_2 . Assim, os tecidos que produzem mais CO_2 são abastecidos com mais O_2 a partir de HbO_2 . Os glóbulos vermelhos podem diferenciar entre células metabolicamente ativas e células inativas, podendo fornecer oxigénio especificamente às células metabolicamente ativas. A proteína da banda 3 funciona como um sensor para tecidos metabolicamente ativos, que regula o fornecimento de oxigénio para os tecidos através dos glóbulos vermelhos [25].

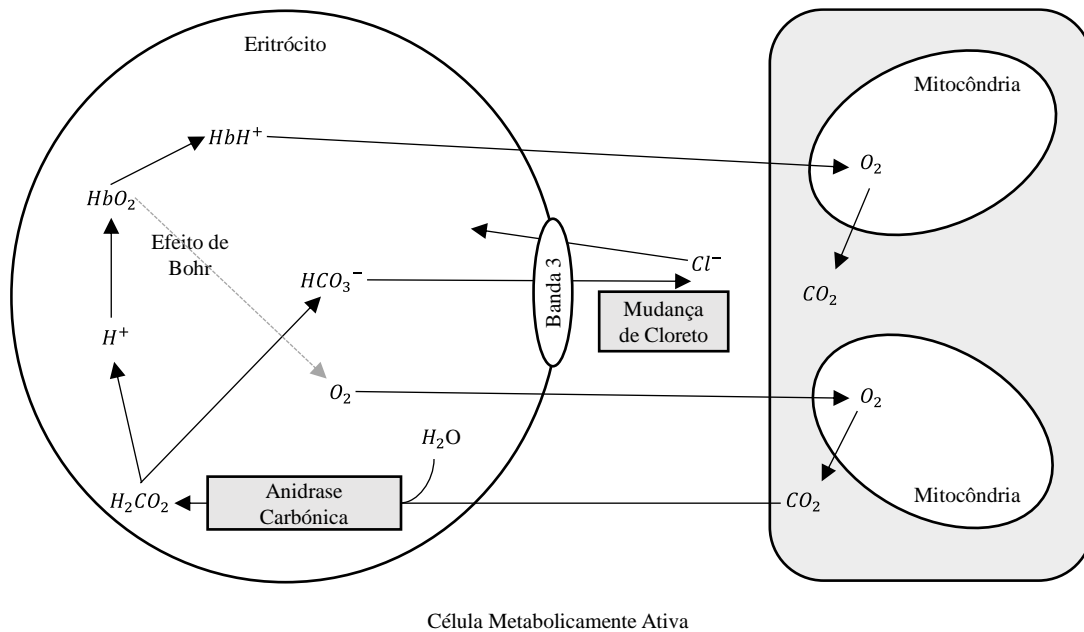


Figura 2.4- Eritrócitos como transportadores de oxigênio para os tecidos. Adaptado de [25].

2.3. Propriedades Mecânicas

Os eritrócitos estão presentes em elevada fração volumétrica no sangue, geralmente cerca de 45%, influenciando as suas propriedades de fluxo. Atualmente, as propriedades mecânicas destas células individuais têm sido muito estudadas, fornecendo suporte para a percepção e previsão do comportamento reológico do sangue [1].

Uma hemácia madura, quando livremente suspensa e sem tensões externas, normalmente adota a forma de disco bicôncavo, com 8 μm de diâmetro e 2 μm de espessura e uma concavidade em cada face. Apesar de assumir uma forma axissimétrica bicôncava na ausência de tensões externas, pode não estar livre de tensões internas. Esta célula não tem núcleo e no seu interior está presente uma solução concentrada de hemoglobina, um fluido viscoso incompressível. Este fluido é rodeado por uma membrana viscoelástica flexível (uma bicamada lipídica e um citoesqueleto) [1]. O citoesqueleto contribui mecanicamente devido à resistência elástica da membrana e às deformações de corte no plano [1]. Esta morfologia única fornece-lhes flexibilidade para circular nas redes microvasculares [26]. A sua elevada deformabilidade é extremamente necessária para que os eritrócitos se comprimam através dos capilares e troquem oxigênio e dióxido de carbono com os tecidos [26].

Recorrendo à teoria da elasticidade linear, para se prever o comportamento mecânico da membrana dos eritrócitos são geralmente definidos: o módulo de elasticidade ao corte, o módulo de compressibilidade da área e o módulo de flexão [3].

O módulo de elasticidade ao corte mede a rigidez de um material isotrópico elástico e pode ser determinado como a razão entre a tensão ao longo de um determinado eixo e a deformação ao longo do mesmo eixo. O módulo de compressibilidade da área mede a resistência à compressão ou expansão da área, e pode definir-se como a relação linear simples entre a tensão da membrana isotrópica e a expansão da área relativa correspondente à dilatação da superfície sem tensão de corte ou flexão. O módulo de flexão representa a curvatura da membrana do glóbulo vermelho, sendo importante para estimular mudanças na forma de repouso, sem tensão de corte ou expansão [3].

A concentração média de hemoglobina na célula está relacionada com a viscosidade citoplasmática e interfere com a deformabilidade desta célula. Um aumento da concentração de hemoglobina nas células envelhecidas reduz a deformabilidade celular. Assim, num meio hipertônico, estas células perdem água resultando num aumento da concentração média de hemoglobina e conseqüentemente uma perda da deformabilidade. No entanto, a perda de água eritrocitária pode contribuir para um aumento local da viscosidade citoplasmática das hemácias [4].

A temperatura dos eritrócitos também influencia as propriedades mecânicas dos mesmos. Uma diminuição de temperatura dos eritrócitos de 37°C para 4°C provoca um aumento significativo no módulo de Young da membrana e na viscosidade da membrana. Por conseqüência, o aumento destas propriedades da membrana originam uma diminuição significativa da deformabilidade [4].

Na **Tabela 2.1** estão representados os valores típicos das diferentes propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos saudáveis.

Tabela 2.1- Propriedades mecânicas e geométricas dos glóbulos vermelhos saudáveis. Adaptado de [3].

Parâmetro	Valor Típico
Volume Celular (μm^3)	89.4 ± 17.6
Área de Superfície (μm^2)	113.8 ± 27.6
Viscosidade Citoplasmática (mPa/s)	6.07 ± 3.8
Viscosidade de Superfície ($\mu\text{N s/m}$)	0.7 ± 0.2
Módulo de Elasticidade ao Corte ($\mu\text{N/m}$)	5.5 ± 3.3
Módulo de Elasticidade de Flexão ($\times 10^{-19} \text{Nm}$)	1.15 ± 0.9
Constante de Tempo de Relaxamento (s)	0.17 ± 0.08
Módulo de Compressibilidade da Área (mN/m)	399 ± 110
Módulo de Young (KPa)	26 ± 7

2.3.1. Deformabilidade Celular

Embora a deformabilidade celular desempenhe um papel fundamental na regulação da função, a sua caracterização quantitativa iniciou-se em 1964 com a publicação do estudo de Rand e Burton, fundamentado na técnica de aspiração de micropipeta para medir a rigidez da membrana [12].

Os eritrócitos possuem uma deformabilidade significativa, que lhes proporciona a alteração da sua forma, de maneira reversível, como resposta a uma força externa. Esta deformabilidade possibilita-lhes fluir através dos microvasos, enquanto transportam oxigénio e dióxido de carbono [4].

Assim, a deformabilidade pode ser descrita como a capacidade do glóbulo vermelho sofrer alterações reversíveis na sua forma, como resposta a uma força externa, que proporciona tensão sobre a célula [4], [5], [26], [27]. Diversos fatores contribuem para a deformabilidade dos glóbulos vermelhos, incluindo as características geométricas da célula, as propriedades reológicas do fluído intracelular e as propriedades reológicas da membrana celular [5].

Como descrito, a deformabilidade das hemácias desempenha um papel importante no transporte de gases (O_2 e CO_2) pela circulação sanguínea. Uma pequena diminuição

na deformabilidade dos eritrócitos origina um aumento significativo na resistência do fluxo microvascular e viscosidade do sangue [4].

Assim, a deformabilidade da membrana depende das suas características estruturais orientadas pela topologia da rede esquelética, pelas ligações entre a rede e a bicamada e, até mesmo pelos componentes citoplasmáticos que funcionam como expansores da rede [28]. Um dos principais mecanismos de diminuição da deformabilidade de hemácias, durante o armazenamento de sangue, é a oxidação da membrana das hemácias [4].

As alterações patológicas na deformabilidade de eritrócitos estão associadas a múltiplas doenças, como Malária, Anemia Falciforme, Diabetes, Doenças Hereditárias, Enfarte do Miocárdio e Hemoglobinúria Paroxística Noturna [3].

2.4. Patologias

As mutações em genes que codificam diversas proteínas são a causa dos distúrbios hereditários da membrana dos glóbulos vermelhos. As principais consequências destas alterações genéticas são a diminuição da deformabilidade celular e a diminuição da sobrevivência destas células [29].

As perturbações hereditárias das hemácias com alteração da membrana e da função celular podem ser divididos em duas classes: a primeira quando a função é alterada devido a mutações em várias proteínas da membrana ou do esqueleto, tais como a esferocitose hereditária, a eliptocitose hereditária, a ovalócitose hereditária e a estomatocitose hereditária, e, a segunda, quando a função é transformada devido a efeitos secundários na membrana como resultado de mutações nos genes da globina, como acontece, por exemplo, na doença falciforme, na doença da hemoglobina S-C, na doença da hemoglobina CC, nas hemoglobinas instáveis e nas talassemias. Uma característica persistente das hemácias e comum a todos os distúrbios referidos é a diminuição da deformabilidade celular [12]. Estas doenças podem ainda interferir com a geometria e com as propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos [14].

Assim, anomalias na forma dos glóbulos vermelhos e outras características dos glóbulos vermelhos podem oferecer informações relevantes na determinação de um diagnóstico correto e diferenciado [6].

2.4.1. Impacto Socioeconómico

As propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos, como alterações da forma e das suas características têm graves implicações na funcionalidade da mesma, resultando em defeitos hereditários ou estados de doença [16] [30]. Por isso, torna-se importante o estudo das propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos.

A gestão de doenças é cada vez mais atormentada pelo financiamento público limitado e pelos recursos económicos reduzidos, requerendo sempre a recolha de informações epidemiológicas para posterior implementação de políticas de saúde, com o objetivo de prevenir e diagnosticar doenças. Da mesma forma, o diagnóstico e o tratamento atempado das doenças dos eritrócitos podem ser eficazes na redução da carga clínica, social e económica [31].

A malária é provocada por parasitas transmitidos por mosquitos do género *Plasmodium*, sendo *Plasmodium falciparum* a espécie mais estudada [32]. Esta doença é um dos maiores problemas de saúde do continente africano. Em 2005, 89% das mortes por malária no mundo incidiram na África Subsaariana. Presume-se que 25 a 35% das consultas ambulatoriais e 20 a 45% das hospitalizações nesta região estejam relacionadas com a malária. Esta doença é responsável pela redução do crescimento económico em 1% por ano [33]. Na África Subsaariana, o acesso a cuidados de saúde é um impedimento para a melhoria da gestão da doença [33].

As famílias utilizam um conjunto de medidas de prevenção, como redes mosquiteiras, sprays de aerossol, espiral de mosquito e repelentes de mosquitos em diferentes áreas. A **Figura 2.5** mostra os gastos familiares mensais por pessoa, com métodos preventivos contra a malária, que variam entre \$0,05 por pessoa nas áreas rurais do Malawi e \$2,10 nos Camarões [34].

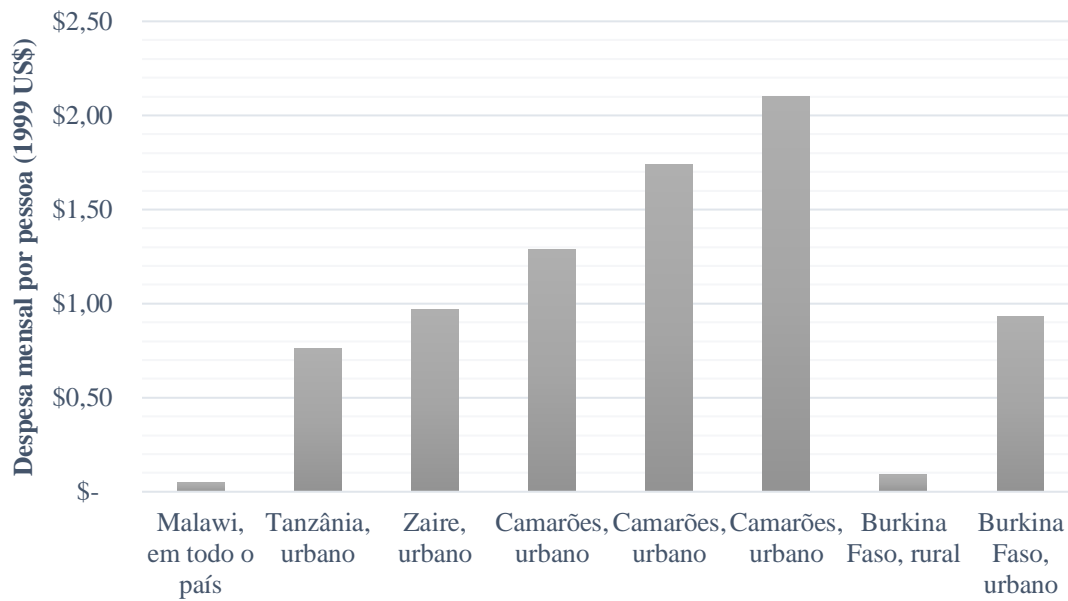


Figura 2.5- Gasto mensal por pessoa em conteúdos de prevenção da malária. Adaptado de [34].

Este estudo demonstrou que 4% das famílias com rendimentos muito baixos gasta o dinheiro na prevenção da malária. No entanto, ainda que algumas famílias gastem grandes quantidades de dinheiro em despesas anti mosquito, estas não são consideradas como prevenção da malária, sendo constantemente utilizadas para a prevenção de picadas e não para prevenção da doença [34].

As despesas familiares em tratamentos relacionados com a malária incluem despesas com taxas de consulta, medicamentos, transporte e o custo de manutenção numa unidade de saúde distante. A **Figura 2.6** mostra as despesas mensais, por pessoa, gastas em tratamentos relacionados com a malária, que variam entre \$0,41 e \$3,88 por pessoa [34].

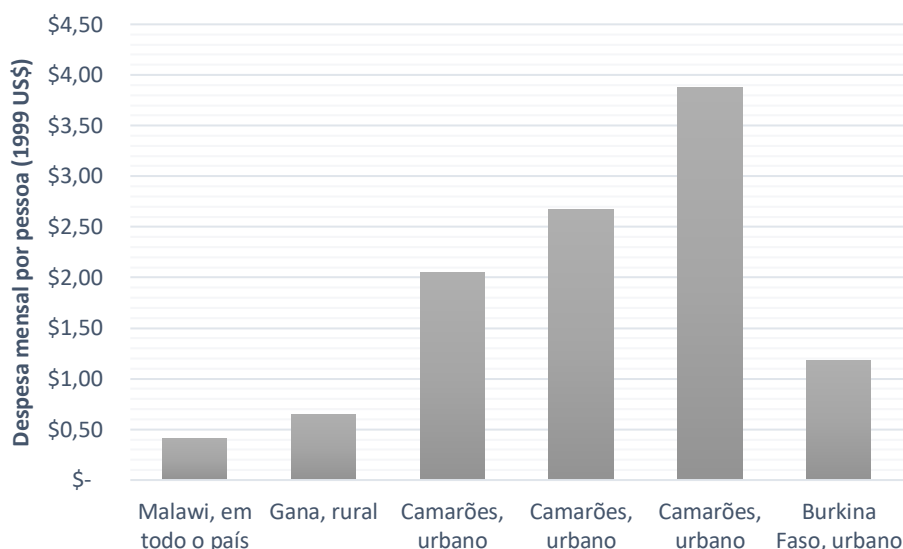


Figura 2.6- Gasto mensal por pessoa em tratamentos relacionados com a malária. Adaptado de [34].

Os tratamentos contra a malária são mais inacessíveis no continente mais pobre, a África. Porém, a Índia, sendo o país com maior número de pobres no mundo, também apresenta um sério problema de malária [35]. Por outro lado, alguns países com rendimentos elevados ainda enfrentam problemas graves de malária, relacionados com a sua localização geográfica. Uma vez que, a distribuição mundial dos mosquitos *Anopheles* (vetor da malária) tem um enorme impacto na prevalência da doença [35].

Doenças relacionadas com o sangue, como a talassemia em partes do sul da Europa e da Ásia, concedem alguma proteção contra a malária em regiões onde esta é menos grave [35].

Em 1940, Portugal foi um dos países do sul da Europa a apresentar malária grave, mais de 100 000 casos por ano, tendo controlado a malária mais tarde do que a Grécia, Itália e Espanha [35].

De todas as hemoglobinopatias, a doença falciforme é o maior problema de saúde pública. Por estar relacionada com a proteção da malária, as frequências mais altas de anemia falciforme são observadas em regiões tropicais. A maioria dos recém-nascidos com doença falciforme acontece em países de baixos e médios rendimentos. Não existindo diagnóstico, nem tratamento precoce, a maioria dos afetados acaba por morrer durante os primeiros anos de vida. Com a melhoria das políticas e infraestruturas de higiene, nutrição e saúde pública, foram observadas reduções na mortalidade. Em 2006,

a Organização Mundial da Saúde identificou a anemia falciforme como um problema de saúde pública global [36].

A prevalência da doença falciforme é mais elevada na África Subsaariana, onde mais de 230 000 crianças afetadas nascem todos os anos (0 a 74% dos nascimentos na África Subsaariana), correspondendo a cerca de 80% dos nascimentos a nível mundial [37]. Nos Estados Unidos, a doença falciforme afeta cerca de 72 000 pessoas e 2 milhões são portadores. No entanto, nos Estados Unidos, a mortalidade reduziu após a implementação do diagnóstico neonatal [38]. Assim, a intervenção precoce é essencial para reduzir a mortalidade precoce associada a esta doença [38].

A diabetes é uma doença crónica muito frequente no mundo. Em 1995, a prevalência da diabetes em Portugal foi considerada cerca de 5,1% da população [39]. Em 2017 nos EUA, cerca de 24,7 milhões de pessoas foram diagnosticadas com a diabetes, ou seja, aproximadamente 7,6% da população total [40]. Número que continuará a aumentar com o envelhecimento e crescimento da população e, com a elevada prevalência de obesidade e estilo de vida sedentário [41].

A diabetes é um problema para os sistemas de saúde devido aos gastos elevados. As pessoas com diabetes necessitam de mais consultas, mais medicamentos e têm maior probabilidade de serem hospitalizadas. Nos Estados Unidos, os doentes com diabetes gastam em média 2,5 vezes mais em cuidados médicos do que as pessoas sem doença [41]. Em 2012, a carga económica relacionada com o diagnóstico da diabetes nos EUA foi de \$245 bilhões [40].

A diabetes acrescenta o risco de existirem complicações neurológicas, vasculares periféricas, cardiovasculares, renais, endócrinas/metabólicas, entre outras, aumentando o custo dos tratamentos que não estão diretamente relacionadas com a diabetes [40]. A **Figura 2.7** resume a percentagem de despesas médicas atribuídas à diabetes para cada complicação crónica nos EUA, como despesas associadas à internação hospitalar, departamento de emergência e consultas médicas, bem como medicamentos prescritos [40].

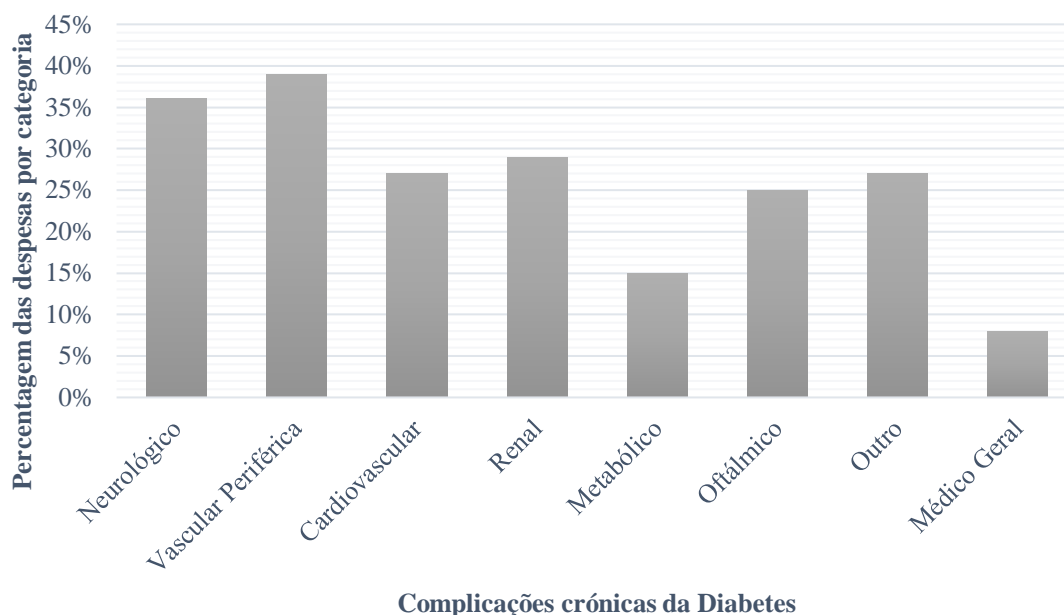


Figura 2.7- Percentagem de despesas médicas atribuídas à diabetes para cada complicação crônica nos EUA associada à diabetes. Adaptado de [40].

Um estudo de 2010, estimou o gasto total anual para a diabetes entre \$376,0 bilhões e \$672,2 bilhões [41]. Os Estados Unidos da América são o país com maior gasto total, apresentando um valor de 52,7%. No entanto, a Índia, sendo o país com a maior população diabética, apresentou gastos de cerca de \$ 2,8 bilhões, o que representa menos de 1% do total mundial [41]. Da mesma forma, na África, um estudo de 2017, estima que 3,3 bilhões foram gastos em cuidados de saúde por pessoas com diabetes, o que corresponde a menos de 1% do valor total gasto em todo o mundo [42].

2.4.2. Malária

A malária é uma doença antiga que continua a ter um elevado número de incidência e mortalidade humana. Os sintomas clínicos da malária são resultado da infecção dos eritrócitos humanos [7]. Esta doença é uma das principais causas de morte em países tropicais e subtropicais, provocando mais de 1 milhão de mortes, todos os anos, a nível mundial [43].

A malária é causada por parasitas protozoários, sendo *Plasmodium falciparum* o tipo mais grave e por vezes fatal [43]–[45].

Na **Figura 2.8** está indicado o ciclo de vida deste hospedeiro e o vetor do mosquito *Anopheles*. Um mosquito infetado com *Plasmodium* introduz esporozoítos no hospedeiro humano que migram para o fígado, passando pelas células de Kupffer e invadindo

hepatócitos que se desenvolvem em merozoítos do fígado. Por sua vez, os merozoítos são libertados na corrente sanguínea, onde se apoderam dos eritrócitos que continuam o seu ciclo de vida da fase assexuada do sangue. É nesta fase que surgem todos os sintomas clínicos [44].

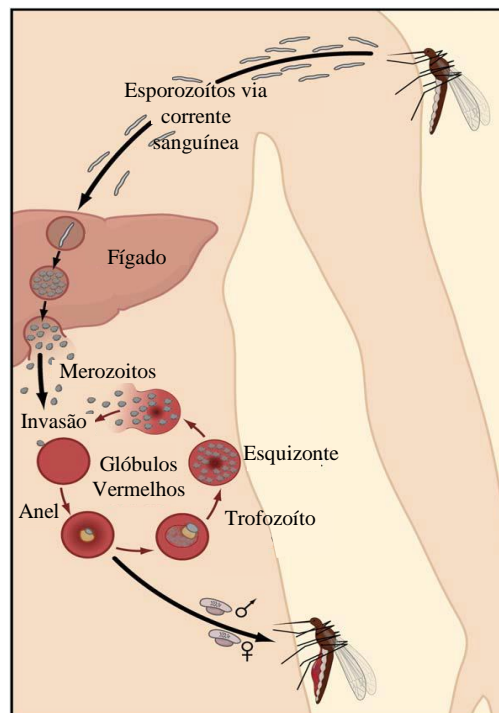


Figura 2.8- Ciclo de vida do hospedeiro *P. falciparum* e o vetor do mosquito *Anopheles*. Adaptado de [44].

O glóbulo vermelho protege o parasita dos mecanismos efetores do hospedeiro, tais como os anticorpos [45]. Durante a maturação do parasita intracelular, acontece um conjunto de mudanças nas propriedades estruturais e funcionais dos glóbulos vermelhos. Estas alterações incluem mudanças na morfologia dos eritrócitos, nas propriedades mecânicas da membrana e do estado de fosforilação das proteínas esqueléticas da membrana. Assim, estas alterações são essenciais para a sobrevivência do parasita [45].

Estudos demonstraram que a deformabilidade dos eritrócitos infetados com *P. falciparum* é mais reduzida, existindo um aumento na rigidez dos glóbulos vermelhos [46].

As células infetadas por *Plasmodium falciparum* estão sujeitas a três fases de desenvolvimento do parasita intraeritrocítico designadas por anel, trofozoítos e esquizonte [47].

As células quando infetadas pelo parasita *Plasmodium falciparum* perdem sucessivamente a sua deformabilidade, ao longo dos três estágios da infecção, conforme o crescimento do parasita [48]. Durante estes estágios da infecção existe uma variação do volume da célula, da forma e da área de superfície enquanto o parasita cresce, conforme representado na **Tabela 2.2** [48].

Tabela 2.2- Comparação das dimensões dos eritrócitos saudáveis e infetados em diferentes estágios de infecção. Onde $s_e = S/(4\pi a^2)$ corresponde à razão da área de superfície em excesso da célula, a é o raio efetivo da célula e V corresponde ao volume da célula. Na última coluna são referidas as dimensões do parasita. Adaptado de [48].

	$S (\mu m^2)$	$V (\mu m^3)$	s_e	$a (\mu m)$	Parasita (μm)
Saudável	132	92	1.34	2.80	(Nenhum)
Anel	132	92	1.34	2.80	$R = 1, h = 0.5$
Trofozoíto precoce	132	105	1.23	2.92	$R = 1.4$
Trofozoíto tardio	132	116	1.15	3.02	$R = 1.7$
Esquizonte	97	85	1.04	2.72	$R = 2.4, h=3$

Com a análise da tabela verificamos que ocorrem mudanças morfológicas drásticas no eritrócito durante os estágios de trofozoíto e esquizontes [48]. Os merozoítos transportam proteínas parasitogênicas para a membrana que modificam a rede de espectrina. Como consequência desta alteração existe um aumento na rigidez da membrana [48]. Na fase de anel, os eritrócitos infetados com malária mantêm a forma e o tamanho dos eritrócitos saudáveis [48].

2.4.3. Esferocitose Hereditária

A esferocitose hereditária é a doença mais comum de anemia hemolítica hereditária, afetando a membrana dos glóbulos vermelhos [18], [49].

Esta doença afeta todas as etnias, sendo particularmente mais comum em pessoas com ascendência do Norte da Europa (1 em 3000) [12]. Geralmente, a doença está associada à herança dominante (75%), embora a herança não dominante (25%) também seja comum [12].

Uma particularidade comum a todas as formas desta doença é a perda da área de superfície da membrana e a resultante mudança na forma das células de discócitos para

estomatócitos e esferócitos [12], [49], conforme representada na **Figura 2.9**. Assim, com a diminuição da área de superfície de membrana, os eritrócitos são incapazes de atravessar o baço, sendo sequestrados e removidos da circulação através do mesmo [18]. Para além disto, esta alteração do formato também a pode tornar mais frágil do que o normal, levando-a à rutura [49]. É ainda importante referir que a gravidade da anemia está associada à extensão da diminuição da área de superfície da membrana [12], [18].

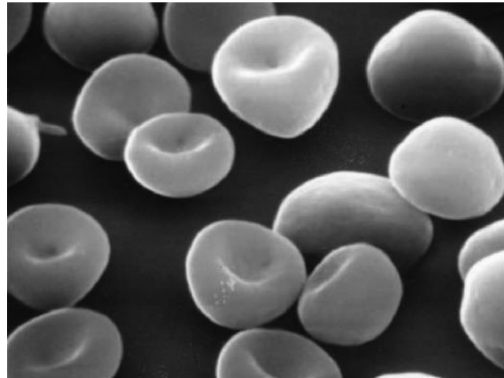


Figura 2.9- Morfologia dos glóbulos vermelhos alterada por esferocitose hereditária [12].

A esferocitose hereditária é identificada através da hemólise com anemia, icterícia, esplenomegalia, reticulocitose, cálculos biliares e a presença de esferócitos em esfregaços de sangue periférico [12]. A forma como a doença se manifesta clinicamente depende das várias mutações de genes que codificam proteínas de membrana, das consequências funcionais e do modo de herança [49].

O diagnóstico pode ser realizado com base na contagem completa de glóbulos vermelhos, contagem de reticulócitos, histórico médico e testes específicos, como o teste EMA (ligação eosina-5-maleimida) e o teste AGLT (*Acidified Glycerol Lysis Time*) [49].

A esplenectomia reduz a gravidade da anemia, sendo considerada o tratamento cirúrgico padrão nas formas moderada e grave de esferocitose hereditária, aumentando o tempo de vida circulatório das hemácias esferocíticas que apresentam deformabilidade celular reduzida [12], [18], [49]. No entanto, esta cirurgia não corrige os defeitos da membrana citoesquelética da esferocitose hereditária [49].

2.4.4. Eliptocitose Hereditária

A eliptocitose hereditária é um doença muito comum, caracterizada pela presença de eritrócitos de formato elíptico no esfregaço de sangue periférico [12]. Embora esta doença esteja presente em todo o mundo, é normalmente encontrada em regiões

endêmicas de malária da África Ocidental, com uma prevalência de aproximadamente 2% [12], [18].

A eliptocitose hereditária é uma doença autossômica dominante, sendo a maioria dos doentes assintomáticos [12]. No entanto, aproximadamente 10% dos pacientes apresentam sintomas de anemia moderada a grave, envolvendo alguns casos de hidropisia fetal [12].

De uma forma geral, as pessoas heterozigotas para uma variante eliptocítica são assintomáticas, enquanto as pessoas com homozigosidade ou heterozigosidade composta para variantes de eliptocitose hereditária apresentam anemia leve a grave, incluindo a variante grave piropoiquilocitose hereditária [12].

Todas as formas de eliptocitose hereditária apresentam como característica uma membrana instável que resulta na transformação progressiva da forma de discócito para eliptócito, conforme representado na **Figura 2.10** e, em casos graves, há a fragmentação da membrana e células com uma área de superfície de membrana reduzida [12], [18]. É ainda importante referir que a gravidade da doença está associada à extensão da diminuição da estabilidade mecânica da membrana e, como resultado a perda da área de superfície da membrana [12]. Esta diminuição da estabilidade mecânica da membrana em eliptocitose hereditária está relacionada com o enfraquecimento das ligações laterais no esqueleto da membrana, como causa de uma interação defeituosa espectrina dímero-dímero ou de um complexo juncional espectrina actina-proteína 4.1R enfraquecido [18].

Do mesmo modo que na esferocitose hereditária, a esplenectomia em pacientes com eliptocitose hereditária reduz a gravidade da anemia em pacientes com anemia grave, aumentando o tempo de vida circulatório dos glóbulos vermelhos fragmentados [12].

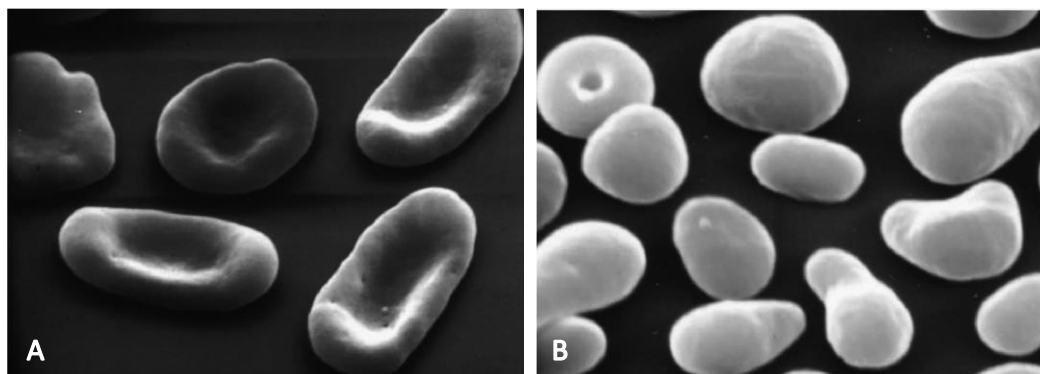


Figura 2.10- Morfologia dos glóbulos vermelhos alterados por (A) eliptocitose hereditária não hemolítica e (B) eliptócitos, poiquilócitos e eritrócitos fragmentados em eliptocitose hereditária hemolítica [12].

2.4.5. Ovalócitose Hereditária

A ovalócitose é uma doença muito comum no Sudeste Asiático, com prevalência entre os 5% e os 25%, estando presente em áreas endêmicas de malária [12]. Esta é caracterizada pela presença de eritrócitos arredondados ou ovoides [3], transmitindo-se de forma autossômica dominante e, até agora, apenas foram identificados heterozigotos nas regiões de alta incidência [12]. As membranas dos ovalócitos são 4 a 8 vezes menos elásticas quando comparadas com membranas normais. Assim, a ovalócitose hereditária é a única que apresenta uma mesma mutação num único gene, causando o fenótipo morfológico [12].

2.4.6. Doença Falciforme

A doença falciforme é uma doença hereditária extremamente complexa, caracterizada pela sua heterogeneidade nas anormalidades reológicas [26]. Mais de 50 000 americanos estão infetados com esta doença, tornando-se por isso uma das mais prevalentes nos Estados Unidos [50].

Em 1910, a doença falciforme foi relatada pela primeira vez pelo médico de Chicago, James B. Herrick [26]. Passados 40 anos, Linus Pauling *et al.* defendeu a existência de uma doença molecular e propôs que o agente causador eram moléculas de hemoglobina defeituosas [26]. Estudos posteriores revelaram que uma única substituição de um aminoácido foi responsável pela presença de hemoglobina anormal nas células falciformes (hemoglobina S ou HbS), sendo a circulação venosa relativamente desoxigenada no local predominante para a falcização [26]. Portanto, a doença falciforme é causada pela substituição de uma valina por um ácido glutâmico na sexta posição do aminoácido no gene da β -globina [50]. Esta substituição leva à polimerização da Hb desoxigenada e à formação de fibras longas e rígidas, que faz com que os eritrócitos adotem uma variedade de formas irregulares, alterando o seu comportamento viscoelástico e aumentando a sua rigidez e fragilidade [51].

O modo de transmissão é autossômico recessivo, onde duas cópias de Hb S ou uma cópia de Hb S juntamente com outra variante de β -globina são necessárias para expressar a doença [50].

A caracterização das propriedades mecânicas dos eritrócitos é essencial para o entendimento da fisiopatologia de diversas doenças relacionadas com os eritrócitos [51].

A deformabilidade presente nos eritrócitos falciformes pode ser prejudicial devido à sua capacidade de formarem uma microvasculatura em foice. Na **Figura 2.11** está representada as alterações de deformabilidade da membrana por polimerização de Hb S. Um hematócrito baixo é responsável pela anemia e pela redução da capacidade de transporte de oxigênio do sangue, e hematócritos mais altos aumentam a viscosidade do sangue, reduzem as taxas de fluxo e indicam uma maior tendência para a oclusão vascular [26].

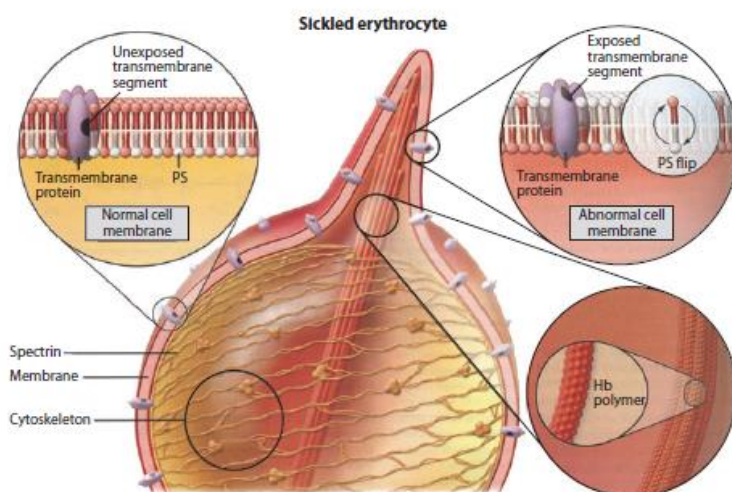


Figura 2.11- Deformabilidade da membrana alterada por polimerização de Hb S [26].

Um estudo de Maciaszek *et al.* demonstra que os eritrócitos falciformes apresentam valores de módulo de Young entre 1 e 60 kPa variando com o grau de oxigenação e com a percentagem de Hb S presente nos mesmos [51].

Os portadores de Hb S estão protegidos contra a infecção por malária. Contudo, esta proteção provavelmente é a responsável pela elevada frequência de Hb S em indivíduos com ascendência africana e mediterrânea [50]. No entanto, apesar desta vantagem, indivíduos com doença falciforme apresentam elevadas taxas de mortalidade [50].

2.4.7. Diabetes Mellitus

A diabetes *Mellitus* é um distúrbio metabólico, assinalado pelo aumento da glicose no sangue associado com a diminuição da produção de insulina ou resistência à mesma [3], [4].

Quando as hemácias são expostas a elevados níveis de glicose por largos períodos, as membranas das hemácias e a hemoglobina ligam-se à glicose através da glicosilação.

Este processo resulta na alteração das propriedades reológicas e no aumento da hemoglobina glicosilada [4].

Esta doença pode resultar em complicações, principalmente doenças microvasculares, como nefropatia e retinopatia. Estas microangiopatias diabéticas estão diretamente relacionadas com anormalidades hemorreológicas, como elevada viscosidade do sangue total. Este aumento da viscosidade em pacientes diabéticos está associada com a redução da deformabilidade do eritrócito [4]. Assim, a viscosidade citoplasmática de hemácias varia com as propriedades físico-químicas da hemoglobina, como glicosilação, relacionada com o aumento da hiperglicemia [3].

Diversos estudos demonstram que a diabetes pode estar tanto associada ao aumento da viscosidade plasmática e sanguínea total, como da arquitetura anormal da membrana das hemácias, causando a redução da deformabilidade celular [3] [52]. Estudos mostraram que a diabetes Tipo 2 está associada a distúrbios na arquitetura da membrana dos eritrócitos, comprometendo as suas funções. Os eritrócitos destes pacientes são alongados e torcem-se em volta das fibras de fibrina formadas [30].

Da mesma forma que em outras doenças, a detecção precoce é crucial para prevenir a progressão da doença, podendo retardar ou evitar que a nefropatia diabética progrida para doença renal crônica [4].

A **Figura 2.12** mostra um glóbulo vermelho de um paciente diabético. Na diabetes, os eritrócitos são alongados, com menores dimensões e menor profundidade côncava, como indicado na **Tabela 2.3** e, as suas membranas torcem em torno das fibras de fibrina [30].

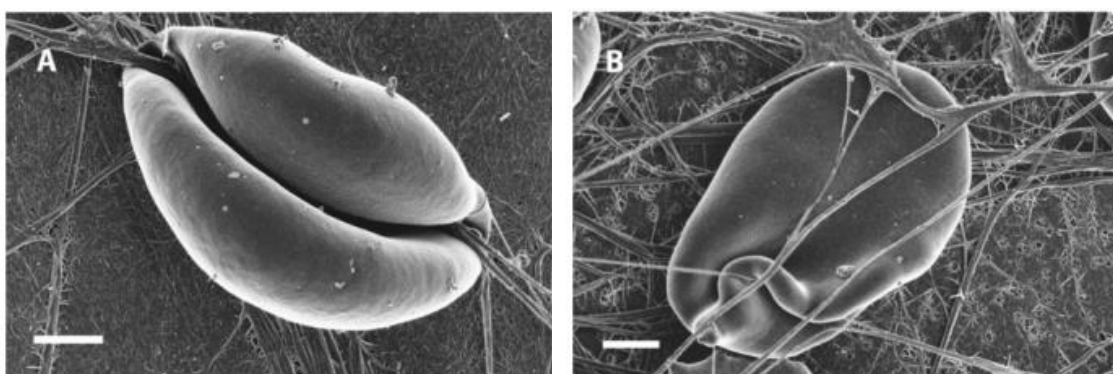


Figura 2.12- Morfologia do glóbulo vermelho de um paciente diabético. A) Glóbulo vermelho torcido por fibras de fibrina; B) Estrutura alongada do glóbulo vermelho [30].

Tabela 2.3- Parâmetros dos eritrócitos saudáveis e diabéticos. Adaptado de [30].

	Controlo	Diabético
Diâmetro	7.22 $\mu\text{m} \pm 0.16 \mu\text{m}$	6.80 $\mu\text{m} \pm 0.08 \mu\text{m}$
Altura	2.68 $\mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$	1.48 $\mu\text{m} \pm 0.11 \mu\text{m}$
Profundidade côncava	358.2 nm ± 117.6 nm	153.9 nm ± 58.6 nm

Com os dados da **Tabela 2.3** observa-se uma diferença no diâmetro, altura e profundidade côncava entre os indivíduos saudáveis e diabéticos [30]. Para além disto, sabe-se que as proteínas do citoesqueleto de hemácias de pacientes diabéticos são fortemente glicosiladas e que a espectrina sofre danos oxidativos [30].

2.4.8. Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva pertencente ao grupo das proteinopatias e, é caracterizada pela deposição extracelular anormal do peptídeo β -amilóide e perda sináptica [53] [54]. Considera-se que 20% do oxigénio total é consumido pelo indivíduo durante as funções neuronais. Logo, o fornecimento deficiente de oxigénio para o cérebro é uma das causas da disfunção neuronal associada a esta doença [53].

O fornecimento de oxigénio para o cérebro precisa que os glóbulos vermelhos transportadores de oxigénio se deformem, de forma a passarem pelos capilares que fornecem oxigénio para o cérebro humano. Assim, as alterações vasculares associadas à amiloidose prejudicam diretamente o fluxo sanguíneo [53].

Na **Figura 2.13** é possível visualizar uma amostra de glóbulos vermelhos num paciente com doença de Alzheimer e uma amostra dos glóbulos vermelhos de um indivíduo saudável. Assim, analisando a imagem verifica-se que os eritrócitos do indivíduo saudável apresentam mais células bicôncavas lisas, enquanto no paciente com Alzheimer há um elevado número de eritrócitos com morfologia alterada ou eritrócitos alongados [53].

Os eritrócitos alongados presentes em pacientes com Alzheimer assinalam possíveis alterações da membrana, como diminuição da deformabilidade dos eritrócitos.

O aumento da aderência de hemácias à microvasculatura cerebral é um dos fatores que contribui para a diminuição do fluxo sanguíneo e do fornecimento de oxigênio em pacientes com doença de Alzheimer [53].

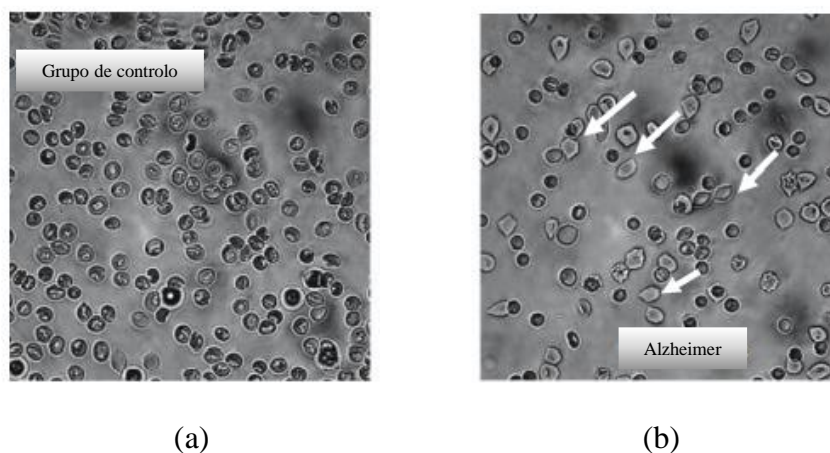


Figura 2.13- (a) Glóbulos vermelhos de um paciente saudável, e (b) glóbulos vermelhos de um paciente com doença de Alzheimer. Adaptado de [53].

Na **Tabela 2.4** estão representadas as diferentes propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos quando afetados por algumas patologias.

Tabela 2.4- Propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos quando afetados por esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, ovalócitose e estomatocitose. Adaptado de [3].

	Grupo de controle	Esferocitose Hereditária	Eliptocitose Hereditária	Ovalócitose	Estomatocitose
Módulo de elasticidade de corte ($\mu\text{N/m}$)	5.4 ± 3.4	5.04 ± 1.32	6.5 ± 2.1	-	-
Constante de tempo de relaxamento (s)	0.19 ± 0.086	0.086 ± 0.06	0.04 ± 0.02	-	-
D_Imax (perfil osmótico máximo em função da osmolaridade)	0.45 ± 0.05	0.3 ± 0.27	0.65 ± 0.2	0.3 ± 0.05	0.51
Módulo de Young (KPa)	26 ± 7	43 ± 21	-	84.23	-

2.4.9. Outras Patologias

Existem ainda outras patologias associadas aos glóbulos vermelhos, que provocam alterações da membrana e da função celular. No entanto, estas patologias não foram tão estudadas, não havendo tanta informação disponível na literatura.

2.4.9.1. Estomatocitose hereditária sobrehidratada

A estomatocitose hereditária sobrehidratada é uma doença autossômica dominante caracterizada pela presença de um elevado número de estomatócitos em esfregaços de sangue. Nesta patologia os glóbulos vermelhos apresentam uma esfericidade aumentada relacionada com o aumento do volume celular, mas sem o aumento da área de superfície da membrana. Assim, os estomatócitos com esta forma serão sequestrados pelo baço. Este aumento de volume está associado com a incapacidade da célula regular a sua homeostase de cátions. Os estomatócitos apresentam um aumento do conteúdo catiónico total devido ao maior conteúdo de sódio intracelular, resultando num aumento do volume celular [12].

Da mesma forma que nas patologias referidas anteriormente, nesta doença é utilizada a esplenectomia como tratamento, no entanto existe um maior risco de complicações tromboembólicas venosas [12].

2.4.9.2. Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia é um distúrbio metabólico determinado pelas elevadas quantidades de colesterol no sangue. A presença de colesterol no fluxo sanguíneo tem como consequência o crescimento de placas ateroscleróticas que reduzem o lúmen das artérias coronárias e originam implicações ao nível da perfusão miocárdica [3]. Os efeitos indiretos da hipercolesterolemia afetam a reologia do sangue, a viscosidade do sangue total, a ativação plaquetária e a deformabilidade dos eritrócitos, conduzindo novamente à circulação coronária prejudicada [3].

Forsyth *et al.* descreveram um dispositivo de focagem de fluxo microfluídico com o objetivo de observar a relação entre o colesterol e a liberação de ATP de hemácias, mostrando que as mudanças no colesterol da membrana podem resultar em alterações na deformabilidade de hemácias e, portanto, interrupções na liberação de ATP [3].

Chung-Yung *et al.* compara as propriedades reológicas dos eritrócitos de indivíduos do sexo masculino com colesterol alto, com indivíduos do sexo masculino saudáveis, concluindo que as características morfológicas e reológicas dos eritrócitos estão

diretamente relacionadas com o estado de saúde geral. A presença de colesterol nos eritrócitos mostrou um aumento da área de superfície e da deformabilidade. Neste estudo, a medição da viscosidade mostrou que as amostras de sangue se comportam como um fluido não newtoniano e, a viscosidade aparente do sangue total do grupo com colesterol alto foi superior ao do grupo saudável. O aumento do colesterol sanguíneo, aumentou diretamente o tempo de fluxo de eritrócitos e diminuiu a sua permeabilidade [55].

De acordo com Kanakaraj e Singh, o aumento da concentração de colesterol nas membranas dos eritrócitos *in vitro* provoca um aumento da rigidez eritrocitária e da viscosidade do sangue. Assim, o aumento do colesterol está associado a uma redução da flexibilidade do eritrócito que retarda o fluxo sanguíneo, e por consequência prejudica a capacidade de fluxo eritrocitário na microcirculação [55].

Portanto, o colesterol intracelular acumula-se, provocando um aumento da rigidez e uma diminuição da deformabilidade e da permeabilidade dos eritrócitos e, por consequência, prejudica a sua função física [55].

2.4.9.3. Obesidade

A obesidade é um distúrbio metabólico generalizado relacionado com diversos fatores de risco cardiovascular, como diabetes, hipertensão arterial e hipercolesterolemia. Devido aos diferentes graus de obesidade, existem diversos resultados publicados relativamente à deformabilidade dos eritrócitos em pacientes obesos [3].

Um estudo focou-se na avaliação da deformabilidade de eritrócitos num grupo de pacientes com obesidade grave e mórbida sem outros fatores de risco cardiovasculares. No final, verificaram que a deformabilidade de eritrócitos não diminui em pacientes obesos sem outros fatores de risco cardiovasculares. Assim, tanto para a obesidade, como para a hipercolesterolemia, é necessária uma investigação mais aprofundada sobre as alterações na membrana dos glóbulos vermelhos [3].

CAPÍTULO 3 – MÉTODOS NUMÉRICOS

3. Métodos Numéricos

As técnicas e soluções numéricas transformaram-se numa ferramenta cada vez mais frequente na ciência da engenharia [56]. Com o passar dos anos, estas técnicas apresentaram um crescimento, devido ao aumento da capacidade de processamento e de cálculo dos computadores [57] [58]. Estas ferramentas para além de serem não invasivas, ainda apresentam evidentes vantagens para o estudo da biomecânica e da influência das forças mecânicas nos sistemas biológicos [59].

Ao longo deste capítulo será abordada uma visão geral do método dos elementos finitos e de um método sem malha, RPIM, que serão utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

3.1.Método dos Elementos Finitos

Atualmente, a técnica de discretização mais vulgar, disponível na literatura, é o Método dos Elementos Finitos (FEM), sendo uma ferramenta muito eficiente para modelação e simulação na área da engenharia biomédica [11][60]. A utilização de métodos aproximados para resolução de equações diferenciais, com base em funções de interpolação foi apresentada por Rayleigh (1870), Ritz (1909) e Galerkin (1915) [57]. Em 1972, este método foi praticado pela primeira vez na biomecânica óssea, para análise do comportamento mecânico de partes do esqueleto e, desde essa altura que se tem tornado mais popular, especialmente na área da biomecânica [60].

O FEM permite uma análise numérica, através da qual equações diferenciais parciais são aproximadamente solucionadas [61]. Para obter esta solução é necessário recorrer ao processo de discretização, que consiste na divisão do domínio num sistema equivalente de domínios de dimensão inferior interligados por nós comuns [57]. Na perspetiva da engenharia, esta é uma técnica capaz de solucionar diversos problemas, como análises de tensões, transferências de calor, fluxo de fluidos, entre outros [61].

Este método envolve a discretização do domínio com um número finito de elementos interligados, tal como representado na **Figura 3.1**. Este é um método dependente de malha, uma vez que cada elemento está ligado, de forma direta ou indireta, a todos os restantes elementos, por meio de interfaces comuns, produzindo assim a malha [62].

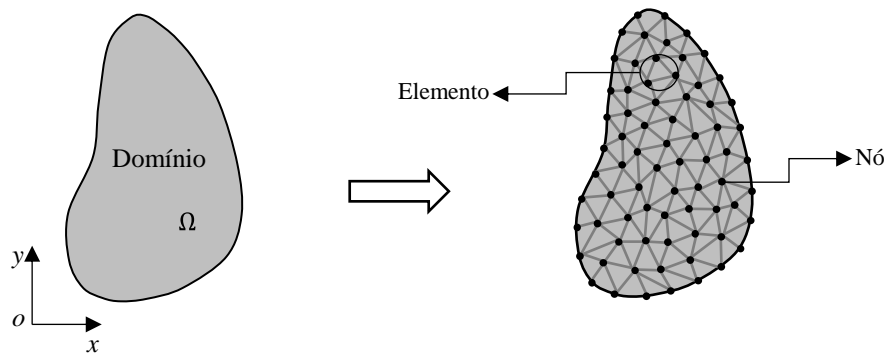


Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento de discretização espacial de um domínio por elementos finitos. Adaptado de [63].

Para problemas lineares, é determinada a sua solução recorrendo a sistemas de equações lineares, onde o número de incógnitas é igual ao número de nós multiplicado pelo número de graus de liberdade de cada nó. No entanto, para que a solução seja possível, geralmente é requerida a utilização de milhares de nós, uma vez que a precisão melhora com o aumento do número de nós/elementos, revelando assim a importância dos sistemas computacionais para a resolução destas equações [61]. Recorrendo às funções de forma é possível interpolar qualquer variável conhecida [62]. A **Eq. 3.1** representa uma interpolação recorrendo às funções de forma. Sendo \mathbf{u} a variável interpolada num dado ponto do domínio do problema $\mathbf{x}_I = \{x_I, y_I, z_I\}$, $\mathbf{N}(x_I, y_I, z_I)$ representa o vetor da função de forma construída no ponto \mathbf{x}_I e \mathbf{d}_e representa as variáveis nodais, isto é, os valores das variáveis dos nós utilizados para contruir \mathbf{N} .

$$\mathbf{u}(x_I, y_I, z_I) = \mathbf{N}(x_I, y_I, z_I) \cdot \mathbf{d}_e \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Assim, após definir a conectividade inter-elemento, a malha de integração e as funções de forma de cada ponto de integração, é possível construir a matriz de rigidez de cada elemento e somar todas numa matriz de rigidez global \mathbf{K} . De seguida, o vetor das forças nodais, \mathbf{f} , é construído, e as condições de fronteira essenciais são impostas na matriz de rigidez global. A forma fraca de Galerkin discretizada permite escrever o seguinte sistema de equações:

$$\mathbf{K}\mathbf{u} + \mathbf{M}\dot{\mathbf{u}} = \mathbf{f}_b + \mathbf{f}_t \quad (\text{Eq. 3.2})$$

e, conseqüentemente, obter o campo de deslocamentos global \mathbf{u} .

A modelação do FEM é constituída por três componentes principais, o pré-processamento, o processamento (no qual o sistema de equações é resolvido e todas as variáveis são calculada) e o pós-processamento [60]. Um modelo CAD é gerado no pré-

processamento, sendo a geometria e as propriedades do material adquiridas com base em tomografias computadorizadas. Posteriormente, é desenvolvido o modelo e gerada a malha. Com as propriedades do material definidas, torna-se necessário definir as condições de fronteira, sendo essencial a sua determinação correta, de modo a obter resultados precisos [60]. É no pré-processamento que a densidade da malha é definida. Testes e validações da malha podem representar custos computacionais consideráveis. No entanto, esta é uma tarefa relevante, uma vez que o desempenho do FEM depende da qualidade da malha do modelo. Por isso, qualquer alteração da malha durante a sua análise, representa um custo computacional adicional, apresentando uma desvantagem importante [11].

A maior vantagem do FEM é o conceito de discretização com base em elementos. No entanto, como o FEM é um método de aproximação dependente da qualidade da malha, tal pode trazer desvantagens [64].

3.2. Métodos sem Malha

Em meados de 1970, surgiram os métodos sem malha [65]. Nos últimos anos, estes métodos tem alcançado uma evolução significativa, em parte devido ao desenvolvimento dos sistemas computacionais [56]. Estes métodos possuem diversas vantagens comparativamente com o FEM, como a eficiência no remalhamento, que permite simular grandes deformações e distorções de materiais macios. Além disso, a suavidade e a precisão dos campos de deslocamentos, de tensões ou de deformações, adquiridos recorrendo a métodos sem malha, representam uma vantagem na previsão da ruptura ou dano de biomateriais [11]. No entanto, o FEM e os métodos sem malha não são incompatíveis, podendo ser combinados com o objetivo de alcançar melhores desempenhos computacionais [64].

Nos métodos sem malha, os nós podem ser distribuídos aleatoriamente, visto que as funções de campo são aproximadas a um domínio de influência e não a um elemento. Contrariamente ao FEM, nos métodos sem malha os domínios de influência podem e devem sobrepor-se [63]. A função de interpolação implica um domínio de aplicação, sendo que fora deste domínio a função adota valores iguais a zero. No FEM, este domínio é representado pelo elemento e, nos métodos sem malha, esse domínio é designado por domínio de influência. Desta forma, nos métodos sem malha é fundamental a determinação do domínio de influência para cada ponto de integração pertencente à malha

de integração que discretiza o domínio do problema. No entanto, a técnica utilizada para caracterizar estes domínios varia de acordo com o método sem malha utilizado [63].

Na literatura estão descritos diversos métodos sem malha [63]. Neste trabalho irá ser utilizado um método sem malha interpolador, baseados na técnica dos “Radial Point Interpolators” (RPI), como é o caso do “Radial Point Interpolation Method” (RPIM) [56] [63]. O RPI teve origem com o Método de Interpolação Pontual (PIM), que utilizava apenas funções de base polinomial para construir as funções de forma [63]. Todavia, esta técnica apresentava alguns problemas numéricos, os quais foram resolvidos incluindo uma função de base radial, criando RPIM [63].

3.2.1. Procedimento Genérico

Assim como na maioria dos métodos numéricos que dependem de discretização nodal, primeiro é necessário definir a geometria do problema em estudo, bem como o domínio sólido e os seus limites, sendo para isso implementadas as condições de fronteira naturais e essenciais. Seguidamente, o domínio do problema é discretizado numericamente por um conjunto de nós, podendo seguir uma distribuição regular ou irregular (a qual poderá afetar a precisão da solução), conforme ilustrado na **Figura 3.2**. Contrariamente ao FEM, a conectividade nodal não é estabelecida no próprio pré-processamento (através dos elementos). Assim, é essencial ter informação relativa à localização espacial de cada nó discretizado no domínio do problema, para mais tarde (recorrendo a construções matemáticas) estabelecer a conectividade nodal (domínios de influência) [63].

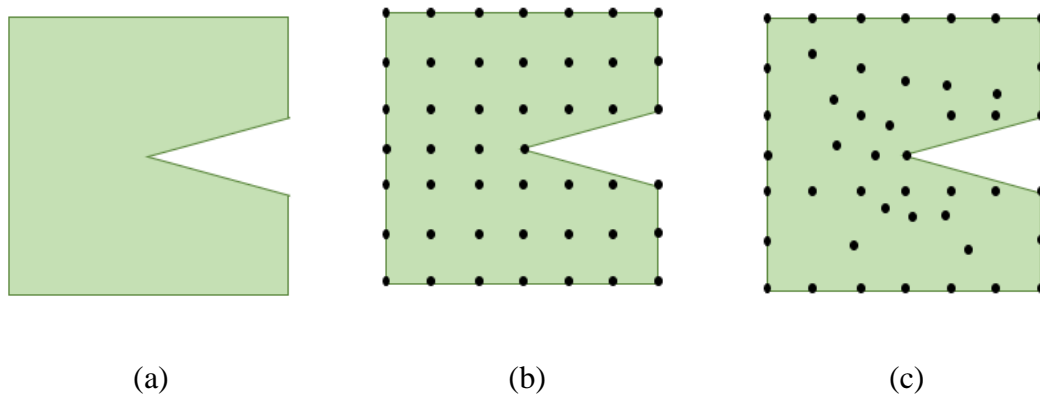


Figura 3.2- (a) Domínio do problema. (b) Discretização nodal de forma regular. (c) Discretização nodal de forma irregular. Adaptado de [63].

Após a distribuição nodal, é contruída uma malha de integração de fundo, para integrar numericamente as equações de forma fraca que regem o fenómeno físico. Assim como no FEM, usualmente são utilizadas malhas de integração baseadas em células de integração, as quais são preenchidas com pontos de integração respeitando a regra de integração de Gauss [63].

Posteriormente, com a distribuição nodal definida e contruída a malha de integração, é possível impor a conectividade nodal. No FEM, a conectividade nodal é obtida por elementos. No entanto, como nos métodos sem malha não existem elementos, em cada ponto de integração a conectividade nodal é imposta recorrendo ao conceito de domínio de influência. Para se definir o domínio de influência de um dado ponto de integração, reúnem-se os nós no interior de áreas ou volumes concêntricos no respetivo ponto de integração. Desta forma, a conectividade nodal é obtida pela sobreposição do domínio de influência de cada nó [63].

De seguida, são construídas as funções de forma, com base nas funções de interpolação e é estabelecido o sistema global de equações [64].

A seguir, será estudada a conectividade nodal e integração numérica para o método sem malha aqui estudado: RPIM.

3.2.2. RPIM

3.2.2.1. Conetividade Nodal

Como referido anteriormente, com a distribuição nodal definida e contruída a malha de integração, é possível impor a conectividade nodal. No RPIM, a conectividade nodal é alcançada através da sobreposição do domínio de influência de cada nó. Esses

domínios de influência correspondem a nós que se encontram dentro de uma área (problema 2D) ou volume fixo (problema 3D). No entanto, uma alteração no tamanho ou na forma desses domínios de influência, ao longo do domínio do problema, afetam o desempenho e, por consequência, a respetiva solução [63].

Independentemente do tipo de método sem malha utilizado, estudos anteriores sugerem que cada domínio de influência deve conter entre 9 e 16 nós [63].

Para um espaço bidimensional, são sugeridos dois domínios de influência: o domínio de influência retangular e o domínio de influência circular, como representado na **Figura 3.3** [63].

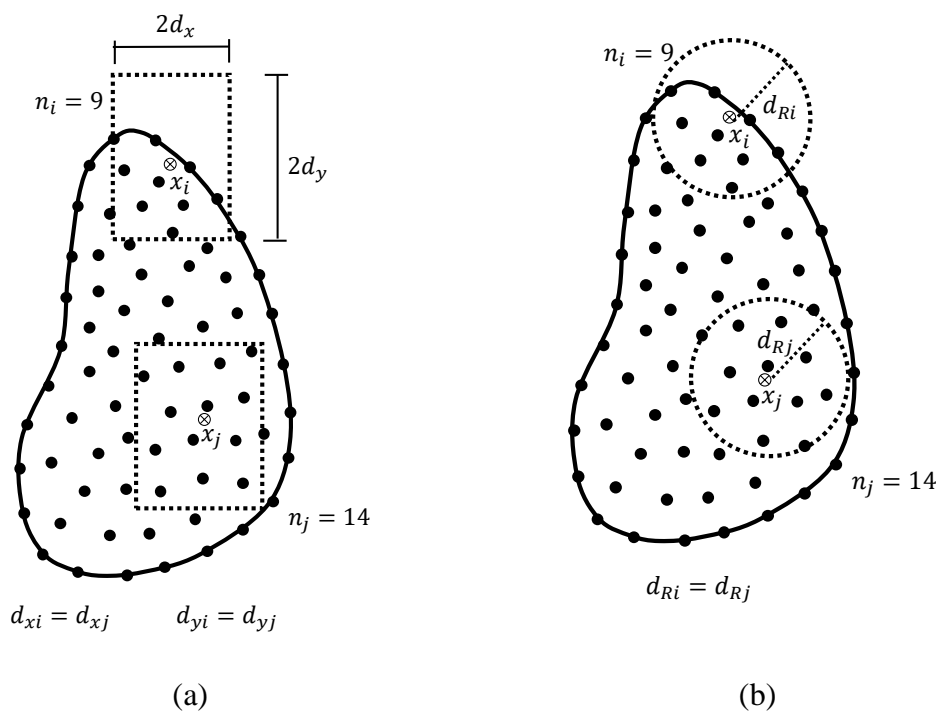


Figura 3.3- (a) Domínio de influência retangular fixo. (b) Domínio de influência circular fixo. Adaptado de [63].

No domínio de influência retangular fixo, são identificadas as dimensões d_x e d_y . Seguidamente, para cada ponto de interesse x_i são reconhecidos os nós (n) dentro do retângulo $d_x \times d_y$ centrado em x_i . Para o caso do domínio de influência circular fixo, a dimensão d_R é fixada e, para cada ponto de interesse x_i são identificados os nós dentro do círculo com centro em x_i e raio d_R [63].

3.2.2.2. Integração Numérica

O esquema de integração de Gauss-Legendre é utilizado para integração numérica no RPIM. Na integração de Gauss-Legendre, o domínio sólido é dividido numa grelha

regular, conforme a **Figura 3.4**, onde cada célula da grelha deverá ser preenchida com pontos de integração, de acordo com a regra da quadratura de Gauss-Legendre [63].

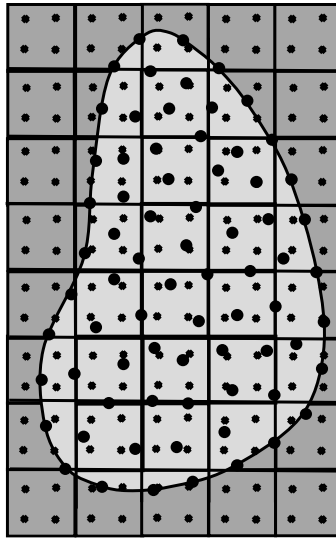


Figura 3.4- Malha de integração Gaussiana Geral. Adaptado de [63].

Assumindo a célula de integração presente na **Figura 3.5 (a)**, o quadrilátero inicial é transformado num quadrilátero isoparamétrico, **Figura 3.5 (b)**, e desta forma os pontos da quadratura de Gauss-Legendre são distribuídos dentro do quadrado isoparamétrico. Recorrendo às funções de interpolação isoparamétricas são obtidas as coordenadas cartesianas dos pontos de quadratura. O peso de integração do ponto de quadratura é adquirido multiplicando-se o peso isoparamétrico do ponto de quadratura pelo inverso do determinante da matriz Jacobiana da grelha de células correspondente. No entanto, se a grelha de células que discretizam o domínio for maior do que o domínio sólido, os pontos de integração fora do domínio sólido devem ser eliminados [63].

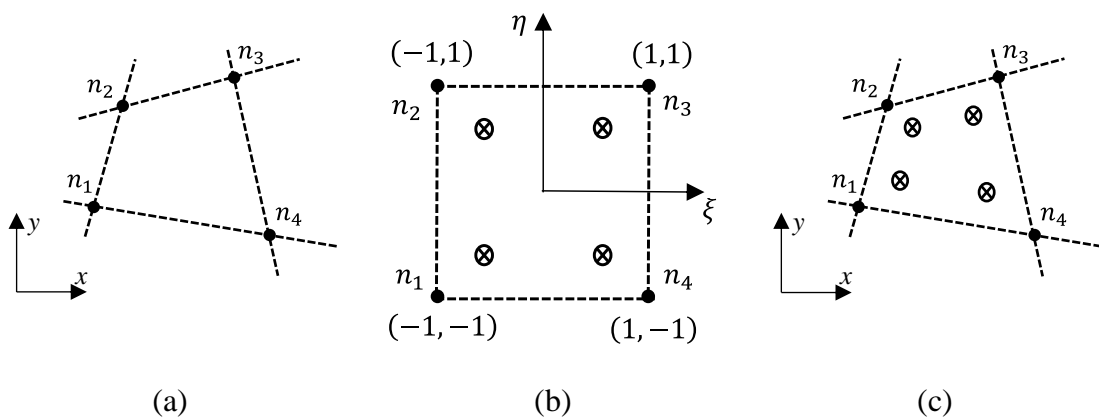


Figura 3.5- (a) Quadrilátero inicial. (b) Alteração do quadrilátero inicial para um quadrado isoparamétrico e aplicação da regra do ponto de quadratura 2×2 . (c) Retorno para a forma inicial do quadrilátero. Adaptado de [63].

A malha de integração discreta permite efetuar a integração de uma qualquer função $F(\mathbf{x})$. Considere-se a função $F(\mathbf{x})$ definida no domínio Ω . Pretende-se integrar a função $F(\mathbf{x})$ no domínio Ω . Essa integração pode ser efetuada exatamente, recorrendo a técnicas analíticas de integração (membro esquerdo da Eq. 3.3) ou aproximadamente, recorrendo a técnicas discretas de integração (membro direito da Eq. 3.3), onde \hat{w}_i é o peso de integração do ponto \mathbf{x}_i e n_g é número de ponto de integração que discretizam o domínio Ω [63].

$$\int_{\Omega} F(\mathbf{x}) d\Omega = \sum_{i=1}^{n_g} \hat{w}_i F(\mathbf{x}_i) \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Note-se que em mecânica dos sólidos, geralmente, a ordem polinomial da função $F(\mathbf{x})$ é desconhecida, o que impede o uso de técnicas analíticas de integração. O esquema de integração em quadratura de Gauss-Legendre é dependente da complexidade da função de forma [63].

3.2.3. Funções de Forma

No RPIM é utilizada a técnica RPI para construir as funções de interpolação. Considere-se uma função $u(\mathbf{x})$ definida no domínio Ω , o qual está discretizado por um conjunto de N nós [63][66]. Apenas os nós que se encontram no interior do domínio de influência do ponto de interesse \mathbf{x}_I são utilizados para obter $u(\mathbf{x}_I)$. Desta forma, o valor da função $u(\mathbf{x}_I)$ para o ponto de interesse \mathbf{x}_I é dada pela Eq. 3.4, onde $R_i(\mathbf{x}_I)$ é a função de base radial, n corresponde ao número de nós no interior do domínio de influência de \mathbf{x}_I , $a_i(\mathbf{x}_I)$ é o vetor dos coeficientes não constantes de $R_i(\mathbf{x}_I)$, $p_j(\mathbf{x}_I)$ é base polinomial, m é o número de monómios da base e $b_i(\mathbf{x}_I)$ é o vetor dos coeficientes não constantes de $p_j(\mathbf{x}_I)$ [66].

$$\begin{aligned} u(\mathbf{x}_I) &= \sum_{i=1}^n R_i(\mathbf{x}_I) a_i(\mathbf{x}_I) + \sum_{j=1}^m p_j(\mathbf{x}_I) b_j(\mathbf{x}_I) \\ &= \{\mathbf{R}^T(\mathbf{x}_I), \mathbf{p}^T(\mathbf{x}_I)\} \begin{Bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{b} \end{Bmatrix} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Os vetores presentes na Eq. 3.4 podem ser definidos, de acordo com as Eq. 3.5, Eq. 3.6, Eq. 3.7 e Eq. 3.8, onde $n \gg m$ [63][66].

$$\mathbf{R}^T(\mathbf{x}_I) = \{R_1(\mathbf{x}_I), R_2(\mathbf{x}_I), \dots, R_n(\mathbf{x}_I)\} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

$$\mathbf{p}^T(\mathbf{x}_I) = \{p_1(\mathbf{x}_I), p_2(\mathbf{x}_I), \dots, p_m(\mathbf{x}_I)\} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

$$\mathbf{a}^T(\mathbf{x}_I) = \{a_1(\mathbf{x}_I), a_2(\mathbf{x}_I), \dots, a_n(\mathbf{x}_I)\} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

$$\mathbf{b}^T(\mathbf{x}_I) = \{b_1(\mathbf{x}_I), b_2(\mathbf{x}_I), \dots, b_m(\mathbf{x}_I)\} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Os métodos sem malha abordados neste trabalho utilizam a função de base radial multiquadrática (MQ-RBF), proposta inicialmente por Hardy, que é definida na **Eq. 3.9**, onde r_{Ii} representa a norma Euclidiana entre o ponto de interesse \mathbf{x}_I e o nó vizinho \mathbf{x}_i , que pode ser dada por $r_{Ii} = \sqrt{(x_I - x_i)^2 + (y_I - y_i)^2 + (z_I - z_i)^2}$ e, c e p são os parâmetros de forma da MQ-RBF. A literatura mostra que os parâmetros que conduzem aos melhores resultados são: $c = 0,0001$ e $p = 1,0001$, respetivamente [63][66].

$$R(r_{Ii}) = (r_{Ii}^2 + c^2)^p \quad (\text{Eq. 3.9})$$

Na análise 2D, estes dois parâmetros podem ser definidos através de testes numéricos como representado na **Eq. 3.10** [66].

$$\mathbf{p}^T(\mathbf{x}) = \{1, x, y, x^2, xy, y^2, \dots\} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

De modo a obter-se solução única, a equação **Eq. 3.11** deve ser incluída no sistema de equações [66].

$$\sum_{i=1}^n p_j(\mathbf{x}_I) a_i(\mathbf{x}_I) = 0, \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Assim, o sistema de equações passa a ser formado por:

$$\begin{Bmatrix} \mathbf{u}_s \\ 0 \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}_Q & \mathbf{P}_m \\ \mathbf{P}_m^T & 0 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{b} \end{Bmatrix} = \mathbf{G} \begin{Bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{b} \end{Bmatrix} \Leftrightarrow \begin{Bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{b} \end{Bmatrix} = \mathbf{G}^{-1} \begin{Bmatrix} \mathbf{u}_s \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (\text{Eq. 3.12})$$

Onde, assumindo uma base polinomial linear, \mathbf{u}_s , \mathbf{R}_Q e \mathbf{P}_m são definidas de acordo com a **Eq. 3.13**, **Eq. 3.14**, **Eq. 3.15**, respetivamente [66].

$$\mathbf{u}_s = \{u_1, u_2, \dots, u_n\}^T \quad (\text{Eq. 3.13})$$

$$\mathbf{R}_Q = \begin{bmatrix} R(r_{11})R(r_{12})\dots R(r_{1n}) \\ R(r_{21})R(r_{22})\dots R(r_{2n}) \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ R(r_{n1})R(r_{n2})\dots R(r_{nn}) \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 3.14})$$

$$\mathbf{P}_m = \begin{bmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ x_1 & x_2 & \dots & x_n \\ y_1 & y_2 & \dots & y_n \end{bmatrix}^T \quad (\text{Eq. 3.15})$$

Substituindo a **Eq. 3.12** na **Eq. 3.4** obtemos a equação representada pela **Eq. 3.16**, onde $\phi(\mathbf{x}_I)$ representa a função de forma [66].

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}_I) = \{\mathbf{R}^T(\mathbf{x}_I), \mathbf{p}^T(\mathbf{x}_I)\} \mathbf{G}^{-1} \begin{Bmatrix} \mathbf{u}_s \\ 0 \end{Bmatrix} = \{\phi(\mathbf{x}_I), \psi(\mathbf{x}_I)\} \mathbf{u}_s \quad (\text{Eq. 3.16})$$

A função $\phi(\mathbf{x}_I)$ possui a propriedade delta Kronecker, representada por δ_{ij} na **Eq. 3.17**, e a condição representada pela **Eq. 3.18** também deve ser satisfeita [66].

$$\phi_i(\mathbf{x}_I) = \delta_{ij} = \begin{cases} 1 & (i = j) \\ 0 & (i \neq j) \end{cases} \quad i, j = 1, \dots, n \quad (\text{Eq. 3.17})$$

$$\sum_{i=1}^n \phi_i(\mathbf{x}_I) = 1 \quad (\text{Eq. 3.18})$$

3.3. Mecânica dos Sólidos

3.3.1. Fundamentos

Corpos e estruturas sólidas, quando sujeitos a cargas externas, deformam e, conseqüentemente, tensões internas são geradas. Dependendo da curva tensão-deformação do material, os sólidos podem apresentar comportamentos diferentes. No caso dos materiais elásticos, a deformação provocada pela carga desaparece totalmente após a remoção total dessa carga. Contrariamente, nos materiais plásticos existe uma deformação residual que permanece após a remoção total da carga. Um material sólido pode ser considerado anisotrópico, quando a propriedade do material varia com a direção, ou pode ser considerado um material isotrópico, se essa propriedade é independente da direção considerada e, onde apenas é necessário conhecer o módulo de Young (E) e o coeficiente de Poisson (ν) [63].

Assim, o tensor simétrico de tensões de Cauchy, Λ , revela as tensões de uma configuração atual para um problema tridimensional, sendo definido através da matriz apresentada na **Eq. 3.19** [63].

$$\Lambda = \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \sigma_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 3.19})$$

Recorrendo à notação de Voigt, que expressa tensores em vetores de coluna, é possível reduzir o tensor de tensão, Λ , ao vetor de tensão, σ , conforme a **Eq. 3.20** [63].

$$\sigma = \{\sigma_{xx} \quad \sigma_{yy} \quad \sigma_{zz} \quad \tau_{xy} \quad \tau_{yz} \quad \tau_{zx}\}^T \quad (\text{Eq. 3.20})$$

Da mesma forma, também o tensor de deformação, E , pode ser representado pelo vetor de deformação ε , como na **Eq. 3.21** [63].

$$\varepsilon = \{\varepsilon_{xx} \quad \varepsilon_{yy} \quad \varepsilon_{zz} \quad \gamma_{xy} \quad \gamma_{yz} \quad \gamma_{zx}\}^T \quad (\text{Eq. 3.21})$$

Os sólidos são capazes de manifestar diferentes comportamentos, em conformidade com o tipo de material em estudo. No entanto, neste trabalho serão abordados apenas os materiais elásticos e isotrópicos.

Como descrito anteriormente, neste tipo de materiais a deformação provocada no corpo desaparece totalmente após a remoção total da carga aplicada, sendo necessário conhecer apenas duas propriedades, o módulo de Young (E) e o coeficiente de Poisson (ν). Portanto, a relação entre a tensão e a deformação do domínio sólido é dada pela **Eq.**

3.22, conhecida como Lei de Hooke, onde \mathbf{c} é a matriz constitutiva do material, dada pelo inverso da matriz de elasticidade de conformidade do material, $\mathbf{c} = \mathbf{s}^{-1}$. No caso de um material isotrópico a matriz \mathbf{s} pode ser definida de acordo com a **Eq. 3.23** [63].

$$\boldsymbol{\sigma} = \mathbf{c}\boldsymbol{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 3.22})$$

$$\mathbf{s} = \begin{bmatrix} \frac{1}{E} & -\frac{\nu}{E} & -\frac{\nu}{E} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\nu}{E} & \frac{1}{E} & -\frac{\nu}{E} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\nu}{E} & -\frac{\nu}{E} & \frac{1}{E} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G} \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 3.23})$$

Onde E é o módulo de Young, ν é o coeficiente de Poisson que descreve a taxa de deformação na direção j quando há uma força a ser aplicada na direção i , G é o módulo de distorção do material [63].

Tendo em conta o campo de deslocamentos que é constituído por $\mathbf{u} = \{u, v, w\}$, é possível adquirir as componentes de deformação através das derivadas do campo de deslocamento, conforme as seguintes equações:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{xx} &= \frac{\partial u}{\partial x} ; \quad \varepsilon_{yy} = \frac{\partial v}{\partial y} ; \quad \varepsilon_{zz} = \frac{\partial w}{\partial z} \\ \gamma_{xy} &= \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} ; \quad \gamma_{yz} = \frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} ; \quad \gamma_{zx} = \frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.24})$$

Deste modo, o vetor de deformação pode ser estabelecido pela associação de um operador diferencial parcial \mathbf{L} com o campo deslocamentos \mathbf{u} ,

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{L}\mathbf{u} \quad (\text{Eq. 3.25})$$

onde \mathbf{L} é dado por,

$$\mathbf{L} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial y} & 0 & \frac{\partial}{\partial z} \\ 0 & \frac{\partial}{\partial y} & 0 & \frac{\partial}{\partial x} & \frac{\partial}{\partial z} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial z} & 0 & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} \end{bmatrix}^T \quad (\text{Eq. 3.26})$$

3.3.2. Forma Fraca de Galerkin

As equações de forma forte permitem obter a solução exata de um dado problema. No entanto, obter a solução exata é uma tarefa extremamente complexa. Desta forma, são utilizadas as equações de forma fraca, que exigem uma consistência mais fraca nas funções de aproximação. Estas últimas equações permitem a produção de equações algébricas estáveis e fornecem um sistema de equações discretizado, que origina resultados aproximados [63].

Considerando um sólido com um domínio $\Omega \in \mathbb{R}^2$ restringido por Γ , como na **Figura 3.6**, onde é aplicada uma força externa \bar{t} , as condições de fronteira Γ podem ser de dois tipos: condições de fronteira naturais Γ_t ou condições de fronteira essenciais Γ_u [63].

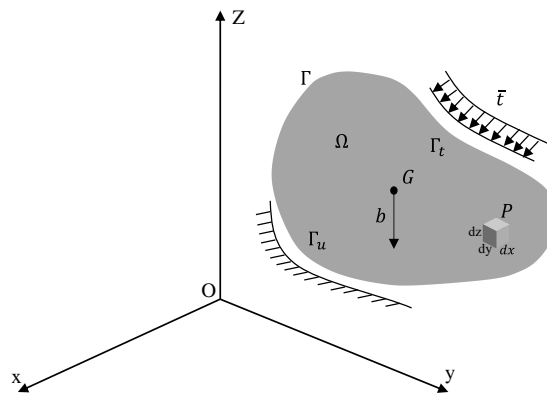


Figura 3.6- Sólido, com domínio Ω , submetido a uma força externa \bar{t} . Adaptado de [63].

A forma fraca de Galerkin é constituída pelo princípio da conservação da energia. Entre todas as configurações de deslocamento possíveis, a configuração correspondente da solução real é aquela que minimiza o funcional Lagrangian L , conforme a **Eq. 3.27**, onde T é a energia cinética, U é a energia de deformação e W_f é o trabalho produzido pelas forças externas [63].

$$L = T - U + W_f \quad (\text{Eq. 3.27})$$

A energia cinética é definida por,

$$T = \frac{1}{2} \int_{\Omega} \rho \dot{\mathbf{u}}^T \dot{\mathbf{u}} d\Omega \quad (\text{Eq. 3.28})$$

sendo $\dot{\mathbf{u}}$ a primeira derivada de deslocamento em relação ao tempo, ou seja, corresponde à velocidade, ρ a densidade de massa sólida e Ω representa o volume do sólido. Para materiais elásticos, a energia de deformação, pode ser definida como,

$$U = \frac{1}{2} \int_{\Omega} \boldsymbol{\varepsilon}^T \boldsymbol{\sigma} d\Omega \quad (\text{Eq. 3.29})$$

O trabalho produzido pelas forças externas pode ser escrito na forma,

$$W_f = \int_{\Omega} \mathbf{u}^T \mathbf{b} d\Omega + \int_{\Gamma_t} \mathbf{u}^T \bar{\mathbf{t}} d\Gamma_t \quad (\text{Eq. 3.30})$$

sendo que \mathbf{u} representa o deslocamento, \mathbf{b} as forças do corpo e Γ_t o limite de tração onde as forças externas $\bar{\mathbf{t}}$ são aplicadas. Por substituição, a função de Lagrangian, L , pode ser reescrita de acordo com a Eq. 3.31, podendo ser minimizada de acordo com a Eq. 3.32 [63].

$$L = \frac{1}{2} \int_{\Omega} \rho \dot{\mathbf{u}}^T \dot{\mathbf{u}} d\Omega - \frac{1}{2} \int_{\Omega} \boldsymbol{\varepsilon}^T \boldsymbol{\sigma} d\Omega + \int_{\Omega} \mathbf{u}^T \mathbf{b} d\Omega + \int_{\Gamma_t} \mathbf{u}^T \bar{\mathbf{t}} d\Gamma_t \quad (\text{Eq. 3.31})$$

$$\delta \int_{t_1}^{t_2} \left[\frac{1}{2} \int_{\Omega} \rho \dot{\mathbf{u}}^T \dot{\mathbf{u}} d\Omega - \frac{1}{2} \int_{\Omega} \boldsymbol{\varepsilon}^T \boldsymbol{\sigma} d\Omega + \int_{\Omega} \mathbf{u}^T \mathbf{b} d\Omega + \int_{\Gamma_t} \mathbf{u}^T \bar{\mathbf{t}} d\Gamma_t \right] dt = 0 \quad (\text{Eq. 3.32})$$

Desenvolvendo a expressão [63] e considerado a relação tensão-deformação, $\boldsymbol{\sigma} = \mathbf{c}\boldsymbol{\varepsilon}$, e a relação de deformação-deslocamento, $\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{L}\mathbf{u}$, a Eq. 3.32 pode ser reescrita como:

$$\int_{\Omega} (\delta \mathbf{L}\mathbf{u})^T \mathbf{c}(\mathbf{L}\mathbf{u}) d\Omega - \int_{\Omega} \delta \mathbf{u}^T \mathbf{b} d\Omega + \int_{\Omega} \rho (\delta \mathbf{u}^T \ddot{\mathbf{u}}) d\Omega - \int_{\Gamma_t} \delta \mathbf{u}^T \bar{\mathbf{t}} d\Gamma_t = 0 \quad (\text{Eq. 3.33})$$

A Eq. 3.33 representa a forma fraca genérica de Galerkin para problemas da mecânica dos sólidos. Em problemas estáticos, o quarto termo desta equação é eliminado [63].

3.3.3. Sistema de Equações Discreto

A partir do princípio do trabalho virtual e utilizando as funções de forma sem malha, definidas como funções de teste, são obtidas as equações discretas para métodos sem malha. Desta forma, os deslocamentos virtuais, ou funções de teste, podem ser definidas de acordo com a **Eq. 3.34** [63].

$$\begin{aligned} \delta u(\mathbf{x}_I) &= \delta \mathbf{u}_I = \mathbf{I} \begin{Bmatrix} \phi_I \\ \phi_I \end{Bmatrix} \mathbf{u}_s \\ &= \begin{bmatrix} \varphi_1(\mathbf{x}_I) & 0 & 0 & \dots & \varphi_n(\mathbf{x}_I) & 0 & 0 \\ 0 & \varphi_1(\mathbf{x}_I) & 0 & \dots & 0 & \varphi_n(\mathbf{x}_I) & 0 \\ 0 & 0 & \varphi_1(\mathbf{x}_I) & \dots & 0 & 0 & \varphi_n(\mathbf{x}_I) \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \delta u_1 \\ \delta v_1 \\ \delta w_1 \\ \dots \\ \delta u_n \\ \delta v_n \\ \delta w_n \end{Bmatrix} \\ &= \mathbf{H}_I \delta \mathbf{u}_s \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.34})$$

Onde \mathbf{I} é a matriz de identidade 3×3 , $\mathbf{u}_I = \{u_I, v_I, w_I\}$ corresponde ao vetor dos parâmetros nodais dos n nós que pertencem ao domínio de influência do ponto de interesse \mathbf{x}_I e $\varphi_n(\mathbf{x}_I)$ corresponde à função de aproximação ou interpolação do método sem malha [63].

Assim, o primeiro termo da **Eq. 3.33** pode ser escrito da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} (\delta \mathbf{L} \mathbf{u})^T \mathbf{c} (\mathbf{L} \mathbf{u}) d\Omega &= \int_{\Omega} (\mathbf{L} \mathbf{H}_I \delta \mathbf{u}_s)^T \mathbf{c} (\mathbf{L} \mathbf{H}_I \delta \mathbf{u}_s) d\Omega \\ &= \int_{\Omega} \delta \mathbf{u}_s^T \mathbf{B}_I^T \mathbf{c} \mathbf{B}_I \mathbf{u}_s d\Omega \\ &= \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{B}_I^T \mathbf{c} \mathbf{B}_I d\Omega \mathbf{u} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.35})$$

onde \mathbf{B}_I corresponde à matriz de deformação resultante para os n nós que integram o domínio de influência do ponto de interesse \mathbf{x}_I e, pode ser definida para o nó i como:

$$\mathbf{B}_I = \begin{bmatrix} \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial x} & 0 & 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial y} & 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial z} \\ 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial y} & 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial x} & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial z} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial z} & 0 & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial y} & \frac{\partial \varphi_i(\mathbf{x}_I)}{\partial x} \end{bmatrix}^T \quad (\text{Eq. 3.36})$$

Os restantes termos da **Eq. 3.33** podem ser simplificados de acordo com as equações seguintes:

$$\int_{\Omega} \delta \mathbf{u}^T \mathbf{b} \, d\Omega = \int_{\Omega} (\mathbf{H}_I \delta \mathbf{u}_s)^T \mathbf{b} \, d\Omega = \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{H}_I^T \mathbf{b} \, d\Omega \quad (\text{Eq. 3.37})$$

$$\int_{\Omega} \rho (\delta \mathbf{u}^T \ddot{\mathbf{u}}) \, d\Omega = \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{H}_I^T \rho \mathbf{H}_I \, d\Omega \ddot{\mathbf{u}} \quad (\text{Eq. 3.38})$$

$$\int_{\Omega} \rho (\delta \mathbf{u}^T \ddot{\mathbf{u}}) \, d\Omega = \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{H}_I^T \rho \mathbf{H}_I \, d\Omega \ddot{\mathbf{u}} \quad (\text{Eq. 3.39})$$

Assim, substituindo estas expressões na **Eq. 3.33**, obtém-se:

$$\begin{aligned} \delta L &= \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{B}_I^T \mathbf{c} \mathbf{B}_I \, d\Omega \mathbf{u}_s - \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{H}_I^T \mathbf{b} \, d\Omega \\ &\quad + \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Omega} \mathbf{H}_I^T \rho \mathbf{H}_I \, d\Omega \ddot{\mathbf{u}} \\ &\quad - \delta \mathbf{u}_s^T \int_{\Gamma_t} \mathbf{H}_I^T \bar{\mathbf{t}} \, d\Gamma_t = \\ &= \delta \mathbf{u}_s^T \mathbf{K} \mathbf{u} - \delta \mathbf{u}_s^T \mathbf{f}_b + \delta \mathbf{u}_s^T \mathbf{M} \ddot{\mathbf{u}} - \delta \mathbf{u}_s^T \mathbf{f}_t = 0 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.40})$$

Assim, rearranjando a equação, é determinada a equação de equilíbrio:

$$\mathbf{K} \mathbf{u} + \mathbf{M} \ddot{\mathbf{u}} = \mathbf{f}_b + \mathbf{f}_t \quad (\text{Eq. 3.41})$$

Onde \mathbf{K} a matriz de rigidez global, \mathbf{u} o campo de deslocamentos, \mathbf{M} a matriz mássica, \mathbf{f}_b o vetor de peso do corpo e \mathbf{f}_t o vetor de forças externas. Considerando $\mathbf{f} = \mathbf{f}_b + \mathbf{f}_t$, é possível obter, através da **Eq. 3.41**, o campo de deslocamentos \mathbf{u} [63].

Com base na **Eq. 3.41** é possível determinar numerosas variáveis. A deformação $\boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{x}_I)$, num ponto de interesse $\mathbf{x}_I \in \Omega$, pode ser obtida com base na **Eq. 3.25**. Depois, recorrendo à Lei de Hooke, **Eq. 3.22** pode ser obtido o campo das tensões, $\boldsymbol{\sigma}(\mathbf{x}_I)$.

Com base nos campos das tensões e deformações é possível determinar a densidade de energia de deformação (SED) para cada ponto de interesse \mathbf{x}_I através da **Eq. 3.42** [63].

$$U(\mathbf{x}_I) = \frac{1}{2} \int_{\Omega_I} \boldsymbol{\sigma}(\mathbf{x}_I)^T \boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{x}_I) \, d\Omega_I \quad (\text{Eq. 3.42})$$

3.3.3.1. Equações da Dinâmica

As equações de equilíbrio que reagem a uma resposta dinâmica linear podem ser apresentadas conforme a **Eq. 3.41**, [63]. Assim, com o objetivo de obter deslocamentos modais foi efetuada a seguinte transformação:

$$\mathbf{u}(t) = \Phi \mathbf{x}(t) \quad (\text{Eq. 3.43})$$

sendo Φ a matriz quadrada $m \times m$, que contém m vetores espaciais independentes da variável tempo representada por t , $\mathbf{x}(t)$ corresponde a um vetor que depende do tempo e, para o caso 2D: $m = 2N$ e no caso 3D: $m = 3N$, onde N é o número total de nós no domínio do problema. Por fim, $\mathbf{u}(t)$ é designado por deslocamentos generalizados e a sua solução pode ser apresentada na seguinte forma,

$$\mathbf{u}(t) = \Phi \sin(\omega(t - t_0)) \quad (\text{Eq. 3.44})$$

onde Φ representa o vetor de ordem m , t é a variável tempo, com o tempo inicial definido como t_0 e, ω corresponde ao vetor de frequência de vibração. Ao substituir a **Eq. 3.44** na **Eq. 3.41** obtém-se o valor próprio generalizado, a partir do qual ϕ e ω devem ser definidos,

$$K\phi = \omega^2 M\phi \quad (\text{Eq. 3.45})$$

A partir da **Eq. 3.45** são produzidas m soluções próprias:

$$\begin{cases} K\phi_1 = \omega_1^2 M\phi_1 \\ K\phi_2 = \omega_2^2 M\phi_2 \\ \dots \\ K\phi_m = \omega_m^2 M\phi_m \end{cases} \quad (\text{Eq. 3.46})$$

sendo ϕ_i o vetor de forma modal e ω_i é a frequência de vibração correspondente. Assim, na **Eq. 3.47** é estabelecida uma matriz Φ , cujas colunas são os vetores próprios ϕ_i , e na **Eq. 3.48** está representada a matriz diagonal Ω , que armazena os valores próprios ω_i [63].

$$\Phi = [\phi_1 \quad \phi_2 \quad \dots \quad \phi_m] \quad (\text{Eq. 3.47})$$

$$\Omega = \begin{bmatrix} \omega_1^2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \omega_2^2 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & \omega_m^2 \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 3.48})$$

As m soluções correspondentes à **Eq. 3.48** podem ser escritas:

$$\mathbf{K}\Phi = \mathbf{M}\Phi\Omega \quad (\text{Eq. 3.49})$$

No entanto, é essencial que as funções espaciais satisfaçam as seguintes condições de ortogonalidade em relação à matriz de rigidez, **Eq. 3.50** e, em relação à matriz de massa, **Eq. 3.51** [63].

$$\Phi^T \mathbf{K} \Phi = \Omega \quad (\text{Eq. 3.50})$$

$$\Phi^T \mathbf{M} \Phi = \mathbf{I} \quad (\text{Eq. 3.51})$$

Posteriormente, ao substituir na **Eq. 3.41** a **Eq. 3.43** e as respectivas derivadas de tempo, pré-multiplica-se por Φ^T e adquire-se a equação de equilíbrio correspondente ao deslocamento modal generalizado, mencionado na **Eq. 3.52** [63].

$$\ddot{\mathbf{x}}(t) + \Omega \mathbf{x}(t) = \Phi^T \mathbf{F}(t) \quad (\text{Eq. 3.52})$$

Assim, são adquiridas as condições iniciais em $\mathbf{x}(t)$ utilizando a **Eq. 3.43** e considerando a M-ortonormalidade de Φ^T no tempo $t = 0$ obtém-se,

$$\begin{cases} x_0 = \Phi^T M \mathbf{u}_0 \\ \dot{x}_0 = \Phi^T M \dot{\mathbf{u}}_0 \end{cases} \quad (\text{Eq. 3.53})$$

A **Eq. 3.52** pode ser apresentada como m equações individuais de forma,

$$\begin{cases} \ddot{x}_i(t) + \omega_i^2 x_i(t) = f_i(t) \\ f_i(t) = \Phi_i^T \mathbf{F}(t) \end{cases} \quad (\text{Eq. 3.54})$$

Com as seguintes condições iniciais:

$$\begin{cases} x_i^{t=0} = \Phi_i^T M \mathbf{u}_0 \\ \dot{x}_i^{t=0} = \Phi_i^T M \dot{\mathbf{u}}_0 \end{cases} \quad (\text{Eq. 3.55})$$

No entanto, para que a resposta fique completa, deve ser calculada a solução para todas as m equações na **Eq. 3.54** e assim, é obtido o deslocamento do ponto nodal através da sobreposição da resposta em cada modo:

$$\mathbf{u}(t) = \sum_{i=1}^m \phi_i x_i(t) \quad (\text{Eq. 3.56})$$

Portanto, conclui-se que a análise da resposta exige, em primeiro lugar, a solução dos valores e vetores próprios do problema, **Eq. 3.49**, posteriormente, requer a solução das equações de equilíbrio desacopladas na **Eq. 3.54** e, finalmente, a sobreposição da resposta em cada vetor próprio como representado na **Eq. 3.56** [63].

CAPÍTULO 4 – ESTADO DA ARTE

4. Estado da Arte

Nas últimas décadas diversos investigadores tentaram relatar a micromecânica dos glóbulos vermelhos e estes estudos produziram vários modelos matemáticos e numéricos [67].

Os glóbulos vermelhos apresentam grande importância devido à sua deformabilidade, revelando grandes desafios de simulação específicos [68]. Para além das suas propriedades estruturais que afetam o fluxo sanguíneo durante a microcirculação, as hemácias também desempenham um papel muito importante em diversos processos biológicos. A deformabilidade dos glóbulos vermelhos varia das hemácias mais jovens às mais envelhecidas em condições fisiológicas e podem sofrer alterações em condições patológicas, como infeção parasitária, diabetes e defeitos genéticos. Assim, é necessária uma compreensão da biomecânica dos glóbulos vermelhos, de forma a conduzir a um entendimento mais completo destas patologias [67].

Nos últimos anos, o método de volumes finitos (FVM) tem sido muito utilizado, podendo ser formulado a partir do FDM (método de diferenças finitas) ou do FEM. A evolução da moderna dinâmica de fluidos computacional (CFD) teve origem com o aparecimento do computador digital no início dos anos 1950. O FDM e o FEM são ferramentas comuns utilizadas na solução de equações diferenciais parciais [69].

Em 1910, na Royal Society of London, Richardson publicou um artigo referente à primeira solução FDM para a análise de tensão de uma barragem de alvenaria. O primeiro trabalho recorrendo ao FEM foi publicado no *Aeronautical Science Journal* por Turner, Clough, Martin e Topp para aplicações em análise de tensão de aeronaves, em 1956. Desde esse momento, ambos os métodos foram desenvolvidos em diversas áreas, tais como a dinâmica de fluidos e transferência de calor [69].

Nos últimos anos, o FVM tem-se tornado cada vez mais popular devido à sua estrutura simples, sendo as suas formulações tanto relacionadas com o FDM como com o FEM. Da mesma forma, os métodos de variação dependentes do campo de fluxo (FDV) também apresentam relações entre FDM e FEM [69].

Assim, historicamente os FDMs são os que mais têm sobressaído na comunidade CFD, devido à sua simplicidade nos cálculos e formulações. Por outro lado, os FEMs são conhecidos por possuírem formulações mais complicadas e por serem mais demorados

nos cálculos. No entanto, estes fatores já não são relevantes nos desenvolvimentos mais recentes em aplicações FEM [69].

Atualmente, a simulação numérica desempenha um papel de elevada importância em muitos ramos da ciência, em particular na mecânica, sendo a biomecânica computacional uma das áreas que exige a simulação numérica de processos muito complexos [63]. Este tipo de simulação aparenta ser, cada vez mais, uma ferramenta de extrema importância na resolução de problemas associados aos glóbulos vermelhos [70]. Assim, o FEM é uma técnica numérica capaz de fornecer soluções aproximadas para problemas da física e da engenharia [71]. Este método é uma ferramenta computacional muito poderosa, sendo por isso uma excelente ferramenta de investigação [72]. Alternativamente, os métodos sem malha passaram a ter especial interesse, nos últimos anos, na resolução numérica de equações diferenciais parciais, especialmente na área da engenharia, tendo surgido com o objetivo de excluir parte das dificuldades associadas à dependência de uma malha para construir a aproximação [63][73].

Tanto os modelos experimentais, como os modelos analíticos são cada vez mais utilizados na mecanobiologia permitindo obter uma compreensão mais profunda das respostas celulares a fatores mecânicos [71].

Os métodos sem malha também são modelos discretos, tendo sido apresentados como alternativa aos métodos tradicionais [74].

Este capítulo tem como objetivo apresentar os trabalhos numéricos mais relevantes realizados na área da biomecânica, com principal foco nos estudos que analisam os glóbulos vermelhos. Deste modo, este capítulo foi dividido de forma a separar os estudos realizados com base nos métodos dos elementos finitos dos métodos sem malha.

4.1.FEM

4.1.1. Origem do FEM

O método dos elementos finitos é um método numérico utilizado na obtenção de soluções aproximadas de problemas complexos de engenharia. O método dos elementos finitos, que é utilizado atualmente, foi inicialmente apresentado por Turner, Clough, Martin e Topp em 1956 na análise de estruturas de aeronaves. No entanto, apenas em 1960, o método foi batizado por Clough. Só passado uma década após ser apresentado

por Turner *et al.* é que, a potencialidade deste método para resolver diferentes tipos de ciência aplicada e problemas de engenharia foi reconhecida [75].

Em 1851, Schellback discretizou uma superfície de área mínima limitada por uma curva fechada especificada em vários triângulos e utilizou uma expressão de diferença finita para encontrar a área discretizada total [76]. Em 1943, Courant revelou um método capaz de determinar a rigidez torsional de um eixo oco, repartindo a seção transversal em vários triângulos e recorrendo a uma variação linear da função tensão sobre cada triângulo [77]. Para alguns, este trabalho é considerado como a origem do método dos elementos finitos atual [75].

Desde a década de 1950 que os engenheiros da indústria aeronáutica têm-se empenhado no desenvolvimento de métodos relacionados para a previsão de tensões induzidas nas asas de aeronaves [75]. Em 1956, Turner *et al.* [78] apresentou um método com a capacidade de modelar a pele da asa utilizando triângulos de três polos. Praticamente ao mesmo tempo, Argyris e Kelsey apresentaram vários artigos que compreendiam os procedimentos de matriz, que abrangiam algumas das ideias de elementos finitos, para a solução de problemas de análise estrutural [75]. O estudo de Turner *et al.* [78] é conhecido como uma das principais contribuições para o desenvolvimento do método dos elementos finitos.

Com o passar dos anos, a técnica dos elementos finitos foi tão bem concretizada que, atualmente é considerada um dos melhores métodos para a resolução de uma grande variedade de problemas práticos de maneira eficiente. Além do mais, este método tornou-se uma área de investigação ativa não só em engenharia, mas também em matemática aplicada [75].

4.1.2. FEM e a Biomecânica

Em 1972, a técnica computacional de análise de tensões estruturais avançada, conhecida por FEM, foi introduzida na biomecânica ortopédica com o objetivo de analisar o comportamento mecânico em ossos humanos [79][60]. Desde essa época, este método tem sido cada vez mais utilizado em análises de tensões de ossos e de estruturas de próteses ósseas, assim como na análise de dispositivos de fixação de fraturas e em diversos tecidos, para além do osso [79].

Atualmente, a análise de elementos finitos tem sido muito utilizada na investigação, relacionada com a tensão de ossos e procedimentos de remodelação óssea,

com o objetivo de testar e otimizar designs de articulações artificiais e dispositivos de fixação de fraturas, assim como para estudar o comportamento mecânico dos tecidos, tais como a cartilagem articular e os discos intervertebrais [79].

A análise de tensão dos ossos utilizando o método dos elementos finitos é o mecanismo que permite entender a remodelação óssea, a avaliação do risco de fratura e o planejamento de fixação de fratura [60]. Em 1986, Basu *et al.* [80] analisou a tensão no fêmur humano adulto, tendo obtido a sua geometria a partir da tomografia computadorizada (CT). Basu *et al.* verificaram que, como consequência da distribuição irregular de tensões na região das articulações dos ossos era mais provável ocorrerem fraturas nessa região, em caso de queda de um humano por impacto. Em 1976, Chand *et al.* analisaram a tensão de contacto entre os ossos das articulações do joelho humano (fêmur e tíbia) utilizando o software FEM NASTRAN [60]. Em 2010, Anderson *et al.* [81] estudaram as tensões da cartilagem na articulação da anca e declararam que o material do osso era rígido. Em 2011, Ural *et al.* [82] estudaram o efeito da taxa de deformação no osso cortical recorrendo ao método dos elementos finitos.

Em 2007, Bessho *et al.* [83] estudou a força do fêmur proximal e a deformação da superfície recorrendo ao FEM e modelos 3D construídos a partir de CT. Em 2013, Zysset *et al.* determinaram a resistência do osso nos três locais principais de fratura por osteoporose [60]. Em 2013, Basafa *et al.* [84] analisaram a rigidez e força para o osso femoral utilizando FEM. Em 2014, Brown *et al.* determinaram as propriedades mecânicas do osso, tendo em consideração a diferente fração de volume em diferentes níveis do osso [60]. Em 2014, Sherekar *et al.* [85] estudaram a resposta da clavícula humana durante a colisão. Nesse mesmo ano, Muckhof e Zadpoor determinaram a carga de fratura em fêmures proximais [60].

Relativamente à fixação de fraturas, são utilizados dois tipos para fixar a fratura no osso: a fixação esquelética externa e a fixação interna de fraturas [60]. Em 1977, Simon *et al.* [86] estudaram a forma da fixação interna utilizando FEM, para uma placa de liga de titânio.

O FEM e a mecanobiologia podem ser utilizados em simultâneo, de forma a encontrar parâmetros ideais que conduzem ao desempenho do scaffold ósseo. A técnica de micro-CT é utilizada na engenharia de tecidos para caracterização de scaffolds, monitorização da mineralização tridimensional ao longo do tempo num biorreator de perfusão, avaliação da integração do scaffold/tecido, e/ou formação do tecido e

degradação do scaffold [71]. Lacroix *et al.* [87] estabeleceram modelos de elementos finitos de vários scaffolds ósseos sustentados em fosfato de cálcio, com o objetivo de calcular a transferência de carga da estrutura do biomaterial para as entidades biológicas. Sandino *et al.* [88] adotou a mesma técnica de imagem para construir um modelo de um scaffold para engenharia de tecido ósseo e, através do método dos elementos finitos estudou o comportamento dos estímulos mecânicos no interior de alguns scaffolds à base de fosfato de cálcio, como a tensão e a deformação.

Assim, o método dos elementos finitos foi desenvolvido como uma ferramenta eficaz na biomecânica óssea [60].

4.1.3. FEM e as Células Biológicas

O campo de estimulação de células biológicas tem uma vasta série de aplicações, envolvendo transfecção de genes, eletroquimioterapia de tumores e desfibrilação cardíaca. Muita da informação sobre como as células respondem a campos externos é sustentada pela teoria derivada de uma única célula isolada. Devido aos efeitos desordenados do tamanho, posição e propriedades da célula, a distribuição do potencial elétrico de várias células só pode ser estudada recorrendo aos métodos numéricos e às simulações computacionais [89].

Dos métodos numéricos atualmente estudados para modelar a estimulação de campo de células biológicas, o método de diferenças finitas (FDM) é que apresenta maior implementação. No entanto, tanto FEM como o FVM são abordagens mais flexíveis para simulações de campo de células. Assim, o FEM separa os espaços intracelulares dos espaços extracelulares, convertendo-os em elementos simples, como triângulos em duas dimensões espaciais (2D) e tetraedros em três dimensões espaciais (3D). Desta forma, com o alinhamento da membrana das células, o FEM usualmente produz uma precisão superior à do FDM [89].

O método dos elementos finitos é muito utilizado quando existe dificuldade na realização de estudos experimentais, com o objetivo de simular os efeitos de carga mecânica nas estruturas [90]. A mecanotransdução é uma técnica na qual as células vivas sentem e respondem às forças, sendo essencial para o bom funcionamento das células, tecidos e órgãos. De forma a avançar no conhecimento da mecanotransdução é utilizado o microscópio de força atômica (AFM) com o propósito de quantificar as propriedades mecânicas de células vivas [91].

Ganesh *et al.* [90] apresentam um estudo da mecanotransdução, bem como um estudo de vias de sinalização biológica. As análises de elementos finitos junto com metodologias de interação fluido-estrutura são usadas para calcular a deformação mecânica. Este tipo de análise envolve uma abordagem multiescala espacial, onde são utilizados modelos de macroestrutura óssea e de microestrutura na escala de comprimento celular. A modelação *in silico* do osso, assim como as suas várias características celulares e morfológicas, aparenta ser um método complexo, mas fundamental, para a compreensão de respostas mecânicas, como tensões mecânicas, velocidades de fluxo de fluido e tensões de corte.

Em 2010, Slomka *et al.* [92] apresenta um método de modelação de elemento finito específico de célula tridimensional fundamentada em microscopia confocal, com o intuito de simular ensaios de mecânica celular envolvendo grandes deformações de células.

Seguidamente, Zielinski *et al.* [93] desenvolveram um estudo, onde utilizam técnicas computacionais de elementos finitos, com o propósito de investigar como as alterações em diversas propriedades biomecânicas e morfológicas influenciam o campo de tensão de tração medido pela técnica de microscopia de força de tração 2D e 3D (TFM). Para isso, fizeram variar independentemente a rigidez celular e a densidade de energia de adesão da célula à matriz extracelular, e realizaram uma análise de sensibilidade para determinar quais os parâmetros que contribuíam para a tensão de tração máxima medida.

Em 2014, Dong *et al.* [94] propuseram um modelo de tumor 3D recorrendo ao método dos elementos finitos, com o objetivo de simular o crescimento e a divisão das células, descrevendo a proliferação celular através de uma energia total efetiva, que varia com a área de superfície e com o volume das células.

Continuamente, Dong *et al.* [95] determinaram um modelo de célula 3D baseado no método dos elementos finitos não lineares e simularam o crescimento do tumor avascular. Com este método é possível modelar tanto a forma celular detalhada, como os limites do tumor. Os resultados numéricos mostraram que tanto este modelo FEM, como os algoritmos relacionados são adequados para prever o crescimento e a divisão celular em 3D, fornecendo mais informações relativamente ao estudo da interação celular. No entanto, este projeto apenas simula o crescimento e a divisão das células, sem ter em consideração outras condições, como oxigénio e nutrientes.

Em 2016, Saeed *et al.* [96] apresentam modelos 3D de elementos finitos de células estaminais mesenquimais únicas (MSCs), produzidos a partir de imagens óticas obtidas por microscopia ótica de contraste de fase, sendo utilizados para quantificar as respostas estruturais destas células a cargas mecânicas aplicadas externamente.

Em 2017, Cinelli *et al.* [97] propuseram uma nova análise para modelar a interdependência de fenômenos elétricos e mecânicos em células nervosas, utilizando equivalências eletrotérmicas em análise de elementos finitos para que as ferramentas termomecânicas existentes possam ser aplicadas.

Em 2018, Liu *et al.* [91] propuseram um modelo baseado no método de elementos finitos viscoelásticos, com o intuito de simular a resposta da força de células vivas, durante a medição com o AFM, tendo em consideração a elasticidade e a viscoelasticidade da célula.

Mais recentemente em 2019, Shamooun *et al.* [98] exploraram qual a ligação entre a eletrodeformação e a eletroporação das células, utilizando o método de elementos finitos 3D para simular a eletrodeformação dependente do tempo e a eletroporação de uma única célula e de um conjunto de três células.

4.1.4. FEM e os Eritrócitos

A distribuição dos glóbulos vermelhos nos capilares alveolares, de um modo geral, não é uniforme. Assim, torna-se essencial determinar os efeitos da distribuição dos glóbulos vermelhos no transporte pulmonar difusivo de gases. Para isso, pode-se recorrer a um modelo capilar geométrico bidimensional contendo um número variável de glóbulos vermelhos para calcular a captação de CO [99]. Em 1999, Hsia *et al.* [99] calcularam através do método dos elementos finitos a captação difusiva de CO no pulmão (DL_{CO}) e a capacidade de difusão de membrana (Dm_{CO}). Os resultados indicaram que a distribuição de glóbulos vermelhos num hematócrito fixo interfere muito a captação capilar de CO. Descobriram que tanto a Dm_{CO} como a DL_{CO} são sensíveis às alterações de espaçamento dos glóbulos vermelhos dentro do capilar, bem como a alterações na forma dos glóbulos vermelhos. No caso de uma distribuição não uniforme aleatória de glóbulos vermelhos dentro de um único segmento capilar poderá reduzir a captação difusiva de CO em até 30%.

Em 1988, Sugihara-Seki *et al.* [100] analisaram o comportamento reológico de fluxos assimétricos de hemácias em vasos estreitos, com base num modelo numérico

bidimensional. O movimento do fluido em suspensão é analisado com base no método dos elementos finitos aplicado à equação de Stokes.

O avanço nas estratégias de modelação e nas metodologias computacionais em função do sangue aparenta ser o componente chave para a compreensão de doenças do sangue e no desenvolvimento de novas terapias e métodos de prognóstico [101].

Em 2007, Secomb *et al.* [102] apresentam um método para simular o movimento e a deformação dos glóbulos vermelhos de mamíferos em microvasos, com base no conhecimento das características mecânicas dos glóbulos vermelhos, onde o movimento e a deformação da célula, assim como o movimento do fluido circundante, são determinados utilizando um método numérico de elementos finitos.

Mais recentemente em 2016, Laadhari *et al.* [101] apresentam uma simulação numérica de um glóbulo vermelho isolado, nomeadamente das membranas fosfolipídicas. Para isso, propuseram uma aproximação adaptativa de elementos finitos Euleriana, simulando as formas de equilíbrio que minimizam a energia de flexão elástica sob restrições de volume fixo e área de superfície.

4.2.Métodos sem Malha

4.2.1. Origem dos Métodos sem Malha

Os métodos sem malha foram apresentados como alternativa aos métodos tradicionais como o método de elementos finitos, assim como o método de volume finito e das diferenças finitas. Diversos métodos sem malha alcançaram um notável progresso nos últimos anos nas áreas de engenharia, como mecânica de sólidos, problemas de deformação, análise estrutural, transferência de calor, análise de fluxo de fluido, entre outras [103].

Um dos primeiros métodos sem malha, que surgiu, foi o “smoothed particle hydrodynamics” (SPH) de Lucy, Gingold e Monaghan, tendo como objetivo a resolução de problemas de astrofísica e, posteriormente, de dinâmica de fluidos. Libersky *et al.* foram os primeiros a aplicar o SPH em mecânica de sólidos [73]. Em 2004, Zhang e Batra utilizaram o método SPH sem malha com o objetivo de investigar o problema de condução de calor 2D, acabando por concluir que o SPH é mais preciso do que o FDM clássico [103].

Em 1994, foi desenvolvido o “Element Free Galerkin Method” (EFGM), sendo um dos primeiros métodos sem malha a utilizar uma formulação fraca local. Passado um ano, foi desenvolvido o “Reproducing Kernel Particle Method” (RKPM) [73]. Outra categoria de métodos sem malha é designada por métodos baseados em formas fracas locais, sendo o “Meshless Local Petrov-Galerkin” (MLPG) o mais popular [73].

Em 2010, Rong-Jun e Hong-Xia aplicaram o RKPM a problemas complexos de condução de calor em estado estacionário 3D. Em 2014, Xie e Wang estudaram o sistema hidromecânico acoplado com recurso ao RKPM, obtendo resultados muito promissores [103].

Em 2010, Chen *et al.* aplicaram o RPIM com o propósito de resolver problemas de campo de temperatura estável 2D. Em 2014, Sarabadan *et al.* utilizaram o RPIM local (LRPI) para determinar a equação de Maxwell dependente do tempo, demonstrando que esta abordagem origina resultados mais aceitáveis em comparação com o FDM clássico [103].

4.2.2. Métodos sem Malha e a Biomecânica

Os métodos sem malha possuem diversas vantagens quando comparados com o FEM, permitindo trabalhar com as grandes distorções de materiais macios, como músculos, órgãos internos, pele, entre outros, ou permitindo simular o fluxo do fluido como hemodinâmica, deglutição, respiração, entre outros [63][104]. No entanto, a precisão e suavidade dos campos de tensão conseguidos com métodos sem malha também são muito úteis na previsão do processo de remodelação de tecidos biológicos e na rutura de tais biomateriais [63].

O “Natural Element Method” (NEM) foi utilizado no estudo de problemas biomecânicos considerando grandes deformações, mais especificamente para estudar o ligamento colateral lateral humano e a articulação do joelho humano, revelando vantagens quando comparado com o FEM [63]. Mais recentemente, EFGM foi utilizado para simular a resposta do tecido cerebral. Os resultados mostraram a precisão do EFGM para trabalhar com biomateriais hiperelásticos não lineares altamente exigentes [104].

Liew *et al.* [105] desenvolveram um dos primeiros trabalhos sobre estruturas ósseas utilizando os métodos sem malha. Outros investigadores utilizaram os métodos sem malha para analisar o tecido ósseo. Mais recentemente, Belinha *et al.* [63] desenvolveram um novo algoritmo de remodelação do tecido ósseo recorrendo à precisão

do método sem malha. Primeiro, a procedimento de remodelação foi utilizado para análise em microescala e, mais tarde, para a análise em macroescala de estruturas ósseas completas, como o osso calcâneo, o osso do fêmur, o osso da mandíbula e o osso maxilar [104].

Apesar do NNRPIM ser um método sem malha relativamente recente, já foi aplicado a muitos campos da mecânica computacional, tais como a análise estática de placas isotrópicas e ortotrópicas, a análise de placas de material com gradiente funcional, entre outras. O NNRPIM também foi experimentado em aplicações mais exigentes, como a não linearidade do material e a análise de grande deformação. Posteriormente existiu uma evolução do NNRPIM, dado origem ao “Natural Radial Element Method” (NREM). Este último é um método eficiente e preciso [104].

4.2.3. Métodos sem Malha e as Células Biológicas

A maioria dos fenômenos físicos e naturais permite a sua modelação matemática através do cálculo analítico. No entanto, a teoria do cálculo analítico aparenta ser inadequada para descrever de forma satisfatória vários fenômenos complexos nas ciências aplicadas e na engenharia [106].

Em 2018, Dehghan *et al.* [107] aplicaram uma abordagem sem malha baseada na forma fraca, nomeadamente EFGM, de forma a encontrar a solução numérica da modelação matemática da invasão do tecido por células cancerígenas. Também é utilizado um esquema de diferenças finitas semi-implícitas baseado em Euler retroativo para estimar a variável temporal. Para verificar este método, compararam os resultados com outra técnica sem malha, como o método de aproximação de mínimos quadrados móveis generalizados.

A angiogénese corresponde ao desenvolvimento de novos capilares sanguíneos, sendo uma etapa crucial para o processo de cicatrização. Este sistema biológico possibilita um suplemento de sangue para o tecido, que é essencial para a proliferação e viabilidade celular. Como a angiogénese é um processo complexo, nos últimos anos, a modelação computacional tem suscitado especial interesse de cientistas por permitir modelar esse processo recorrendo a metodologias diferentes, sendo mais económicas e mais rápidas, comparativamente a abordagens experimentais [108].

Mais recentemente em 2020, Guerra *et al.* [108] apresentam um modelo matemático baseado no RPIM para análise do efeito do gradiente de difusão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na migração das células endoteliais.

Em 2020, Jahanshahi *et al.* [109] apresentaram um EFGM baseado em funções de base radial para obter uma solução numérica de um modelo matemático para a formação de capilares na angiogénese tumoral.

Nesse mesmo ano, Ghehsareh *et al.* [106] apresentam uma técnica numérica baseada numa combinação de interpolação de ponto radial local com o método sem malha pseudoespectral para descrever a eletrodifusão anómala de iões em células nervosas.

4.2.4. Métodos sem Malha e os Eritrócitos

Os glóbulos vermelhos em condições fisiológicas normais e saudáveis deformam-se rapidamente à medida que passam pelos microcapilares e pelo baço, no entanto, após ser invadido pelo parasita da malária, a membrana do eritrócito do hospedeiro começa a perder a deformabilidade [110]. Em 2017, Zhang *et al.* [110] analisaram os efeitos da infeção e maturação por *Plasmodium falciparum* na deformabilidade de eritrócitos parasitados ou infetados através de uma estrutura 3D não linear multiescala sem malha. Esta estrutura multiescala foi desenvolvida de acordo com a regra de Cauchy-Born e o método de Ritz móvel de mínimos quadrados aprimorado (IMLS-Ritz) sem malha. Assim, os resultados obtidos afirmam que a presença de infeção por malária aumenta a rigidez da membrana das hemácias. Verificaram ainda que nos estágios de infeção do trofozoítio e esquizontes, a geometria celular bicôncava é mais provável do que a geometria quase esférica em comparação com estudos experimentais. Além disso, a diminuição na deformabilidade da membrana dos eritrócitos infetados deve-se principalmente à remodelação estrutural e mudanças na microestrutura da membrana, em vez da mudança na forma da célula.

Em 2011, Yamaguchi *et al.* [111] apresentam um método sem malha (partícula) para modelar o fluxo sanguíneo microvascular. Assim, analisaram as alterações na forma dos glóbulos vermelhos e a respetiva distribuição e, também analisaram a camada livre de células numa variedade de tamanhos de vasos e as condições do hematócrito.

O SPH é um método normalmente utilizado para simular a hemodinâmica. Com isto, investigadores conseguiram simular o movimento de um glóbulo vermelho

deformável no plasma sanguíneo e, assim analisar numericamente a influência dos glóbulos vermelhos na formação de um coágulo sanguíneo primário [63].

No ano seguinte, Nayanajith *et al.* [112] recorreram ao SPH, para calcular a deformação dos glóbulos vermelhos. Este método apresenta vantagens na modelação direta de componentes do sangue, tais como membrana dos glóbulos vermelhos, fluido externo dos glóbulos vermelhos, plasma e fluido interno dos glóbulos vermelhos utilizando um conjunto de partículas discretas. De forma a verificar a viabilidade deste método, o movimento de um único glóbulo vermelho é simulado em fluxo Poiseuille e comparado com os resultados obtidos anteriormente com outros métodos.

Em 2017, Ademiloye *et al.* [8] analisaram os efeitos da infeção e da maturação por *Plasmodium falciparum* no comportamento de grande deformação dos glóbulos vermelhos infetados com malária, recorrendo a um método sem malha multiescala 3D. Os resultados afirmam que a deformabilidade das células infetadas com malária diminui substancialmente à medida que a infeção avança.

Mais recentemente em 2019, Ferreira *et al.* [16] construíram um modelo tridimensional de um glóbulo vermelho, aplicando duas condições de fronteira diferentes e analisaram o deslocamento, a tensão efetiva de Von Mises e a deformação equivalente. Para isso, recorreram a dois métodos numéricos: o FEM e o um método sem malha RPIM. Ainda em 2019, os mesmos autores simularam bidimensionalmente, hemácias saudáveis e patológicas (ovalócitose e anemia falciforme), de forma a compreender o comportamento de células saudáveis e patológicas quando submetidas a uma força e a uma condição de fronteira. Para isso, foi utilizado o FEM e dois métodos sem malha, o NNRPIM e o RPIM.

CAPÍTULO 5 – ESTUDO NUMÉRICO DE GLÓBULOS
VERMELHOS – VIBRAÇÕES LIVRES

5. Estudo Numérico de Glóbulos vermelhos - Vibrações Livres

Este capítulo tem como objetivo apresentar os resultados obtidos. Os principais softwares utilizados foram o FEMAP 2020.1 Student, que oferece ferramentas de desenho que possibilitaram o desenvolvimento dos modelos e a construção da respetiva malha, e o software FEMAS®, um freeware académico, com a capacidade de analisar ficheiros INP criados no FEMAP, tanto pelo método dos elementos finitos como pelos métodos sem malha (cmech.webs.com).

5.1. Estudo de Convergência de uma Esfera

Antes de iniciar o estudo dos glóbulos vermelhos foi realizado um estudo de convergência, no qual se analisaram as frequências de vibração de uma esfera com quatro malhas diferentes e com o número de nós/elementos a aumentar quadraticamente, utilizando os métodos numéricos FEM e RPIM. Para todos os modelos foi utilizado o valor do raio da esfera $R = 1\text{ m}$. Como propriedades mecânicas considerou-se o módulo de Young, $E = 1000\text{ Pa}$, o coeficiente de Poisson, $\nu = 0,45$ e a densidade $\rho = 1\text{ Kg/m}^3$. Deste modo, com as propriedades mecânicas definidas e não existindo nenhum grau de liberdade impedido, é possível estudar a influência que o número de nós possui nos resultados. Na **Figura 5.1** estão representadas as quatro malhas utilizadas no estudo de convergência.

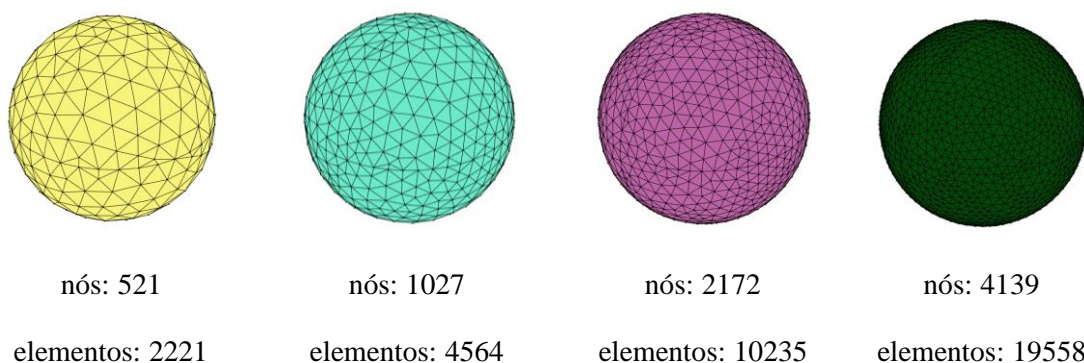


Figura 5.1- Ilustração das quatro malhas utilizadas no estudo de convergência.

Para analisar as frequências e modos de vibração livre, recorrendo ao FEM e ao RPIM, foi utilizado o software FEMAS (cmech.webs.com), um freeware software académico. Os resultados obtidos foram diferenciados em três tabelas, de acordo com o modo de vibração em estudo. A **Tabela 5.1** representa o primeiro modo de vibração da

esfera em estudo, a **Tabela 5.2** apresenta o segundo modo de vibração e, a **Tabela 5.3** corresponde ao terceiro modo de vibração livre.

Tabela 5.1- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre da esfera, obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.

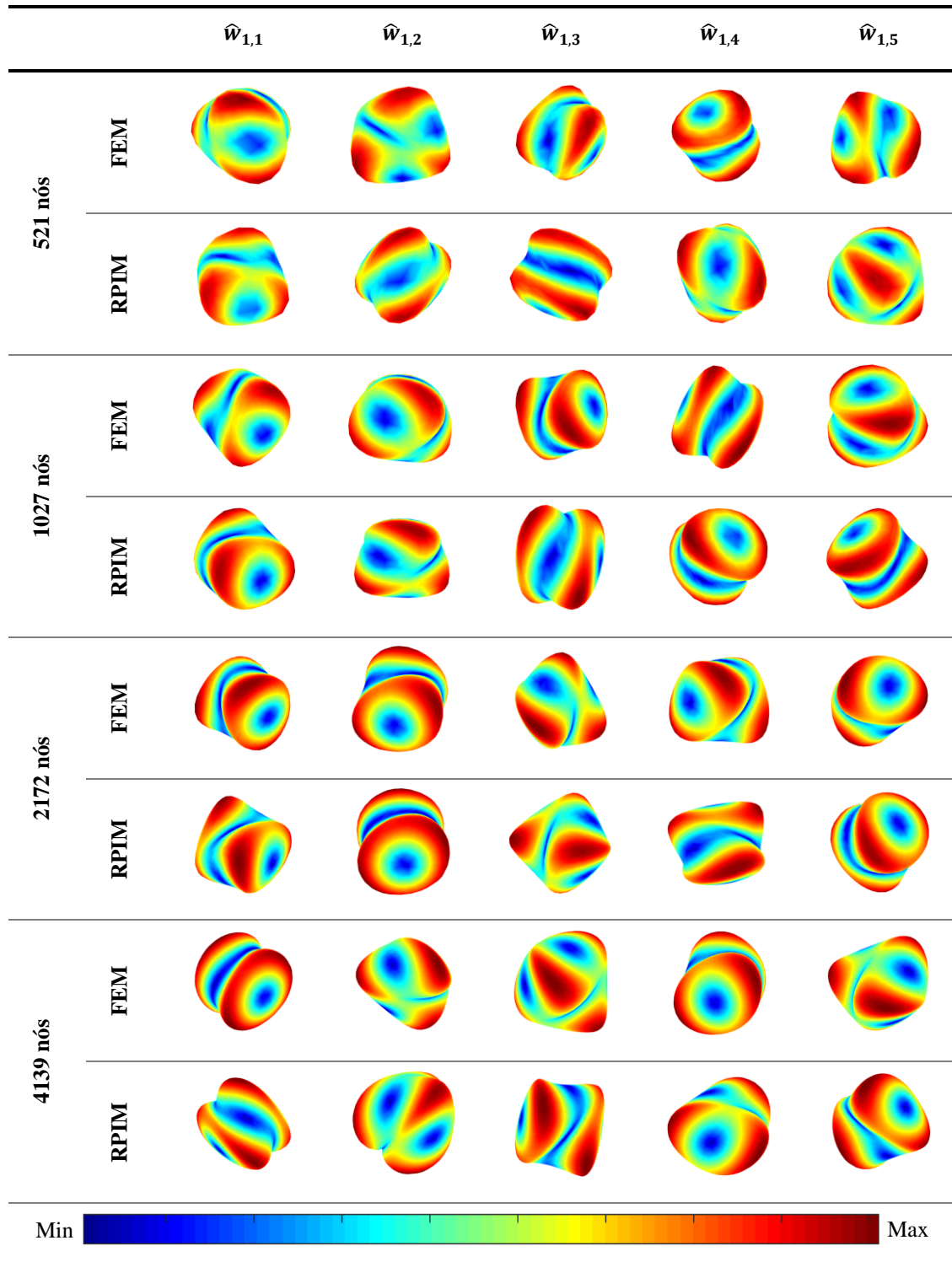


Tabela 5.2- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre da esfera obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.

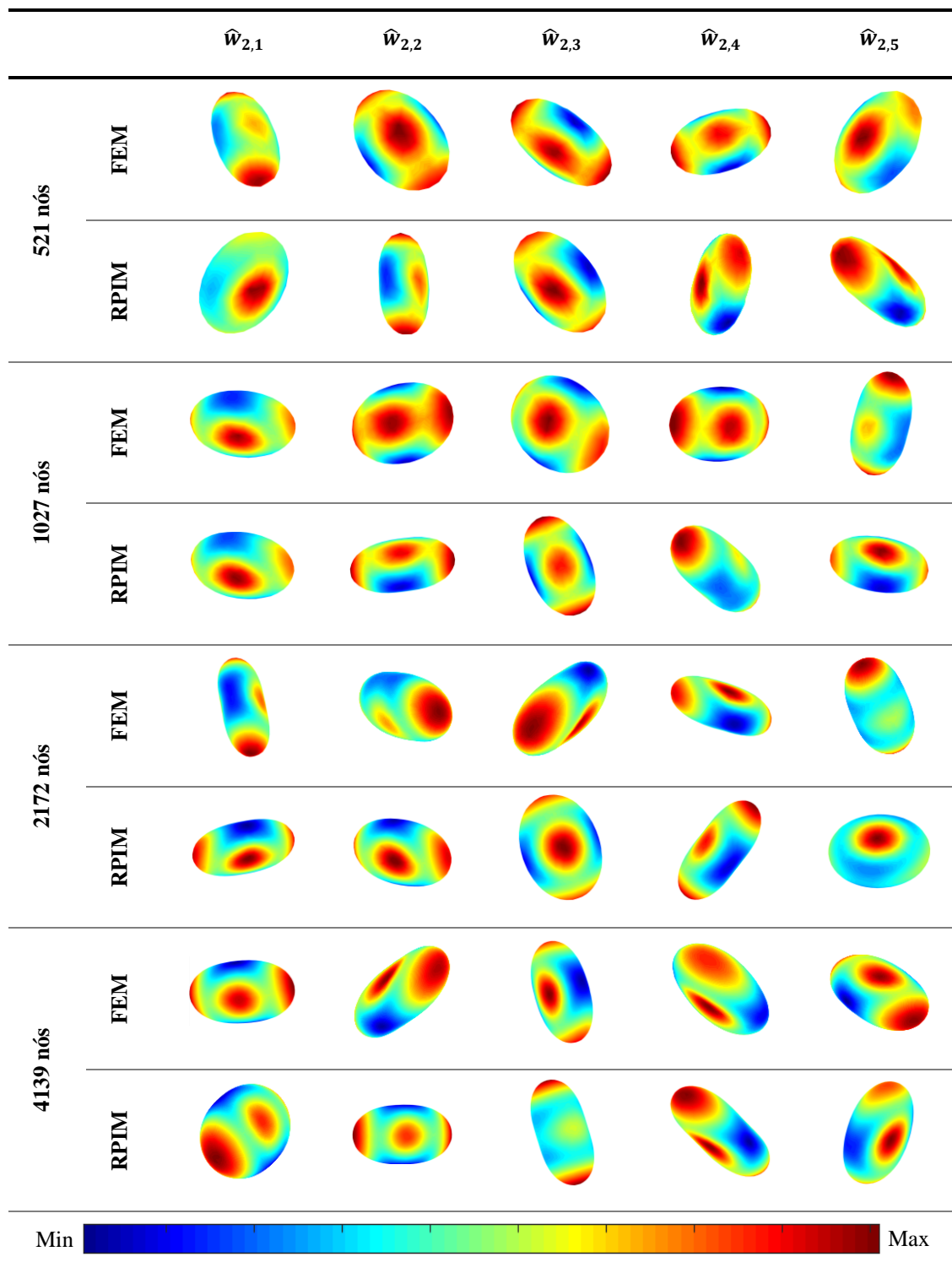
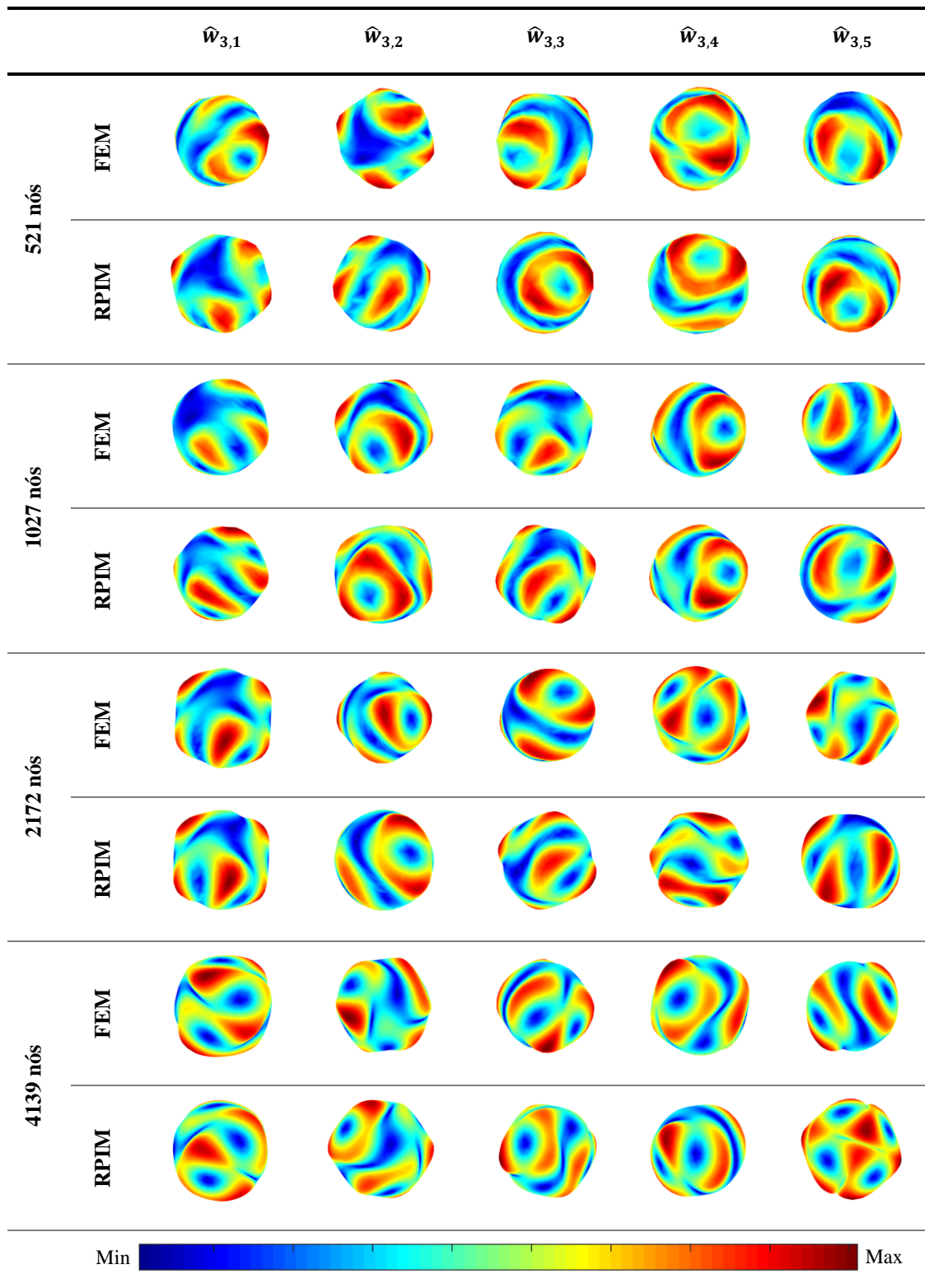


Tabela 5.3- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre da esfera obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.



Cada modo de vibração está associado à forma como um corpo se deforma, quando induzida uma frequência de vibração. Assim, assumindo os mapas de cores

apresentados anteriormente, as zonas a vermelho representam as regiões com maior valor de deslocamento nodal generalizado e as zonas a azul correspondem às regiões com menor valor de deslocamento nodal generalizado.

Analisando a **Tabela 5.1**, **Tabela 5.2** e **Tabela 5.3** é possível observar a deformação e o deslocamento destes modelos para os primeiros três modos de vibração. Verifica-se, quando comparados os dois métodos, os mapas de cores obtidos para as diferentes malhas são bastante semelhantes.

Segundo a **Figura 5.2**, **Figura 5.3** e **Figura 5.4** conforme o número de nós aumenta, os valores de frequência de vibração obtidos com o RPIM vão ficando cada vez mais próximos dos valores conseguidos pelo FEM. Adicionalmente, é possível observar que os resultados obtidos convergem para uma solução – a solução de convergência. Isto indica que ambos os métodos são convergentes. O modelo com 4000 nós apresenta uma solução semelhante para os dois métodos. Assim, ao longo deste projeto, serão utilizados modelos 3D discretizados com 3000 a 4000 nós.

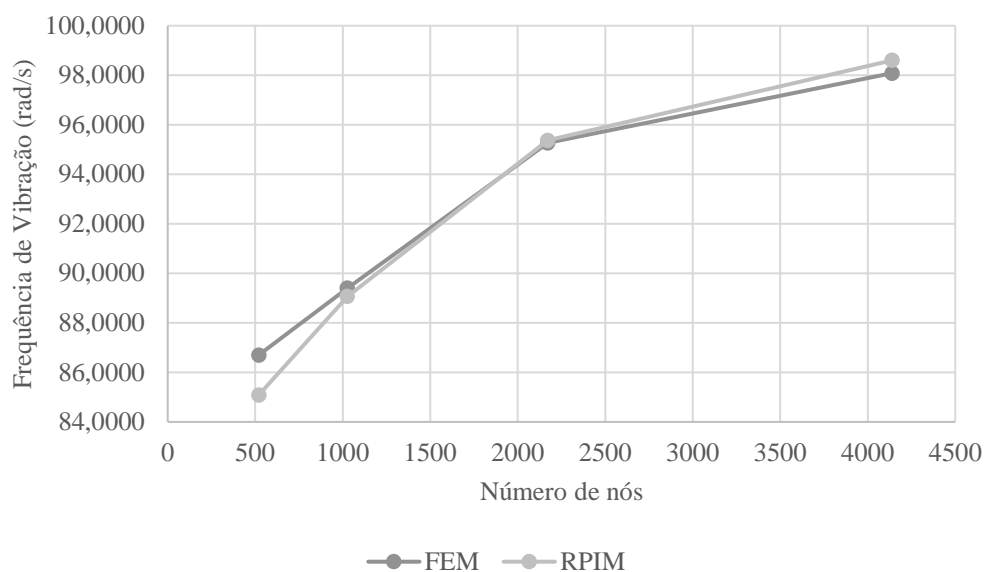


Figura 5.2- Gráfico de convergência do primeiro modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.

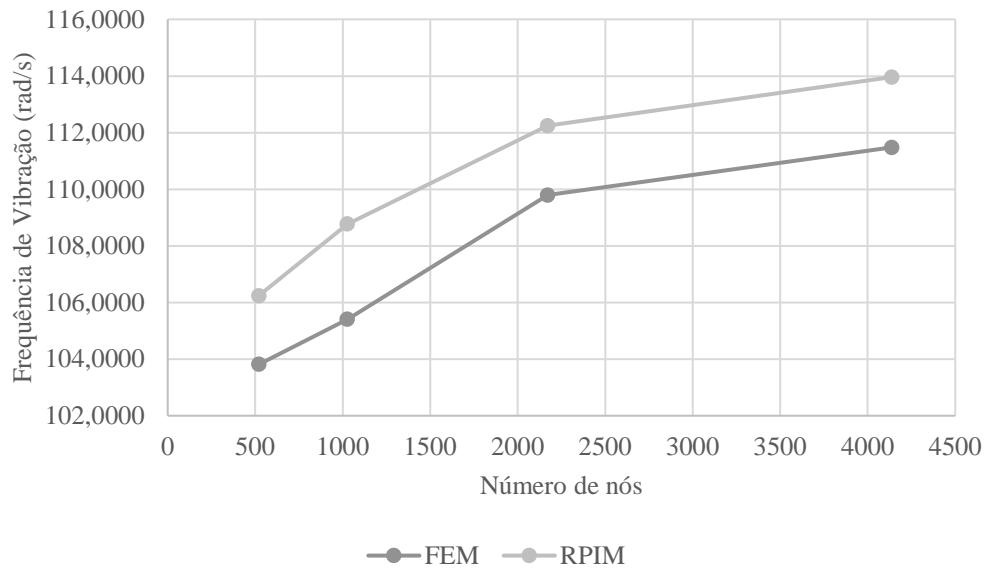


Figura 5.3- Gráfico de convergência do segundo modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.

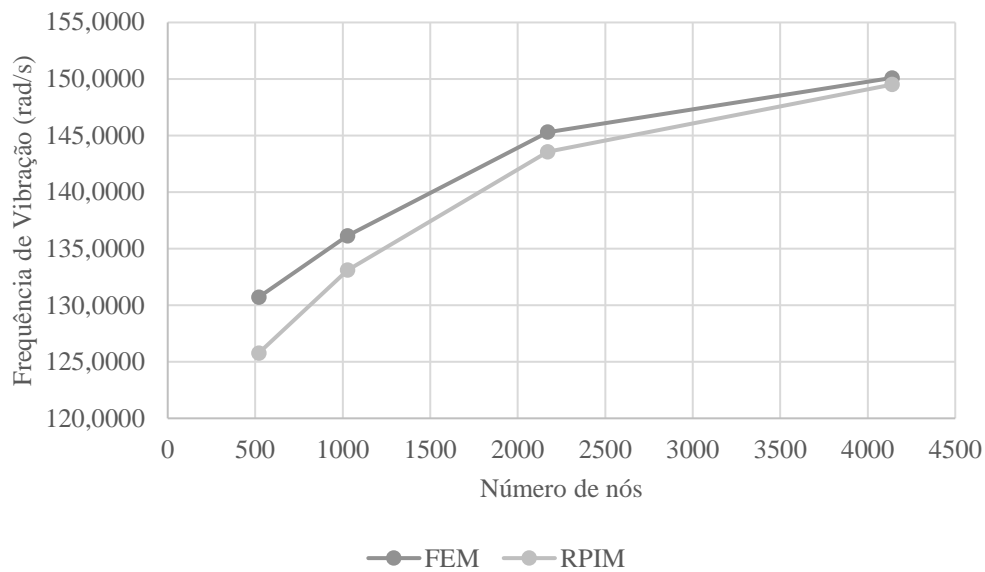


Figura 5.4- Gráfico de convergência do terceiro modo de vibração livre da esfera obtido com os dados do FEM e RPIM.

De acordo com Coccia *et al.* [113] a frequência natural, ω , pode ser determinada numericamente para esferas recorrendo à **Eq. 5.2**, onde G é o módulo de elasticidade ao corte e pode ser determinado com base na **Eq. 5.1**, E é o módulo de Young, ρ é a densidade e R é o raio da esfera.

$$G = \frac{E}{2 + 2\nu} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$\omega = \frac{5,4322}{R} \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Recorrendo à **Eq. 5.2** verifica-se que valor exato da frequência do primeiro modo de vibração é de $100,8734 \text{ rad/s}$, sendo próximo aos valores encontrados quando são consideradas malhas com 3000 nós ou mais.

5.2. Estudo de Convergência de um Glóbulo Vermelho Saudável

Para o presente trabalho, foi realizado um estudo de convergência para quatro malhas diferentes de glóbulos vermelhos saudáveis, com o número de nós a aumentar sucessivamente, utilizando os métodos numéricos FEM e RPIM.

A **Figura 5.5** representa esquematicamente as dimensões geométricas atribuídas aos modelos do glóbulo vermelho saudável. Para a construção da geometria destes modelos foram utilizados os dados apresentados na literatura, conforme documentado no Capítulo 2.

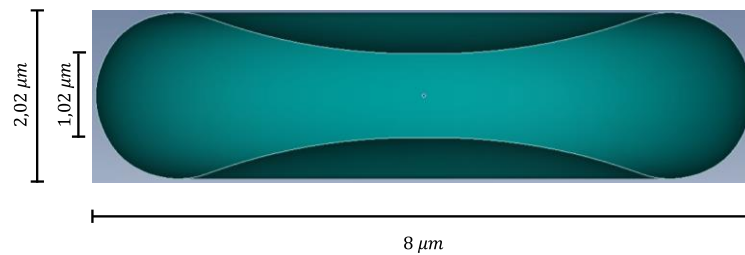


Figura 5.5- Representação esquemática das dimensões geométricas do glóbulo vermelho saudável.

De forma a estudar a convergência destes modelos, foram utilizadas as seguintes propriedades mecânicas: módulo de Young $E = 2,6 \times 10^{-8} N/\mu m^2$, coeficiente de Poisson $\nu = 0,49$ e, foi considerado que estas células possuem a mesma densidade: $1,11 \times 10^{-9} kg/\mu m^3$. A **Figura 5.6** representa as quatro diferentes malhas utilizadas no estudo de convergência.

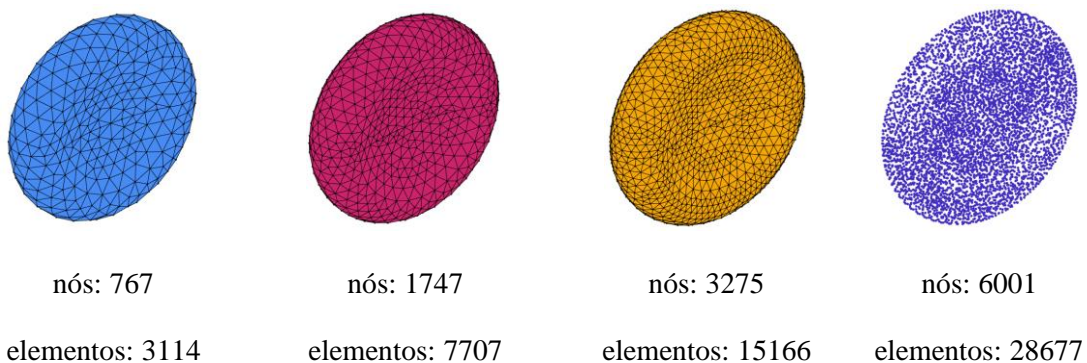
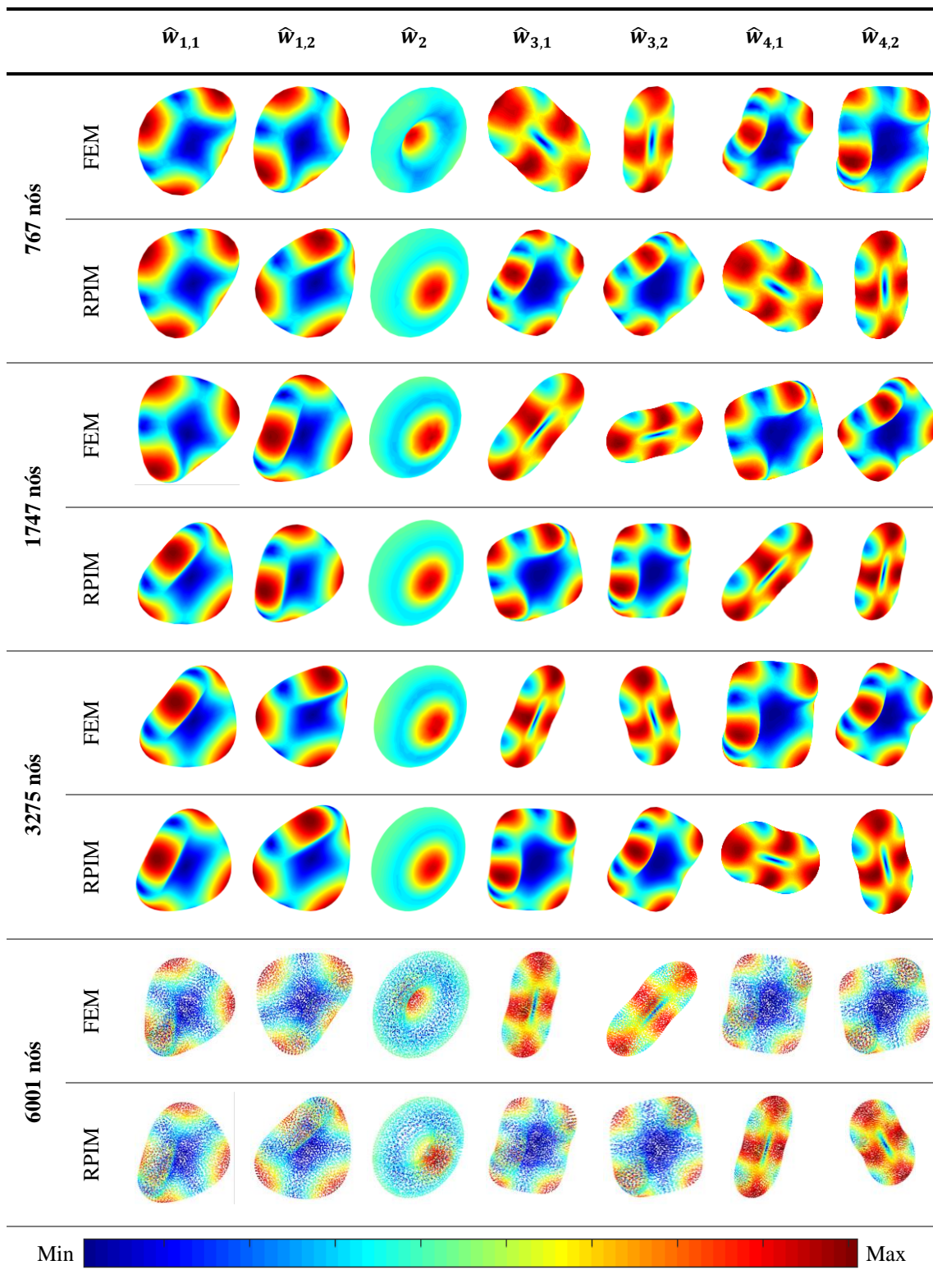


Figura 5.6- Ilustração das quatro malhas utilizadas no estudo de convergência.

Recorrendo ao software FEMAS (cmech.webs.com), foi realizada uma análise dos modos de vibração livre para cada uma das malhas, recorrendo ao FEM e ao RPIM. Para além disso, foi definido que estas células podem vibrar livremente, não estando impedido nenhum grau de liberdade.

A **Tabela 5.4** representa os primeiros quatro modos de vibração livre obtidos para os dois métodos estudados.

Tabela 5.4- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com os dois métodos numéricos utilizados: FEM e RPIM.



No entanto, como os resultados dos modos de vibração livre associados a uma energia mais elevada não são tão semelhantes para os dois métodos estudados, foram separados em duas tabelas diferentes.

A **Tabela 5.5** e a **Tabela 5.6** apresentam modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração, obtidos com o FEM e o RPIM, respectivamente. Os modos presentes nestas tabelas apresentam frequências de vibração sensivelmente superiores a 4 *rad/s*.

Tabela 5.5- Mapa de cores dos modos de vibração livre associados a uma energia mais elevada, obtidos com o FEM.

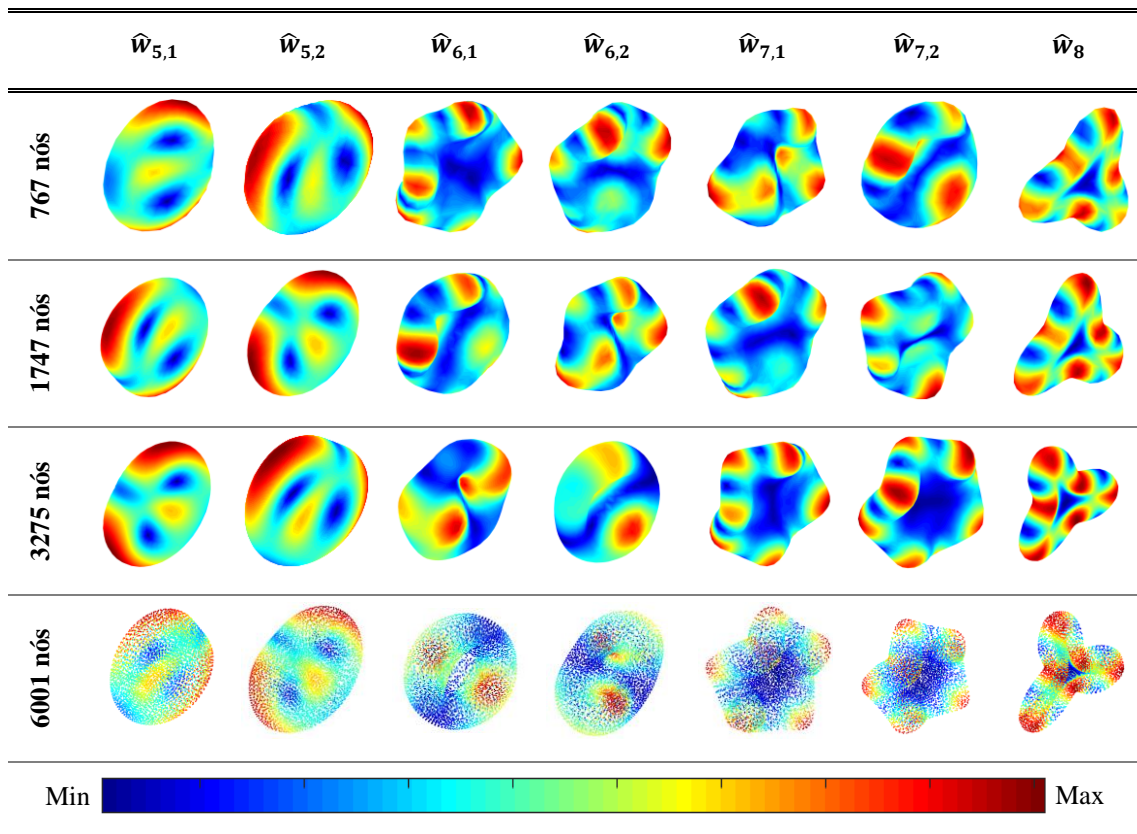
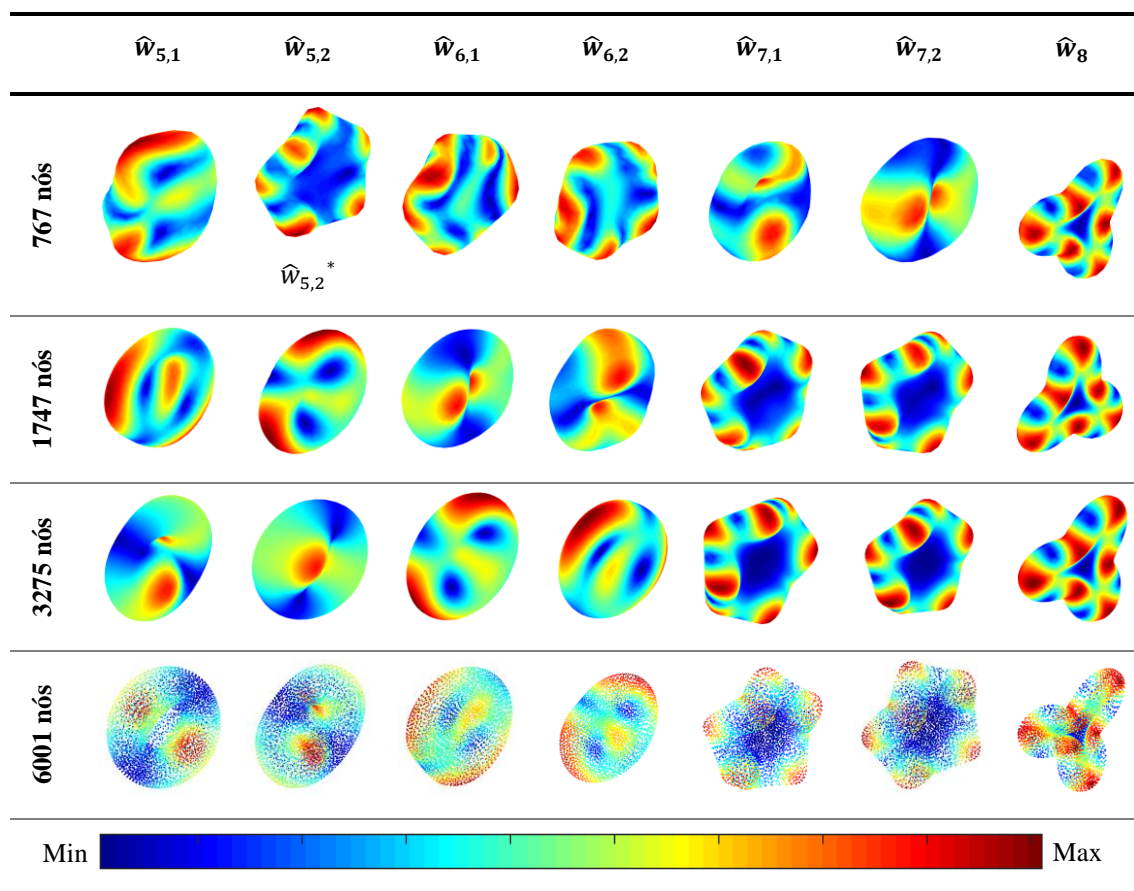


Tabela 5.6- Mapa de cores dos modos de vibração livre associados a uma energia mais elevada, obtidos com o RPIM.



Analisando a **Tabela 5.4**, é possível observar que existem semelhanças entre os resultados obtidos com o FEM e com o RPIM para modos de vibração correspondentes, tanto a nível de distribuição de frequências, como na forma como as células vibram.

O modo de vibração correspondente à frequência de vibração $\hat{w}_{5,2}^*$ presente na **Tabela 5.6** apresenta uma estrutura diferente das restantes, uma vez que a malha é considerada pouco adequada pois, para além de possuir poucos nós, os resultados gerados ainda não convergiram.

Comparando os resultados obtidos na **Tabela 5.4**, **Tabela 5.5** e **Tabela 5.6**, constata-se que as frequências de vibração mais baixas são mais fáceis de identificar, uma vez que produzem modos de vibração mais simples. Contrariamente, as frequências mais elevadas produzem modos de vibração mais complexos e, por isso a sua identificação é mais problemática.

Com base na **Figura 5.7**, **Figura 5.8**, **Figura 5.9** e **Figura 5.10** verifica-se que, mais um vez, à medida que o número de nós aumenta, os valores obtidos com o RPIM

vão ficando cada vez mais próximos dos valores conseguidos pelo FEM. No entanto, acima de 3275 nós, as alterações nos resultados já não são significativas. Assim, pode-se assumir que os dois métodos convergiram a partir desse número de nós, não sendo necessário utilizar malhas com um número de nós superior, por exemplo, a 6001.

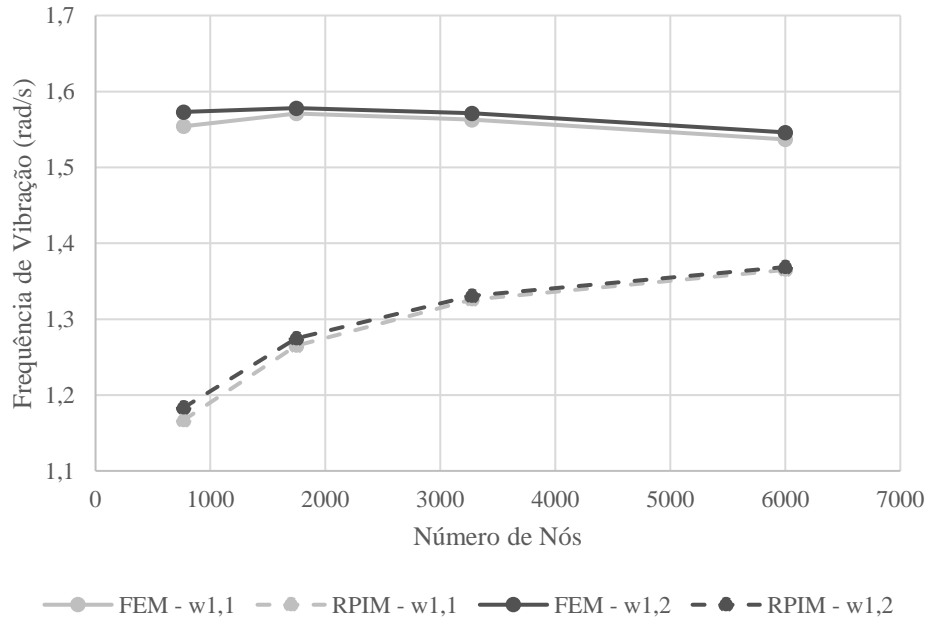


Figura 5.7- Gráfico de convergência do primeiro modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.

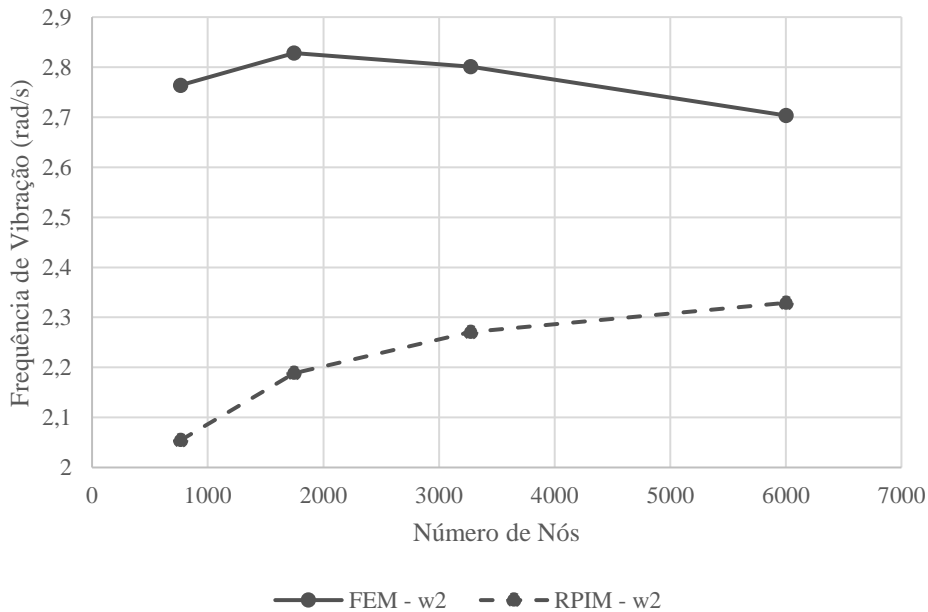


Figura 5.8- Gráficos de convergência do segundo modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.

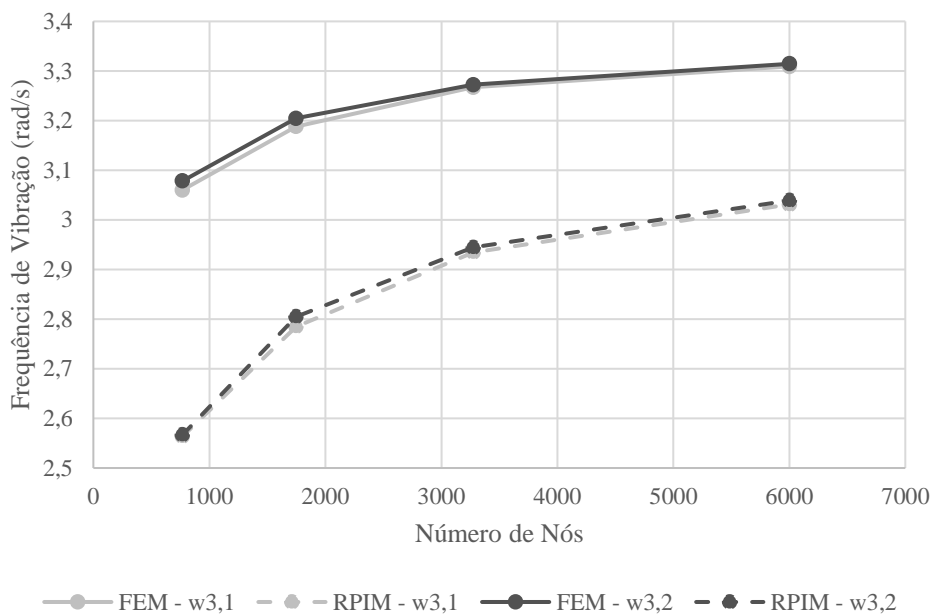


Figura 5.9- Gráficos de convergência do terceiro modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.

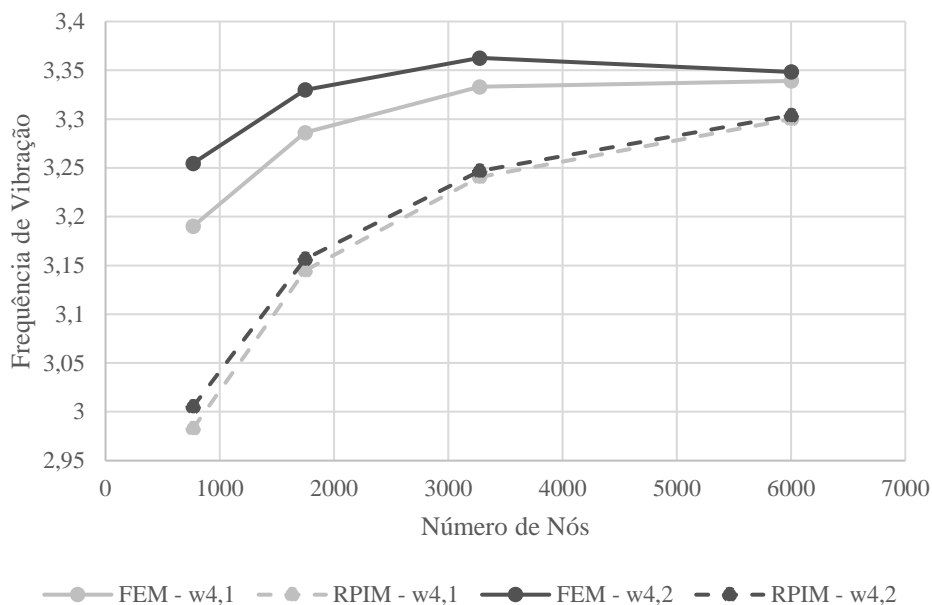


Figura 5.10- Gráficos de convergência do quarto modo de vibração livre obtido com os dados do FEM e RPIM.

A **Figura 5.11** e **Figura 5.12** representam os gráficos de convergência para os modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração, obtidos com o FEM e com o RPIM, respectivamente.

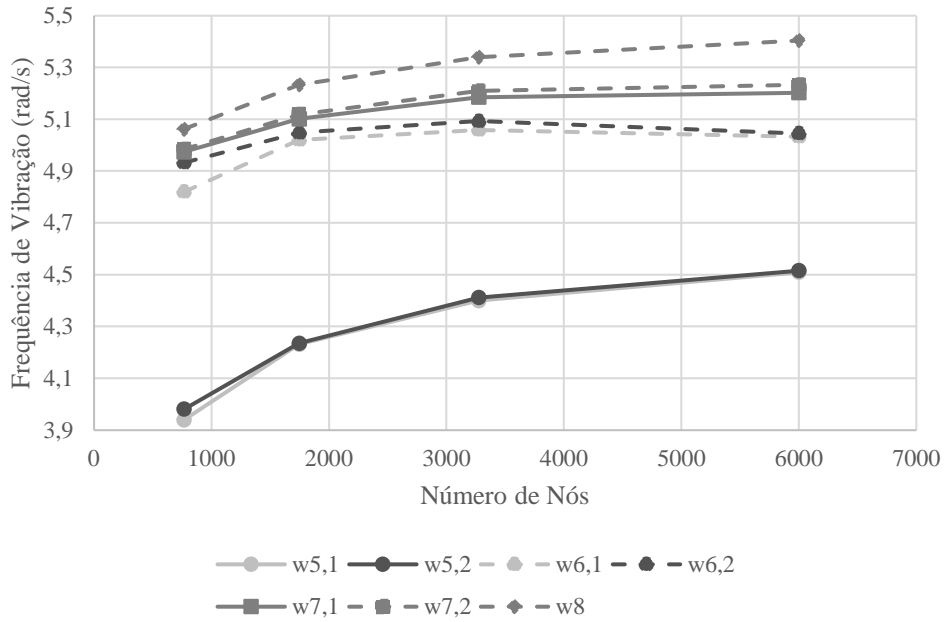


Figura 5.11- Gráficos de convergência dos modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração obtidos com o FEM.

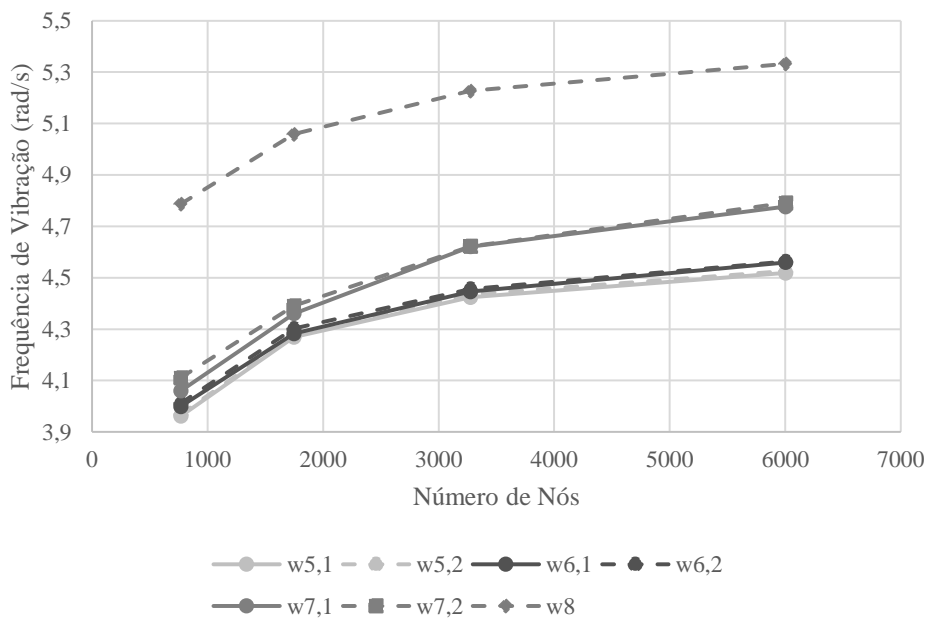


Figura 5.12- Gráficos de convergência dos modos de vibração superiores ao 4º modo de vibração obtidos com o RPIM.

A **Figura 5.13** representa as frequências de vibração correspondentes aos primeiros oito modos de vibração para a malha com 6001 nós.

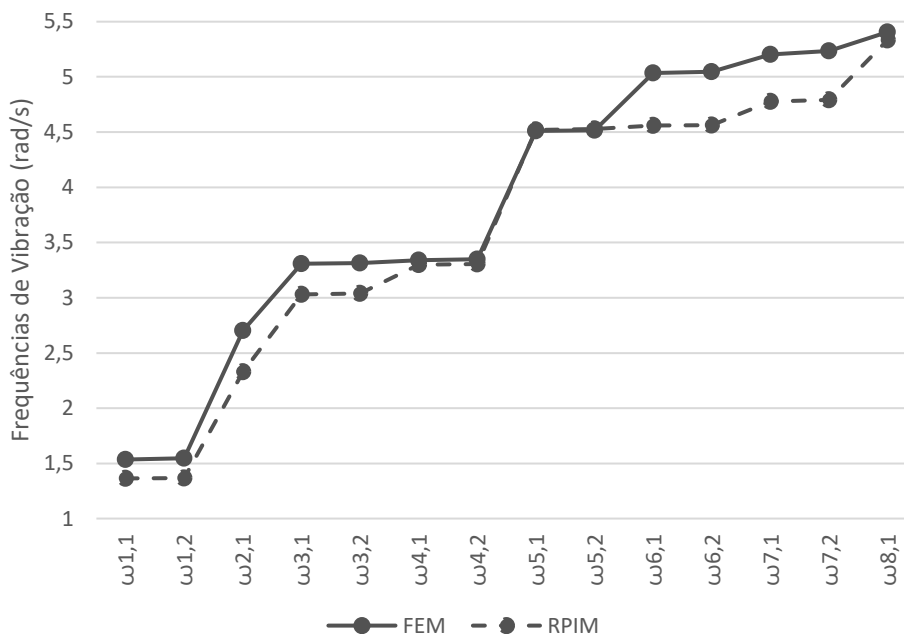


Figura 5.13- Gráfico das frequências de vibração correspondentes a cada modo de vibração para a malha com 6001 nós.

Analisando o gráfico, verifica-se que os resultados obtidos com o FEM são próximos dos resultados obtidos com o RPIM, comprovando-se assim a convergência dos resultados. Para além disso, comparando os resultados obtidos para a malha com 6001 nós (**Tabela 5.13**) com os resultados alcançados para as restantes malhas (**Tabela 5.7** até **Tabela 5.12**), verifica-se que a malha com maior número é a que permite obter resultados mais semelhantes entre o FEM e o RPIM. No entanto, é necessário ter em conta o tempo de processamento de cada modelo, uma vez que o custo computacional pode ser demasiado elevado e comprometer a viabilidade das análises do respetivo modelo.

Assim, a **Figura 5.14** apresenta o tempo de processamento total que o FEMAS necessita para gerar os resultados para as diferentes malhas.

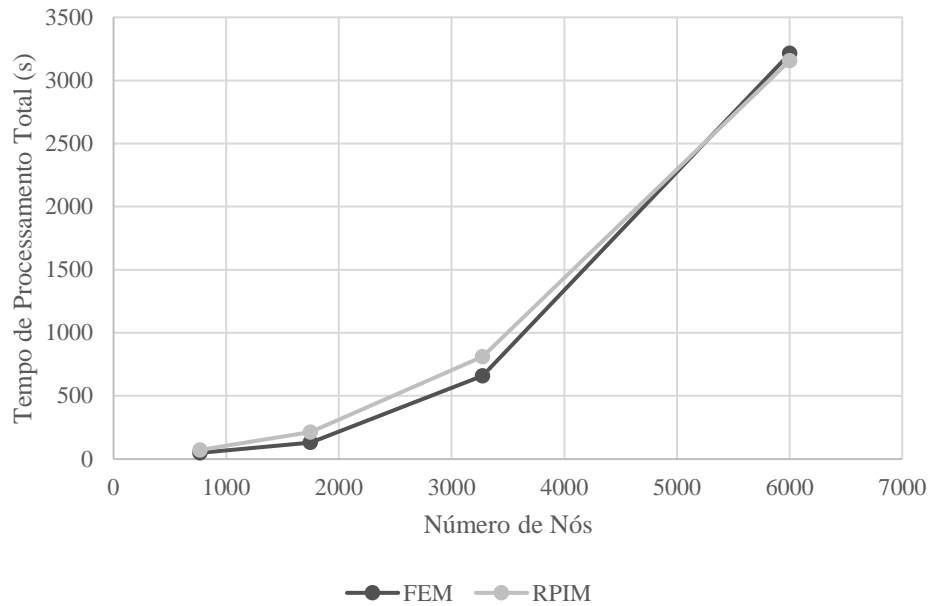


Figura 5.14- Tempo de processamento total que o FEMAS leva a gerar resultados para as diferentes malhas.

Conforme indicado na **Figura 5.14**, o tempo de processamento computacional exigido também é superior, sendo quase três vezes mais elevado do que o tempo exigido pela malha de 3275 nós. Desta forma, e como os dois métodos não apresentam diferenças significativas na análise de convergência quando utilizadas malhas de 3275 e de 6001 nós, a malha com 3275 nós será utilizada para análises posteriores, uma vez que o custo computacional é menor.

5.3. Estudo das Vibrações Livres - Glóbulo Vermelho Saudável com Membrana Celular

Com o estudo de convergência já realizado, adicionou-se à malha de 3275 nós a membrana celular. Com base em estimativas de dimensões moleculares, considera-se que uma membrana de glóbulo vermelho saudável possui aproximadamente $0,04 \mu m$ de espessura [114].

De acordo com Evans *et al.* [115] o módulo de compressibilidade da membrana do glóbulo vermelho saudável é $K = 500 \text{ mN/m} = 5 \times 10^{-7} \text{ N}/\mu m$ [116]. Li *et al.* obteve o valor do coeficiente de Poisson $\nu = 0,333$ para a membrana do glóbulo vermelho saudável [117].

Através da **Eq. 5.3** é possível obter o módulo de Young da membrana do glóbulo vermelho saudável. Onde E corresponde ao módulo de Young, K ao módulo de compressibilidade e ν ao coeficiente de Poisson da membrana.

$$E = 3K(1 - 2\nu) \quad (\text{Eq. 5.3})$$

Assim, substituindo o módulo de compressibilidade por $K = 5 \times 10^{-7} \text{ N}/\mu m$ e o coeficiente de Poisson por $\nu = 0,333$ obtemos $E = 5 \times 10^{-7} \text{ N}/\mu m$. No entanto, para obter o valor real do módulo de Young da membrana do glóbulo vermelho saudável é necessário dividir este valor pela sua espessura, adquirindo assim $E^* = 1,25 \times 10^{-5} \text{ N}/\mu m^2$.

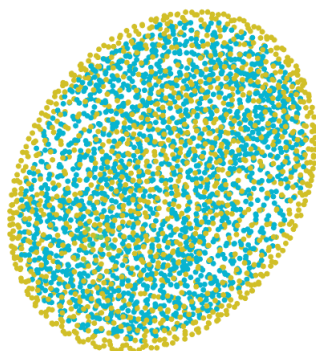


Figura 5.15- Representação esquemática da membrana celular do glóbulo vermelho saudável, representada a amarelo, e do seu citoplasma, representado a azul.

Porém, no FEMAS não foram inseridas as propriedades mecânicas reais, uma vez que a membrana é definida pela distância entre a camada de nós mais superficial (representada a amarelo na **Figura 5.15**) e a camada superficial do citoplasma, representada a azul na **Figura 5.15**. Esta distância, entre nós mais próximos, foi definida

como $D = 0,25 \mu\text{m}$. Dada esta situação, é fundamental recorrer à **Eq. 5.4** e à **Eq. 5.5** para obter a homogeneização destas propriedades mecânicas. Nestas equações, E_{m_H} e ν_{m_H} correspondem ao módulo de Young e ao coeficiente de Poisson da membrana homogeneizada, respetivamente, E_{m_r} e ν_{m_r} equivalem ao módulo de Young real e ao coeficiente de Poisson real da membrana, respetivamente, h_{m_r} representa a espessura real da membrana, e E_{c_r} e ν_{c_r} representam o módulo de Young e o coeficiente de Poisson do citoplasma, respetivamente.

$$E_{m_H} = \frac{E_{m_r} \cdot h_{m_r} + E_{c_r} \cdot (D - h_{m_r})}{D} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

$$\nu_{m_H} = \frac{\nu_{m_r} \cdot h_{m_r} + \nu_{c_r} \cdot (D - h_{m_r})}{D} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Substituindo os respetivos valores nas equações anteriores obtém-se $E_{m_H} = 2,02 \times 10^{-6} \text{ N}/\mu\text{m}^2$ e $\nu_{m_H} = 0,465$ para as propriedades mecânicas da fração volúmica homogeneizada da membrana do glóbulo vermelho saudável. Para as propriedades mecânicas do citoplasma foram consideradas as definidas anteriormente para o glóbulo vermelho saudável.

Com esta informação, foi efetuada uma análise dos modos de vibração livre, recorrendo ao FEM e ao RPIM. Os resultados obtidos foram separados em duas tabelas. A **Tabela 5.7** apresenta os primeiros quatro modos de vibração livre da fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável e a **Tabela 5.8** apresenta os modos de vibração superiores.

Tabela 5.7- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável, obtidos com o FEM e o RPIM.

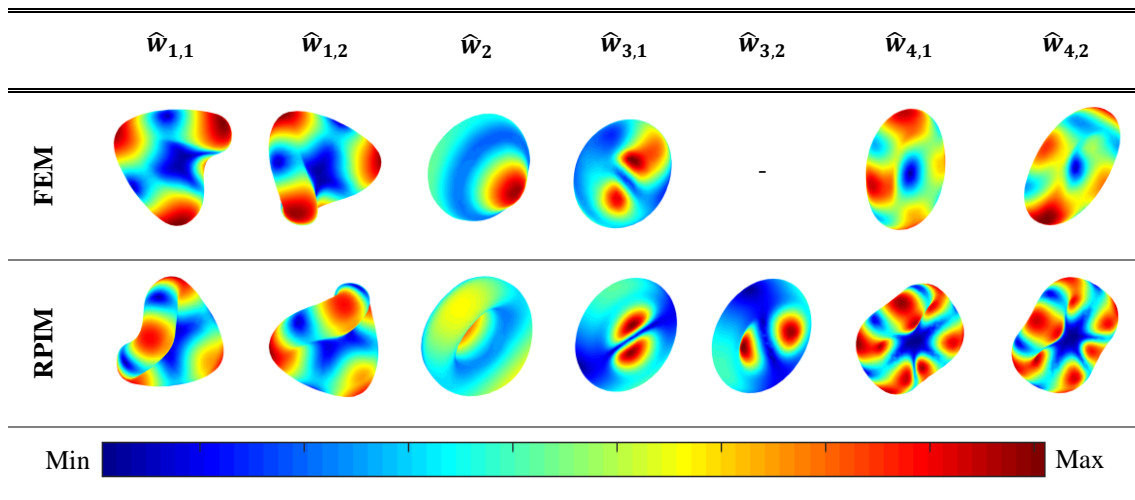
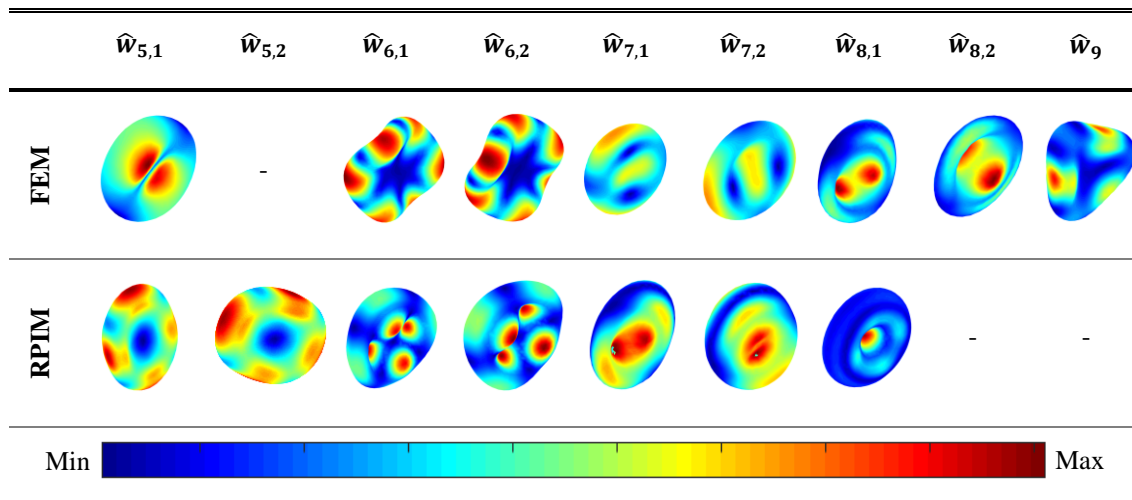


Tabela 5.8- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável, obtidos com o FEM e RPIM.



Através da observação dos mapas de cores da **Tabela 5.7** e da **Tabela 5.8** verifica-se que, quando induzida uma determinada frequência de vibração a célula deforma-se e esta, por sua vez, está associada a um determinado modo de vibração. Para além disso, é possível observar que os primeiros modos de vibração (**Tabela 5.7**), associados a frequências de vibração mais baixas, apresentam modos de vibração mais simples, enquanto que as frequências mais elevadas apresentam modos de vibração mais complexos (**Tabela 5.8**).

A **Tabela 5.9** e a **Tabela 5.10** apresentam as frequências de vibração, correspondentes a cada modo de vibração para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável e para o modelo citoplasma homogeneizado apresentado no estudo de convergência, obtidos com os dois métodos numéricos usados.

Para calcular a diferença (*dif*) entre os dois modelos foi utilizada a equação **Eq. 5.6**, onde \hat{w}_{c_h} corresponde à frequência de vibração do citoplasma homogeneizado e \hat{w}_{m_h} corresponde à frequência de vibração da fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável.

$$dif = \frac{|\hat{w}_{c_h} - \hat{w}_{m_h}|}{\hat{w}_{m_h}} \quad \text{(Eq. 5.6)}$$

Tabela 5.9- Frequências de vibração, expressas em rad/s, da fração volúmica da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável e do citoplasma homogeneizado, obtidos com o FEM.

Citoplasma Homogeneizado		Membrana + Citoplasma	
$\hat{w}_{1,1}$	1,5628	$\hat{w}_{1,1}$	9,1072
$\hat{w}_{1,2}$	1,5713	$\hat{w}_{1,2}$	9,1462
\hat{w}_2	2,8010	\hat{w}_2	11,1849
$\hat{w}_{3,1}$	3,2675	\hat{w}_3	17,1796
$\hat{w}_{3,2}$	3,2725	$\hat{w}_{4,1}$	17,3129
$\hat{w}_{4,1}$	3,3331	$\hat{w}_{4,2}$	17,3560
$\hat{w}_{4,2}$	3,3626	\hat{w}_5	17,6935
$\hat{w}_{5,1}$	4,3998	$\hat{w}_{6,1}$	18,5012
$\hat{w}_{5,2}$	4,4112	$\hat{w}_{6,2}$	18,6276
$\hat{w}_{6,1}$	5,0585	$\hat{w}_{7,1}$	22,8253
$\hat{w}_{6,2}$	5,0928	$\hat{w}_{7,2}$	23,0087
$\hat{w}_{7,1}$	5,1847	$\hat{w}_{8,1}$	24,0032
$\hat{w}_{7,2}$	5,2089	$\hat{w}_{8,2}$	24,1430
\hat{w}_8	5,3393	\hat{w}_9	25,4780

Tabela 5.10- Frequências de vibração, expressas em rad/s, da fração volúmica da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável com os valores do citoplasma homogeneizado obtidos com o RPIM.

	Citoplasma Homogeneizado	Membrana + Citoplasma
$\hat{w}_{1,1}$	1,3259	8,1982
$\hat{w}_{1,2}$	1,3307	8,2747
\hat{w}_2	2,2706	8,4568
$\hat{w}_{3,1}$	2,9348	12,8478
$\hat{w}_{3,2}$	2,9447	12,9590
$\hat{w}_{4,1}$	3,2407	16,1720
$\hat{w}_{4,2}$	3,2469	16,2217
$\hat{w}_{5,1}$	4,4237	16,8142
$\hat{w}_{5,2}$	4,4353	16,8658
$\hat{w}_{6,1}$	4,4460	19,1872
$\hat{w}_{6,2}$	4,4568	19,4892
$\hat{w}_{7,1}$	4,6209	20,6100
$\hat{w}_{7,2}$	4,6226	20,8093
\hat{w}_8	5,2275	21,2013

Comparando os dois modelos através da **Tabela 5.9**, verifica-se que, para além das frequências do primeiro e segundo modo de vibração, não é possível comparar mais nenhuma das frequências de vibração obtidas com o FEM, uma vez que os resultados obtidos para os mesmos modos de vibração apresentam configurações diferentes nos dois modelos. No entanto, através da **Tabela 5.10**, verifica-se que o mesmo acontece com o RPIM.

Assim sendo, para as frequências de vibração correspondentes ao primeiro e segundo modo de vibração foi calculada a diferença entre os dois modelos, para os dois métodos estudados.

Na **Tabela 5.11** são apresentados os valores da diferença entre os resultados obtidos para a fração volúmica da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável e os valores do citoplasma homogeneizado, obtidos para o primeiro e segundo modo de vibração. Os restantes modos de vibração não são comparáveis, uma vez que as frequências de vibração correspondem a modos de vibração muito distintos.

Tabela 5.11- Cálculo da diferença das frequências de vibração, utilizando a **Eq. 5.6**, para os dois métodos estudados.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	0,8284	0,8383
$\hat{w}_{1,2}$	0,8282	0,8392
\hat{w}_2	0,7496	0,7315

Analisando a referida tabela, verifica-se que o valor da diferença obtido é bastante elevado, podendo-se concluir que a membrana do glóbulo vermelho é muito resistente, alterando muito as frequências e os modos de vibração.

5.4. Estudo das Vibrações Livres - Ovalócitose

Nesta secção será apresentado um estudo das frequências e dos modos de vibração livres do glóbulo vermelho com ovalócitose.

De acordo com a literatura, os ovalócitos podem ser definidos como eritrócitos com altura igual ao comprimento ou com altura até metade do seu comprimento [118]. Tendo isto em conta, foram construídos 6 modelos com diferentes geometrias (**Figura 5.16**), em que o comprimento foi sempre definido igual a $8 \mu m$.

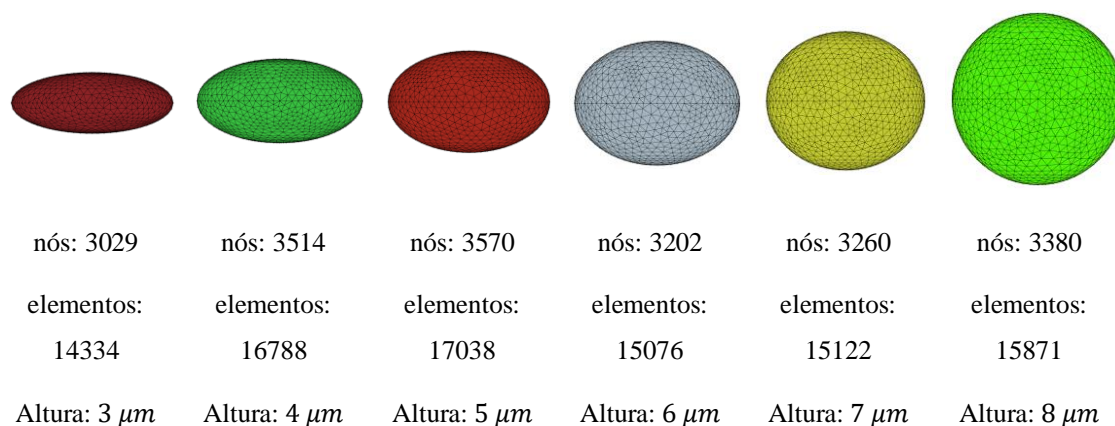


Figura 5.16- Ilustração das seis geometrias diferentes utilizadas no estudo da ovalócitose.

Para todos os modelos foram utilizadas as seguintes propriedades mecânicas: módulo de Young $E = 8,423 \times 10^{-8} \text{ N}/\mu m^2$, coeficiente de Poisson $\nu = 0,45$ e densidade $\rho = 1,11 \times 10^{-9} \text{ kg}/\mu m^3$ [3].

Da mesma forma que no estudo do glóbulo vermelho saudável, foi efetuada uma análise dos modos de vibração livre, recorrendo ao FEM e ao RPIM, para os diferentes modelos. Em todos os modelos foi estabelecido que estes podem vibrar livremente, não estando imposta nenhuma condição de fronteira essencial (impedimento de deslocamento).

A **Tabela 5.12** e a **Tabela 5.13** representam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo da célula com ovalócitose de $3 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.14** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.12- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $3 \mu m$ de altura.

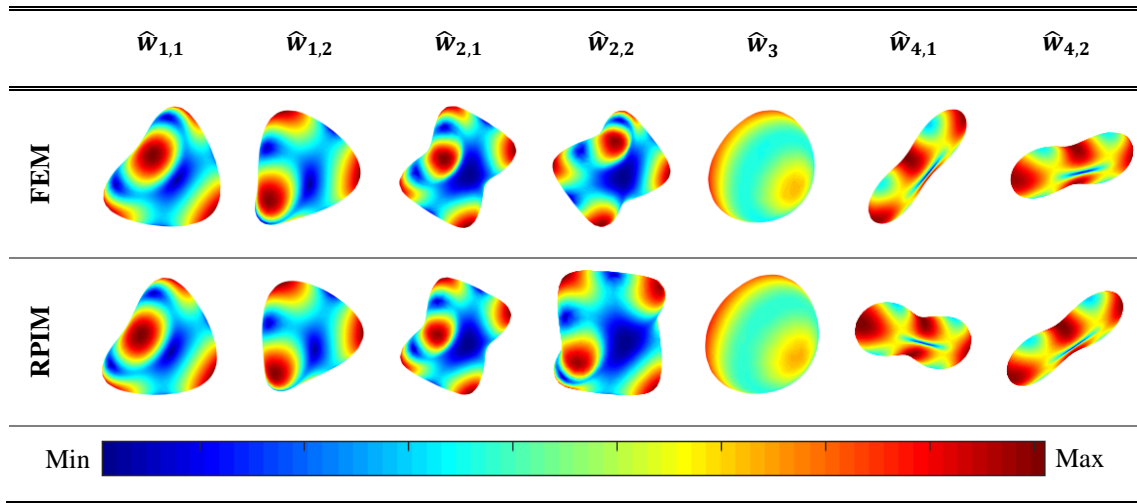


Tabela 5.13- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $3 \mu m$ de altura.

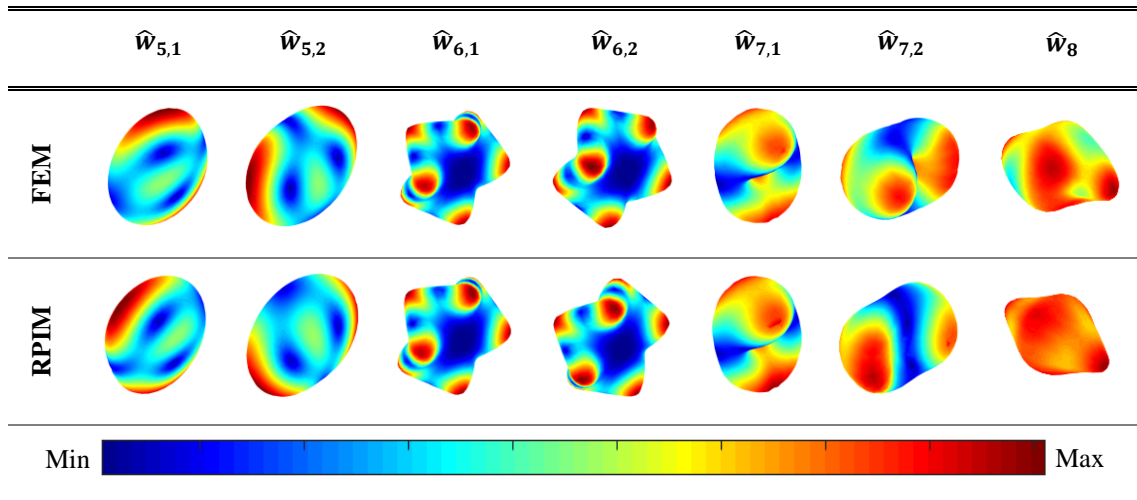


Tabela 5.14- Frequências de vibração obtidas com o FEM e com o RPIM para o modelo com $3 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	4,2787	4,1239
$\hat{w}_{1,2}$	4,2878	4,1289
$\hat{w}_{2,1}$	7,3319	6,9928
$\hat{w}_{2,2}$	7,3416	7,0151
\hat{w}_3	7,5334	7,4873
$\hat{w}_{4,1}$	7,7775	7,9032
$\hat{w}_{4,2}$	7,7805	7,9068
$\hat{w}_{5,1}$	8,0263	8,1158
$\hat{w}_{5,2}$	8,0845	8,1707
$\hat{w}_{6,1}$	10,2137	9,6918
$\hat{w}_{6,2}$	10,3006	9,7380
$\hat{w}_{7,1}$	11,4443	11,4159
$\hat{w}_{7,2}$	11,5455	11,4781
\hat{w}_8	11,5775	11,7836

A **Tabela 5.15** e a **Tabela 5.16** apresentam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para a célula com ovalócitose de $4 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.17** exibe as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.15- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $4 \mu m$ de altura.

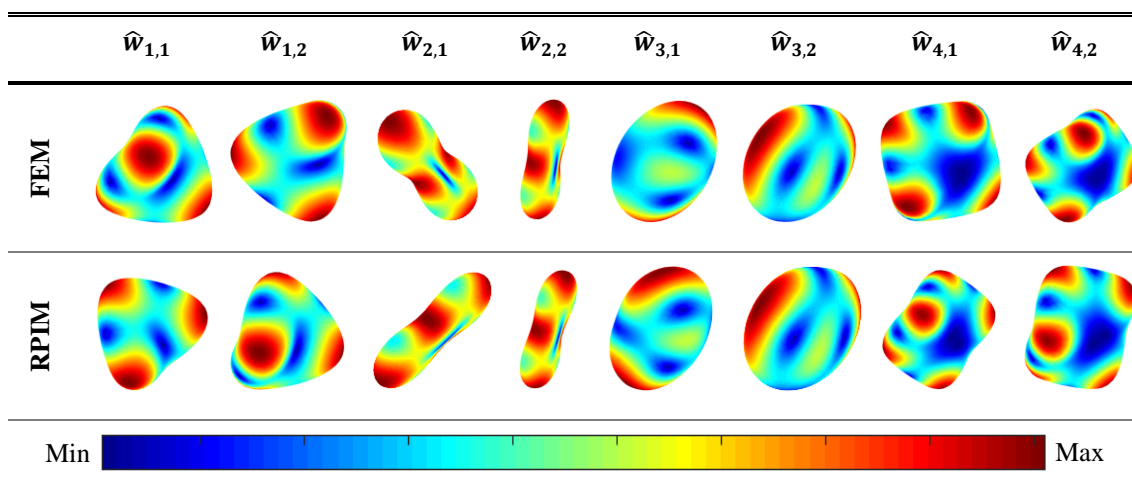


Tabela 5.16- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $4 \mu m$ de altura.

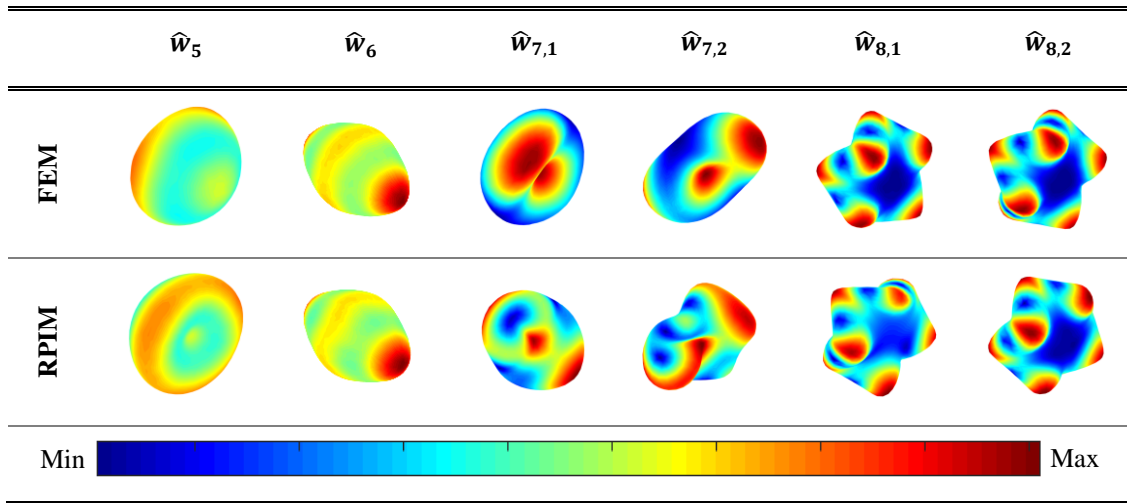


Tabela 5.17- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com $4 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	5,0870	4,9928
$\hat{w}_{1,2}$	5,0976	5,0017
$\hat{w}_{2,1}$	7,8306	7,9800
$\hat{w}_{2,2}$	7,8365	7,9852
$\hat{w}_{3,1}$	8,0206	8,1103
$\hat{w}_{3,2}$	8,0312	8,1141
$\hat{w}_{4,1}$	8,3929	8,2001
$\hat{w}_{4,2}$	8,4410	8,2231
\hat{w}_5	8,7189	8,7616
\hat{w}_6	10,7085	10,9267
$\hat{w}_{7,1}$	10,9372	11,1174
$\hat{w}_{7,2}$	10,9712	11,1396
$\hat{w}_{8,1}$	11,4839	11,1540
$\hat{w}_{8,2}$	11,5237	11,1652

A **Tabela 5.18** e a **Tabela 5.19** mostram os modos de vibração livre adquiridos com o FEM e com o RPIM para o modelo da célula com ovalócitose de $5 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.20** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.18- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $5 \mu m$ de altura.

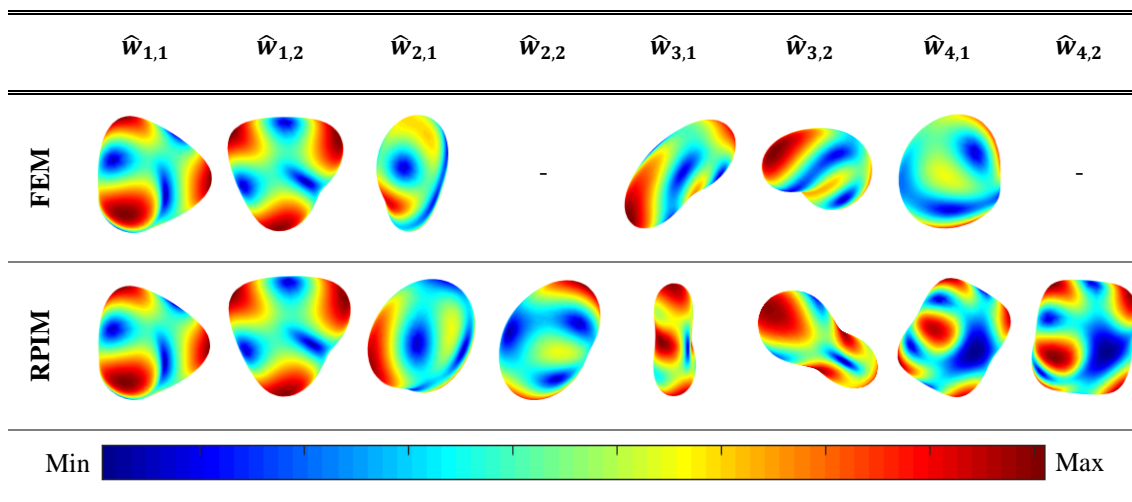


Tabela 5.19- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $5 \mu m$ de altura.

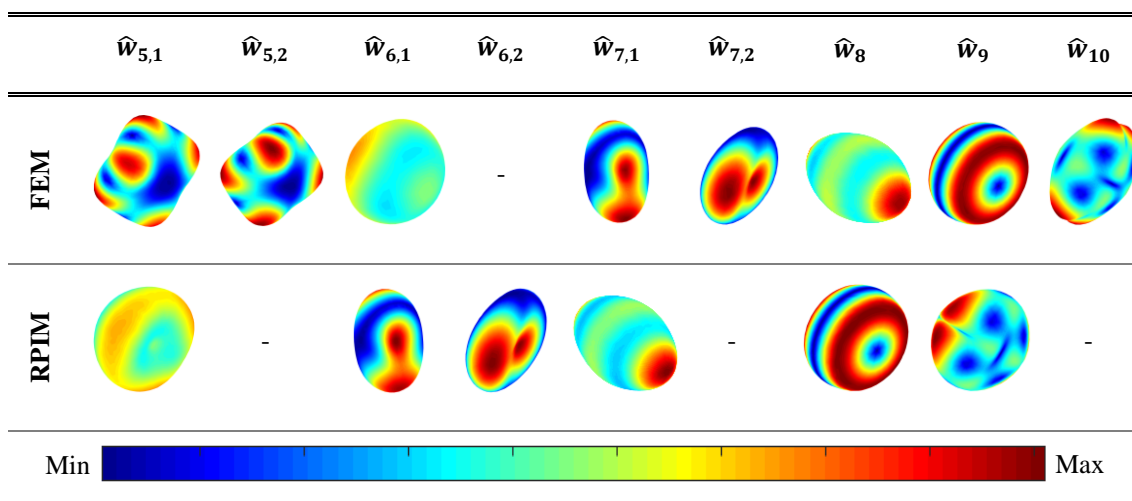


Tabela 5.20- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com $5 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	5,6632	5,6127
$\hat{w}_{1,2}$	5,6876	5,6342
$\hat{w}_{2,1}$	7,8238	7,9087
$\hat{w}_{2,2}$	-	7,9411
$\hat{w}_{3,1}$	7,8423	7,9920
$\hat{w}_{3,2}$	7,8443	8,0041
$\hat{w}_{4,1}$	7,8729	8,9705
$\hat{w}_{4,2}$	-	8,9920
$\hat{w}_{5,1}$	9,1081	9,5904
$\hat{w}_{5,2}$	9,1215	-
$\hat{w}_{6,1}$	9,4856	9,9746
$\hat{w}_{6,2}$	-	9,9885
$\hat{w}_{7,1}$	9,7725	10,0154
$\hat{w}_{7,2}$	9,7905	-
\hat{w}_8	9,8135	10,4636
\hat{w}_9	10,3319	11,6692
\hat{w}_{10}	11,6642	-

A **Tabela 5.21** e a **Tabela 5.22** representam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para a célula com ovalócitose de $6 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.23** mostra as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.21- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $6 \mu m$ de altura.

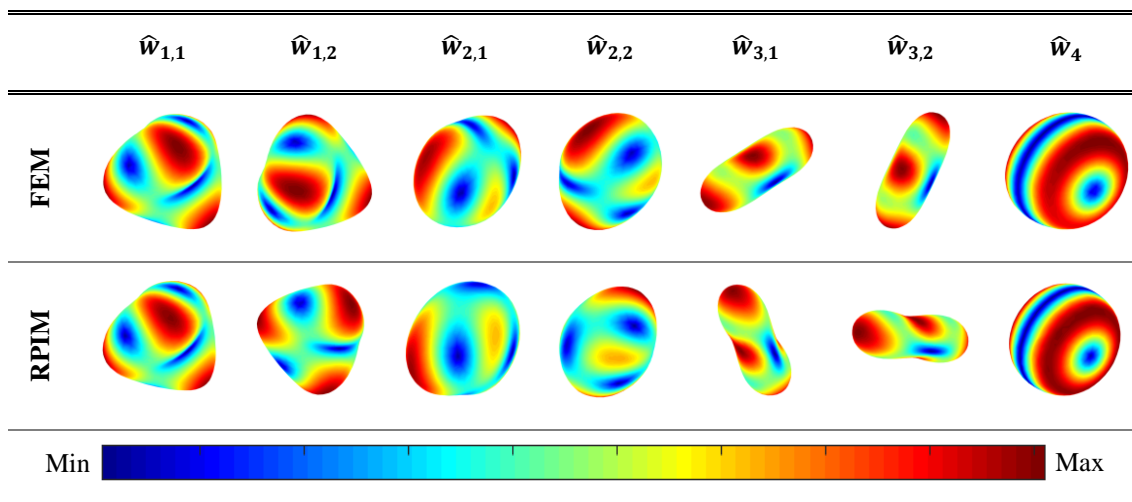


Tabela 5.22- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $6 \mu m$ de altura.

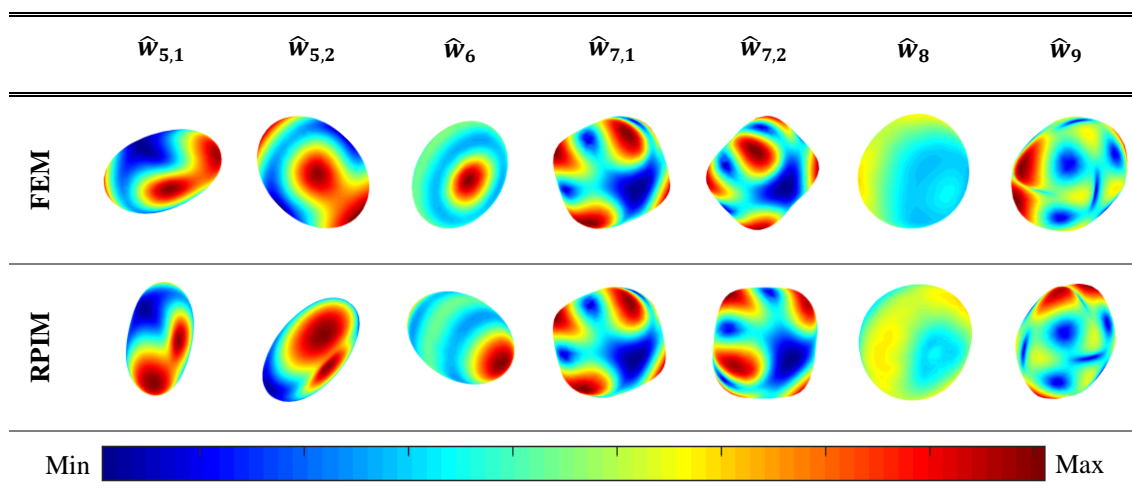


Tabela 5.23- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com $6 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	6,0749	6,0477
$\hat{w}_{1,2}$	6,0940	6,0599
$\hat{w}_{2,1}$	7,5215	7,5738
$\hat{w}_{2,2}$	7,5339	7,5914
$\hat{w}_{3,1}$	7,7675	7,9311
$\hat{w}_{3,2}$	7,7737	7,9367
\hat{w}_4	8,7894	8,8654
$\hat{w}_{5,1}$	8,8296	9,0163
$\hat{w}_{5,2}$	8,8481	9,0279
\hat{w}_6	8,9539	9,1324
$\hat{w}_{7,1}$	9,5664	9,4268
$\hat{w}_{7,2}$	9,5705	9,4428
\hat{w}_8	9,9506	10,0924
\hat{w}_9	11,1681	11,0924

A **Tabela 5.24** e a **Tabela 5.25** exibem os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo da célula com ovalócitose de $7 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.26** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.24- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $7 \mu m$ de altura.

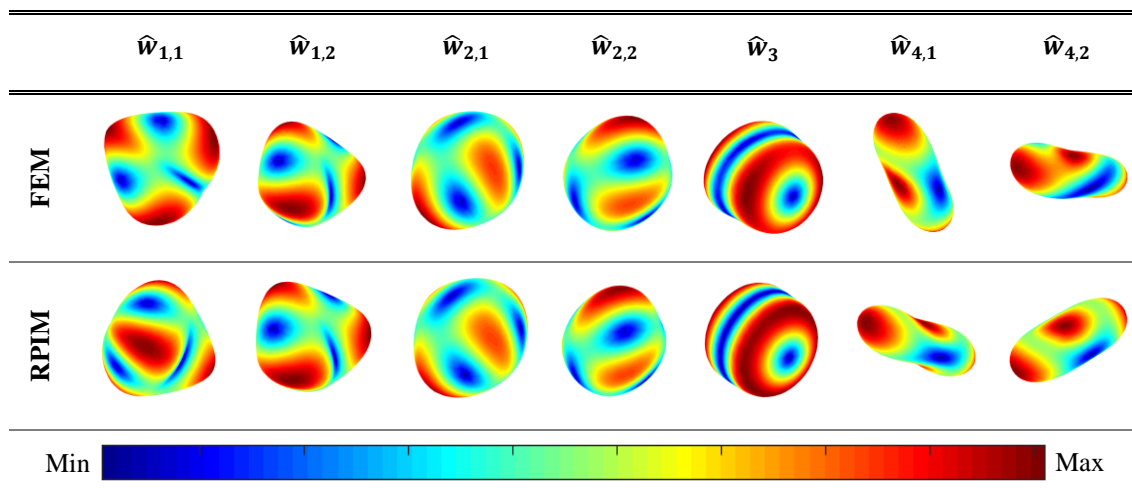


Tabela 5.25- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para o modelo com $7 \mu m$ de altura.

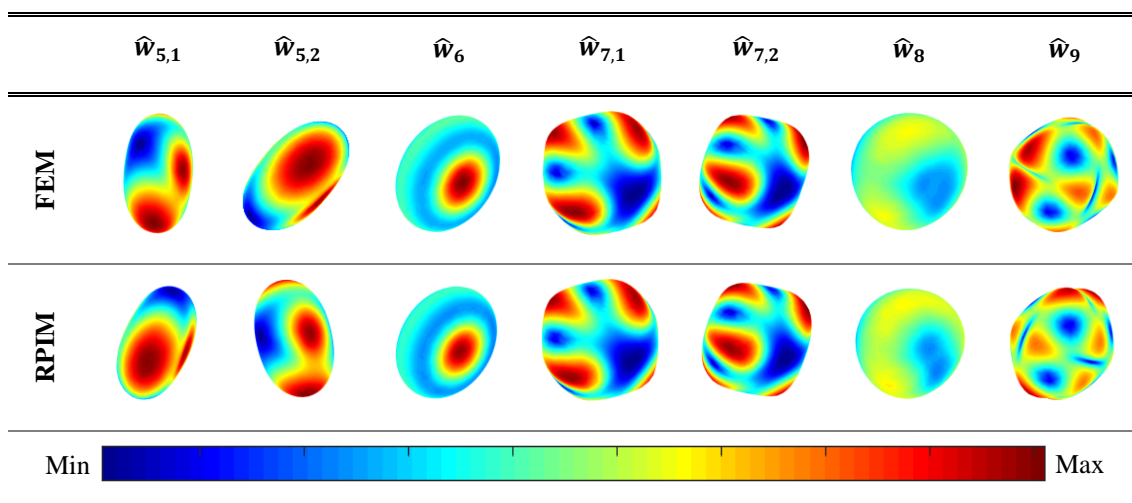


Tabela 5.26- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com $7 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	6,3843	6,3862
$\hat{w}_{1,2}$	6,3880	6,3884
$\hat{w}_{2,1}$	7,1211	7,1715
$\hat{w}_{2,2}$	7,1441	7,1805
\hat{w}_3	7,6045	7,6547
$\hat{w}_{4,1}$	7,6564	7,8613
$\hat{w}_{4,2}$	7,6609	7,8629
$\hat{w}_{5,1}$	8,1166	8,3375
$\hat{w}_{5,2}$	8,1252	8,3416
\hat{w}_6	8,2136	8,4266
$\hat{w}_{7,1}$	9,8435	9,7432
$\hat{w}_{7,2}$	9,8973	9,8014
\hat{w}_8	10,3155	10,5093
\hat{w}_9	10,6441	10,5560

A **Tabela 5.27**, **Tabela 5.28** e a **Tabela 5.29** representam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo da célula com ovalócitose de $8 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.30** exibe as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.27- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para o modelo com $8 \mu m$ de altura.

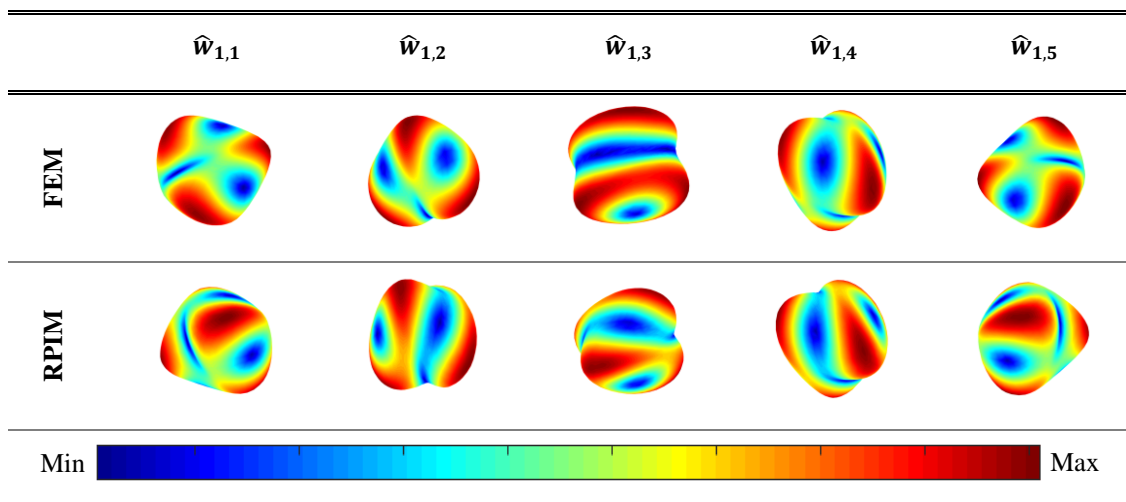


Tabela 5.28- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre obtido com os dois métodos estudados: o FEM e o RPIM para o modelo com $8 \mu m$ de altura.

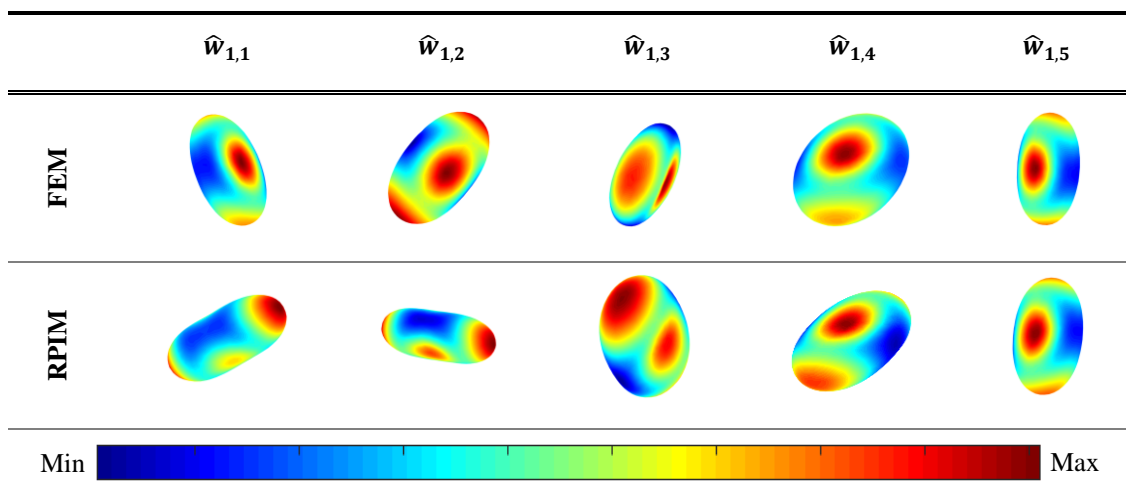


Tabela 5.29- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para o modelo com $8 \mu\text{m}$ de altura.

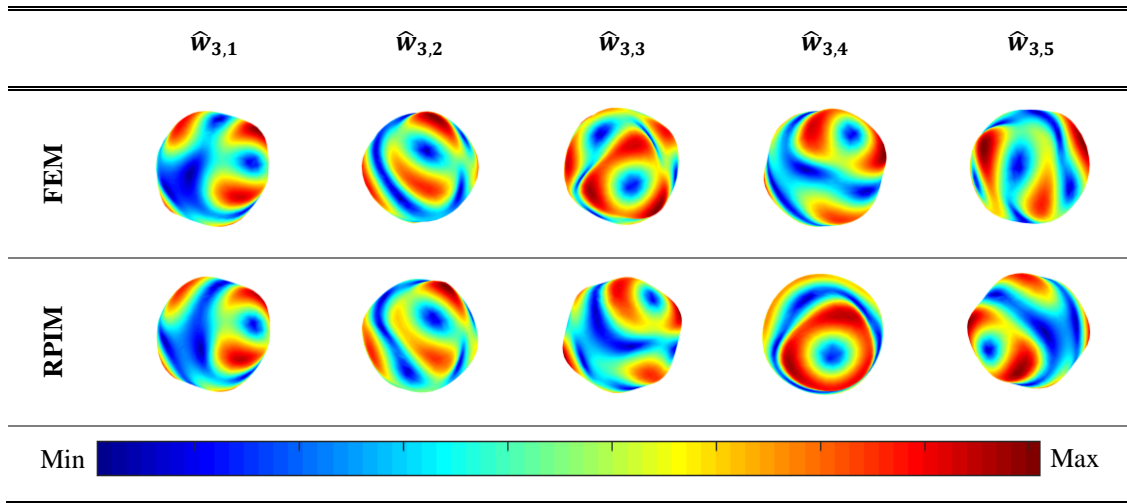


Tabela 5.30- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para o modelo com $8 \mu\text{m}$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	6,6866	6,6980
$\hat{w}_{1,2}$	6,7015	6,7173
$\hat{w}_{1,3}$	6,7116	6,7269
$\hat{w}_{1,4}$	6,7187	6,7306
$\hat{w}_{1,5}$	6,7353	6,7468
$\hat{w}_{2,1}$	7,6357	7,8073
$\hat{w}_{2,2}$	7,6480	7,8187
$\hat{w}_{2,3}$	7,6524	7,8223
$\hat{w}_{2,4}$	7,6550	7,8273
$\hat{w}_{2,5}$	7,6664	7,8366
$\hat{w}_{3,1}$	10,2014	10,1275
$\hat{w}_{3,2}$	10,2464	10,1430
$\hat{w}_{3,3}$	10,2629	10,1724
$\hat{w}_{3,4}$	10,2730	10,1838
$\hat{w}_{3,5}$	10,2813	10,1991

Analisando os resultados obtidos é possível verificar que diferentes geometrias originam diferentes modos e frequências de vibração.

Na **Figura 5.17** é apresentado um gráfico com as frequências de vibração para o primeiro modo de vibração, em função da altura, para as células com diferentes geometrias.

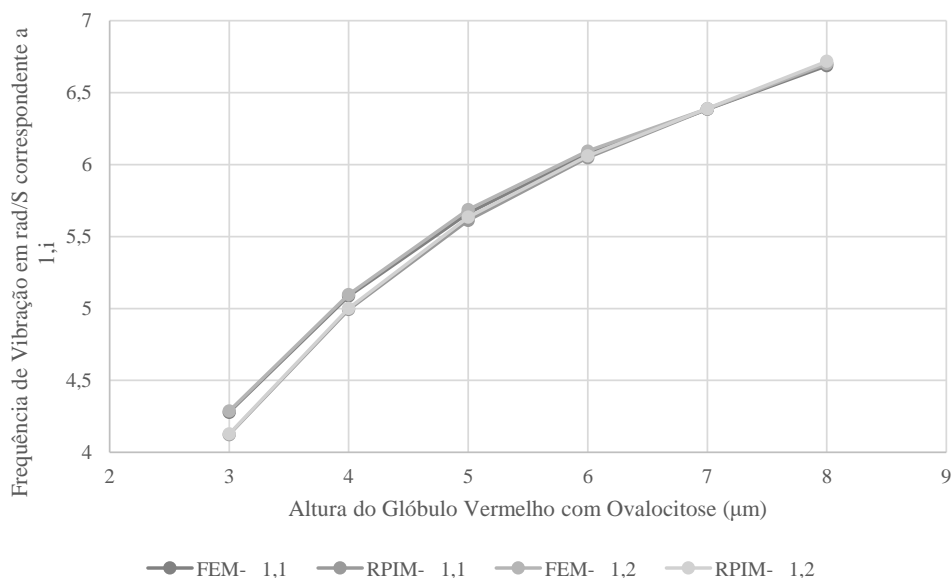


Figura 5.17- Frequências de vibração correspondentes ao primeiro modo de vibração para os modelos da célula com ovalócitose com diferentes geometrias.

De acordo com a **Figura 5.17**, para ambos os métodos podemos observar que, para o primeiro modo de vibração livre, a frequência de vibração cresce com a altura da célula.

Na **Figura 5.18** estão representadas as frequências de vibração obtidas no estudo do modelo do glóbulo vermelho saudável com citoplasma homogeneizado.

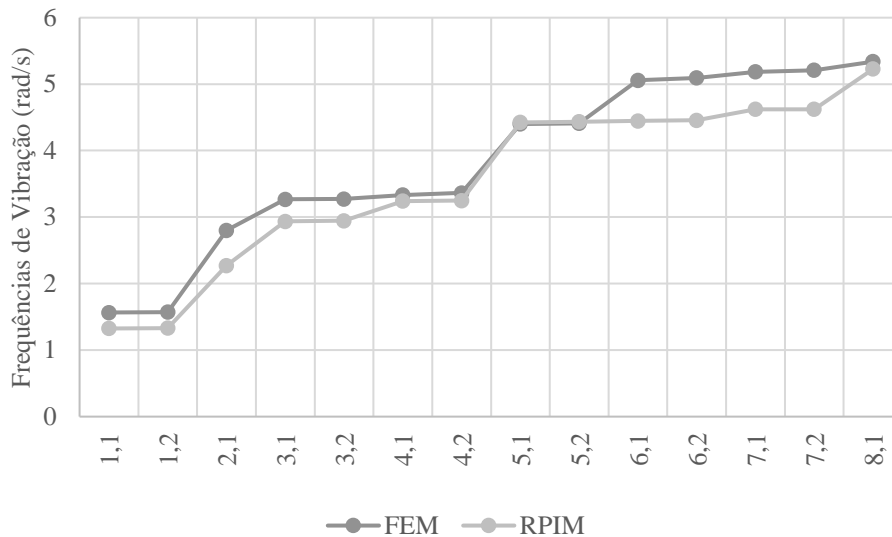


Figura 5.18- Frequências de vibração do modelo da célula saudável.

Ao compararmos as primeiras frequências obtidas com estes modelos patológicos, representadas na **Figura 5.17**, com as frequências obtidas no modelo da célula saudável, representado na **Figura 5.18**, verifica-se que estas frequências são mais elevadas do que as primeiras frequências de vibração obtidas para o glóbulo vermelho saudável. Assim, ao induzir o primeiro modo de vibração da célula com patologia entra-se no espectro do modo de vibração da célula saudável. Ou seja, não é possível induzir vibração através de ressonância nas células com patologia sem afetar as células saudáveis, uma vez que estas últimas também irão vibrar.

5.5. Estudo das Vibrações Livres ó Ovalócitose com Membrana Celular

A cada modelo representado na **Figura 5.16** foi adicionada a membrana celular. De acordo com Muñoz *et al.* [119] a espessura da membrana do ovalócito é equivalente à espessura da membrana do eritrócito saudável, tendo sido por isso considerada a espessura de aproximadamente $0,04 \mu m$, assim como no modelo da célula saudável.

As propriedades mecânicas utilizadas para o citoplasma da célula com ovalócitose foram iguais às mencionadas na secção anterior para a célula ovoide com citoplasma homogeneizado. Para a fração volúmica da membrana, foram utilizadas as mesmas propriedades que na membrana da célula saudável, onde o valor real do módulo de Young é $E^* = 1,25 \times 10^{-5} N/\mu m^2$ e o coeficiente de Poisson corresponde a $\nu = 0,333$.

No entanto, como no FEMAS não são inseridas as propriedades reais, recorreu-se de novo às **Eq. 5.4** e à **Eq. 5.5** para obter a homogeneização destas propriedades. Na **Tabela 5.31**, as propriedades mecânicas introduzidas no FEMAS para realização do estudo dos modos de vibração são apresentadas.

Tabela 5.31- Propriedades mecânicas inseridas no FEMAS para a fração volúmica da membrana da célula ovoide.

Modelos:	Altura: $3 \mu m$	Altura: $4 \mu m$	Altura: $5 \mu m$	Altura: $6 \mu m$	Altura: $7 \mu m$	Altura: $8 \mu m$
$D (\mu m)$	0,24	0,29	0,22	0,28	0,21	0,27
E_{mH} ($N/\mu m^2$)	$2,15 \times 10^{-6}$	$1,80 \times 10^{-6}$	$2,34 \times 10^{-6}$	$1,86 \times 10^{-6}$	$2,45 \times 10^{-6}$	$1,92 \times 10^{-6}$
ν_{mH}	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43

Da mesma forma que no estudo anterior, foi efetuada uma análise dos modos de vibração livre, recorrendo ao FEM e ao RPIM, para os diferentes modelos. À semelhança do definido anteriormente, assumiu-se que as células podem vibrar livremente, não estando imposta nenhuma condição de fronteira.

Na **Tabela 5.32** e na **Tabela 5.33** estão representados os modos de vibração livre adquiridos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da

“membrana + citoplasma” com ovalócitose e $3 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.34** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.32- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $3 \mu m$ de altura.

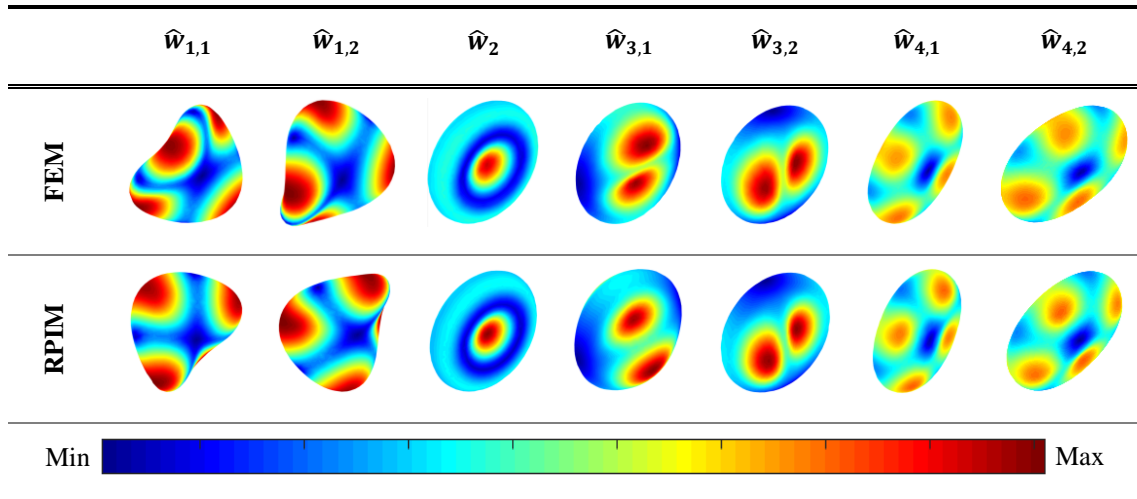


Tabela 5.33- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $3 \mu m$ de altura.

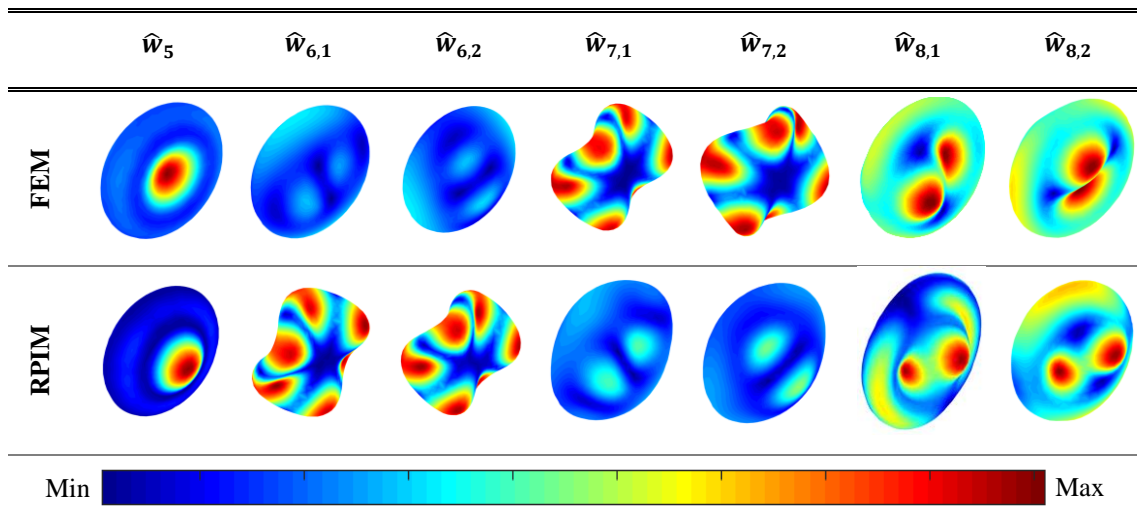


Tabela 5.34- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $3 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	13,5813	13,1220
$\hat{w}_{1,2}$	13,6328	13,1374
\hat{w}_2	16,5537	15,2268
$\hat{w}_{3,1}$	16,9200	16,2211
$\hat{w}_{3,2}$	17,0445	16,3635
$\hat{w}_{4,1}$	17,8553	17,6883
$\hat{w}_{4,2}$	17,8633	17,7177
\hat{w}_5	20,5303	19,6922
$\hat{w}_{6,1}$	20,7232	20,1583
$\hat{w}_{6,2}$	20,9154	20,4209
$\hat{w}_{7,1}$	22,3958	20,5385
$\hat{w}_{7,2}$	22,4500	20,5743
$\hat{w}_{8,1}$	23,6204	22,9976
$\hat{w}_{8,2}$	23,8001	23,0698

Na **Tabela 5.35** e a **Tabela 5.36** estão presentes os modos de vibração livre conseguidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $4 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.37** exhibe as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.35- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $4 \mu m$ de altura.

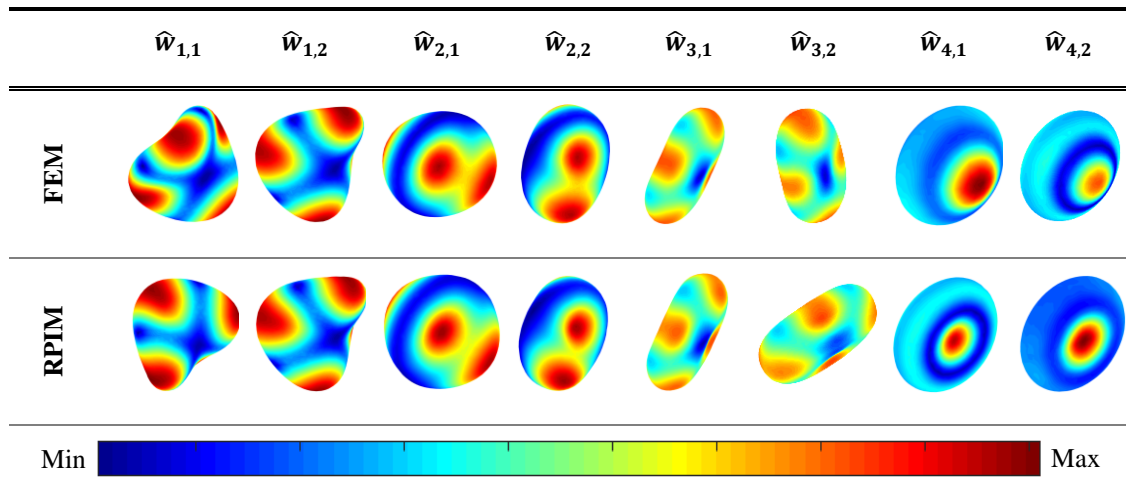


Tabela 5.36- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $4 \mu m$ de altura.

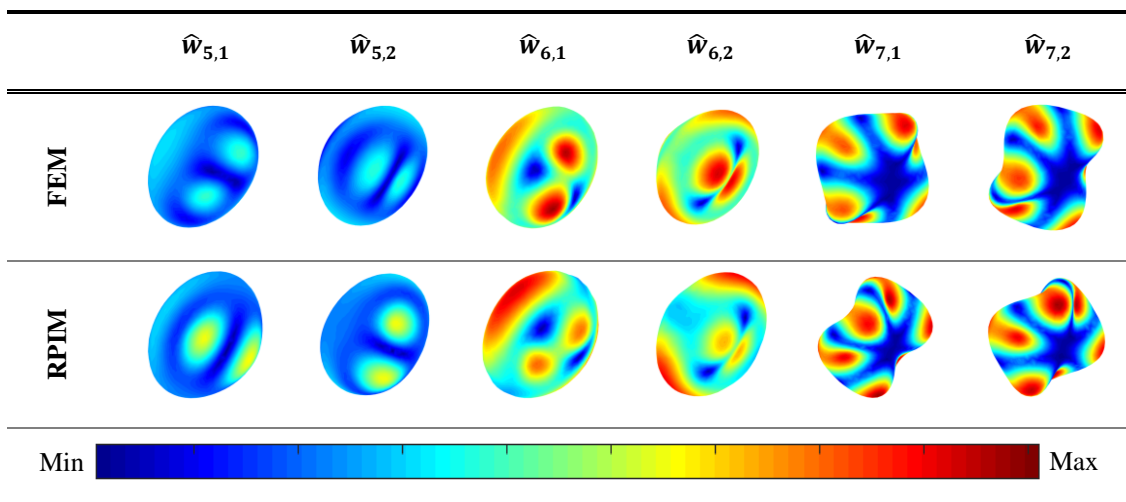


Tabela 5.37- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 4 μm de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	13,5224	13,3199
$\hat{w}_{1,2}$	13,5634	13,3944
$\hat{w}_{2,1}$	14,1286	14,0148
$\hat{w}_{2,2}$	14,1830	14,0912
$\hat{w}_{3,1}$	14,8261	14,8793
$\hat{w}_{3,2}$	14,8457	14,9011
$\hat{w}_{4,1}$	15,5865	15,0071
$\hat{w}_{4,2}$	15,6566	15,4466
$\hat{w}_{5,1}$	17,6419	17,2062
$\hat{w}_{5,2}$	17,6575	17,2284
$\hat{w}_{6,1}$	19,1301	19,0198
$\hat{w}_{6,2}$	19,2657	19,1410
$\hat{w}_{7,1}$	21,0761	19,9394
$\hat{w}_{7,2}$	21,2364	20,0300

A **Tabela 5.38** e a **Tabela 5.39** mostram os modos de vibração livre adquiridos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 5 μm de altura. A **Tabela 5.40** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.38- Mapa de cores dos primeiros quatro modos de vibração livre obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $5 \mu m$ de altura.

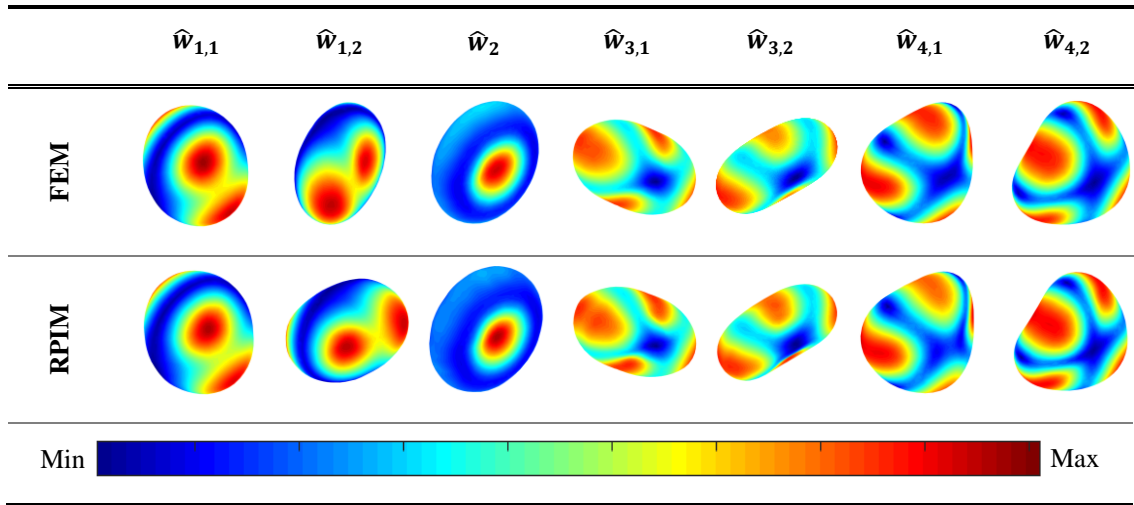


Tabela 5.39- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $5 \mu m$ de altura.

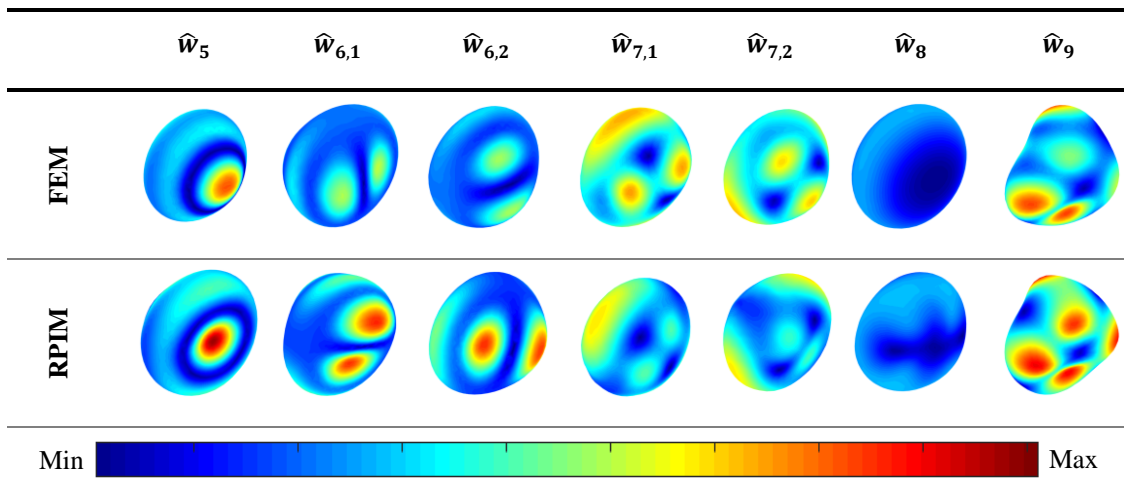


Tabela 5.40- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 5 μm de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	13,5779	13,5165
$\hat{w}_{1,2}$	13,6088	13,5796
\hat{w}_2	13,9371	13,8682
$\hat{w}_{3,1}$	14,5846	14,6510
$\hat{w}_{3,2}$	14,6052	14,6855
$\hat{w}_{4,1}$	15,6692	15,4923
$\hat{w}_{4,2}$	15,7478	15,6216
\hat{w}_5	16,6134	15,9498
$\hat{w}_{6,1}$	17,2991	16,6833
$\hat{w}_{6,2}$	17,3140	16,7335
$\hat{w}_{7,1}$	19,0319	19,0420
$\hat{w}_{7,2}$	19,1481	19,1626
\hat{w}_8	20,0467	20,5797
\hat{w}_9	21,1849	20,6000

A **Tabela 5.41** e a **Tabela 5.42** representam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 6 μm de altura. A **Tabela 5.43** mostra as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.41- Mapa de cores dos primeiros cinco modos de vibração livre obtidos com o FEM e RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $6 \mu m$ de altura.

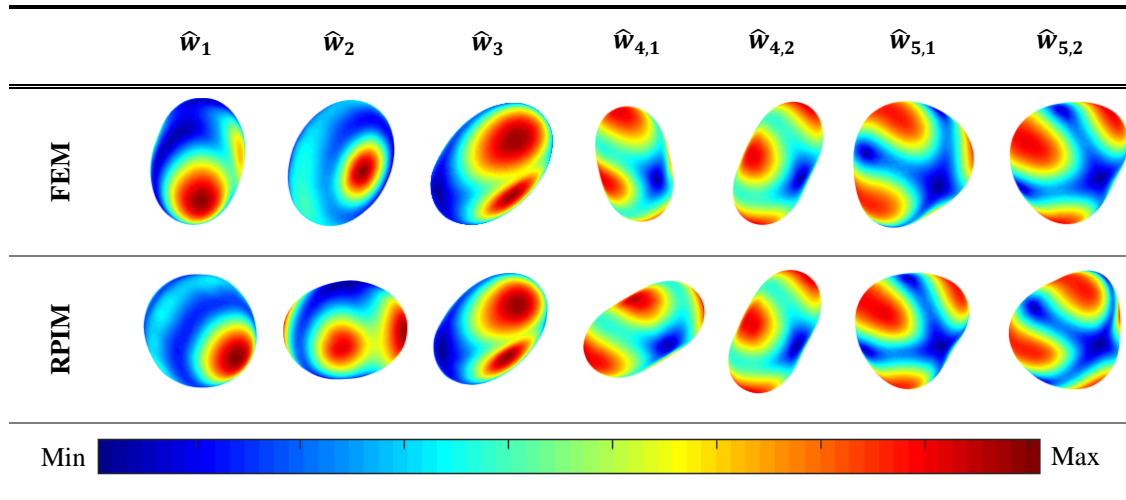


Tabela 5.42- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $6 \mu m$ de altura.

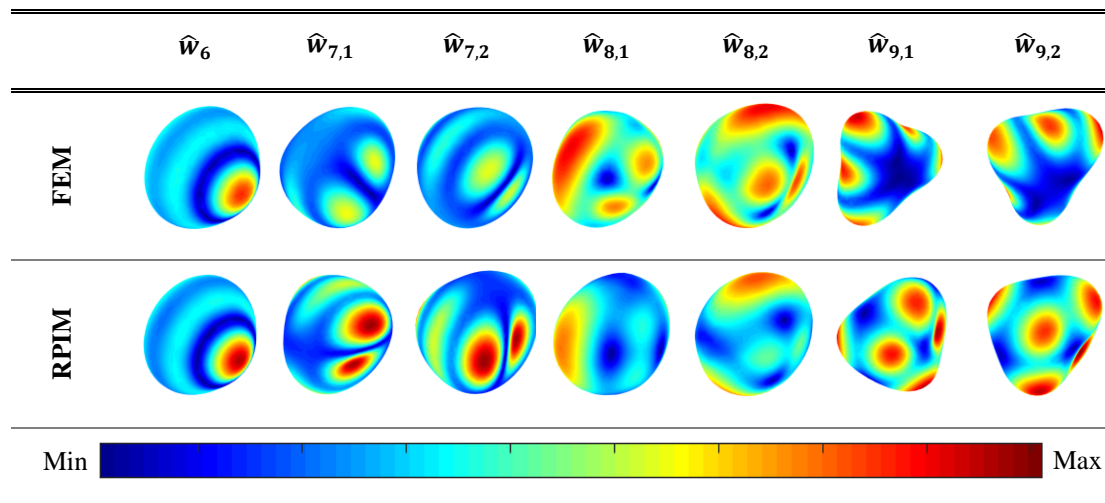


Tabela 5.43- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 6 μm de altura.

	FEM	RPIM
\hat{w}_1	12,0608	12,0511
\hat{w}_2	12,0803	12,1189
\hat{w}_3	12,1270	12,1707
$\hat{w}_{4,1}$	12,6005	12,7184
$\hat{w}_{4,2}$	12,6205	12,7322
$\hat{w}_{5,1}$	15,1722	15,1880
$\hat{w}_{5,2}$	15,1909	15,1912
\hat{w}_6	16,0711	15,5964
$\hat{w}_{7,1}$	16,4426	16,0141
$\hat{w}_{7,2}$	16,5052	16,0428
$\hat{w}_{8,1}$	17,1881	17,2457
$\hat{w}_{8,2}$	17,3182	17,3591
$\hat{w}_{9,1}$	18,2570	18,0236
$\hat{w}_{9,2}$	18,3580	18,0673

A **Tabela 5.44** e a **Tabela 5.45** exibem os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e 7 μm de altura. A **Tabela 5.46** apresenta as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.44- Mapa de cores dos primeiros três modos de vibração livre obtidos com o FEM e RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $7 \mu\text{m}$ de altura.

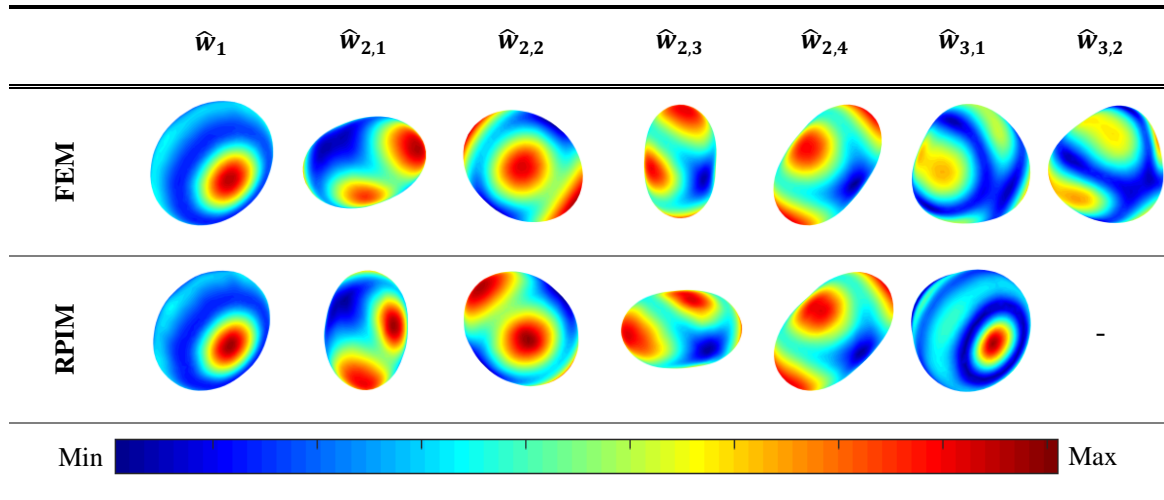


Tabela 5.45- Mapa de cores dos modos de vibração livre com energia mais elevada obtidos com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $7 \mu\text{m}$ de altura.

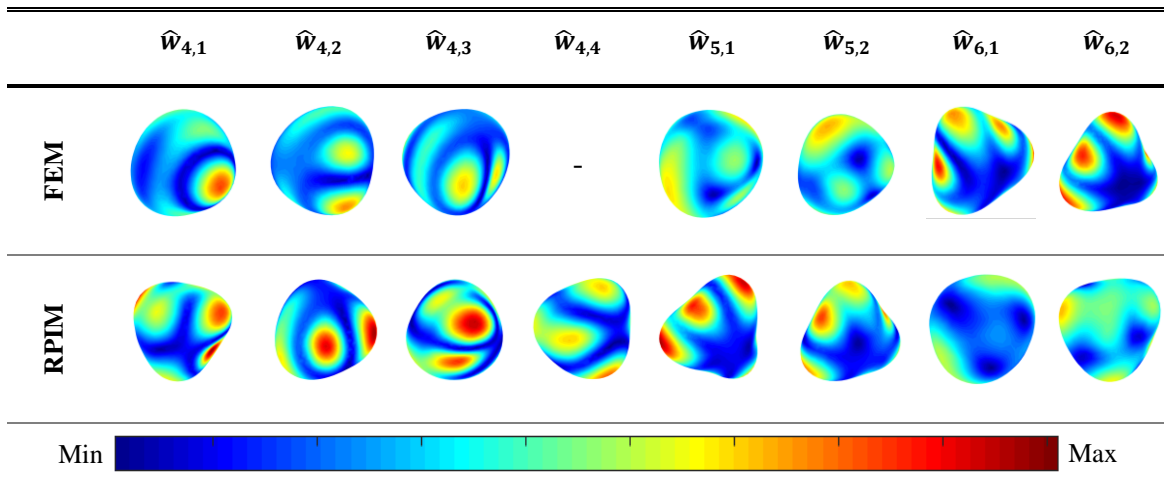


Tabela 5.46- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $7 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
\hat{w}_1	12,10026	12,1944
$\hat{w}_{2,1}$	12,17327	12,31444
$\hat{w}_{2,2}$	12,21662	12,34032
$\hat{w}_{2,3}$	12,51306	12,65209
$\hat{w}_{2,4}$	12,53793	12,67127
$\hat{w}_{3,1}$	16,69006	16,48984
$\hat{w}_{3,2}$	16,75143	-
$\hat{w}_{4,1}$	16,82595	16,69894
$\hat{w}_{4,2}$	17,05973	16,75635
$\hat{w}_{4,3}$	17,12034	16,78661
$\hat{w}_{4,4}$	-	16,81983
$\hat{w}_{5,1}$	17,6715	17,73903
$\hat{w}_{5,2}$	17,70134	17,7957
$\hat{w}_{6,1}$	17,9616	17,82466
$\hat{w}_{6,2}$	17,99332	17,84734

A **Tabela 5.47**, **Tabela 5.48** e a **Tabela 5.49** representam os modos de vibração livre obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $8 \mu m$ de altura. A **Tabela 5.50** exhibe as frequências de vibração para o mesmo modelo.

Tabela 5.47- Mapa de cores do primeiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $8 \mu m$ de altura.

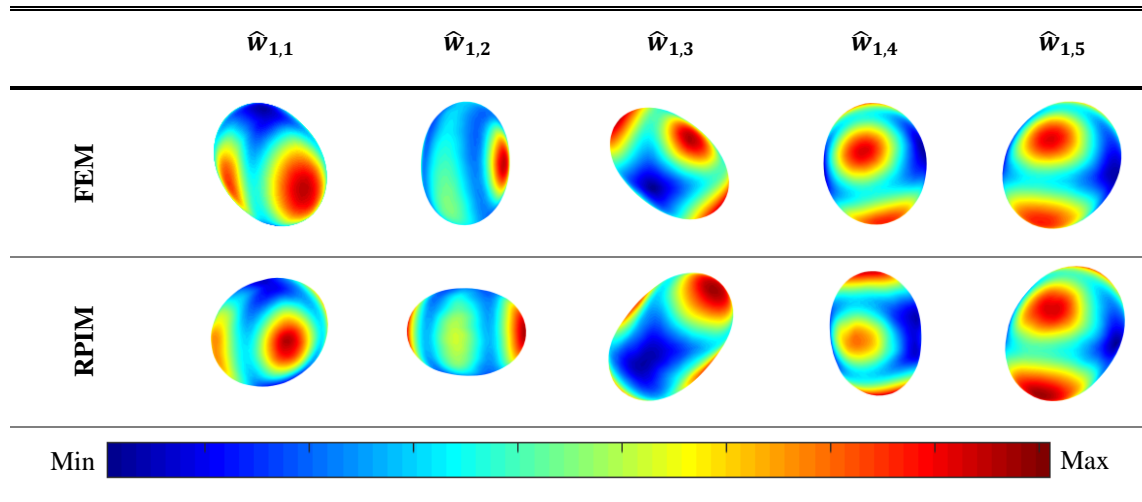


Tabela 5.48- Mapa de cores do segundo modo de vibração livre obtido com os dois métodos estudados: FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $8 \mu m$ de altura.

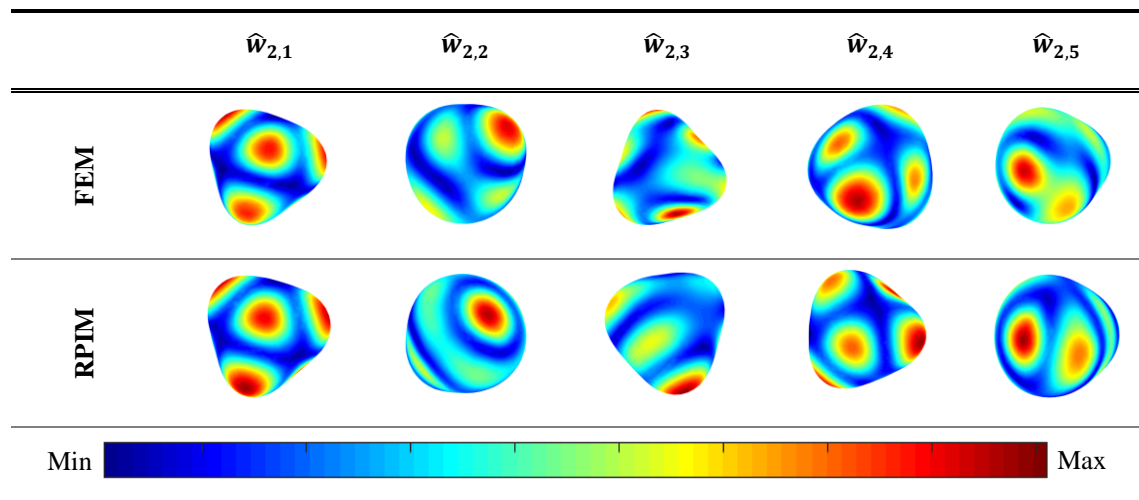


Tabela 5.49- Mapa de cores do terceiro modo de vibração livre obtido com o FEM e o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $8 \mu m$ de altura.

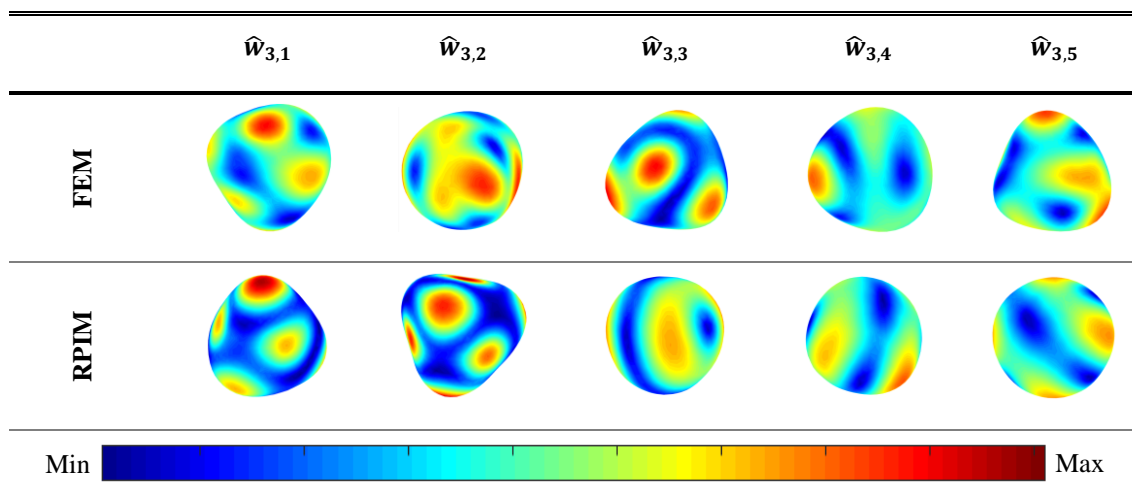


Tabela 5.50- Frequências de vibração obtidos com o FEM e com o RPIM para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose e $8 \mu m$ de altura.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	11,0665	11,1570
$\hat{w}_{1,2}$	11,0868	11,1705
$\hat{w}_{1,3}$	11,1137	11,2008
$\hat{w}_{1,4}$	11,1194	11,2239
$\hat{w}_{1,5}$	11,1363	11,2431
$\hat{w}_{2,1}$	15,9277	15,5389
$\hat{w}_{2,2}$	16,0059	15,6174
$\hat{w}_{2,3}$	16,0402	15,6933
$\hat{w}_{2,4}$	16,0782	15,7324
$\hat{w}_{2,5}$	16,1510	15,7836
$\hat{w}_{3,1}$	16,1741	15,8258
$\hat{w}_{3,2}$	16,1809	15,9031
$\hat{w}_{3,3}$	16,2357	16,1634
$\hat{w}_{3,4}$	16,2417	16,2010
$\hat{w}_{3,5}$	16,2749	16,2146

Analisando os resultados obtidos verifica-se que diferentes geometrias originam diferentes modos e frequências de vibração.

Na **Figura 5.19** é apresentado o gráfico das frequências de vibração para o primeiro modo de vibração, em função da altura, quando considerada a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose.

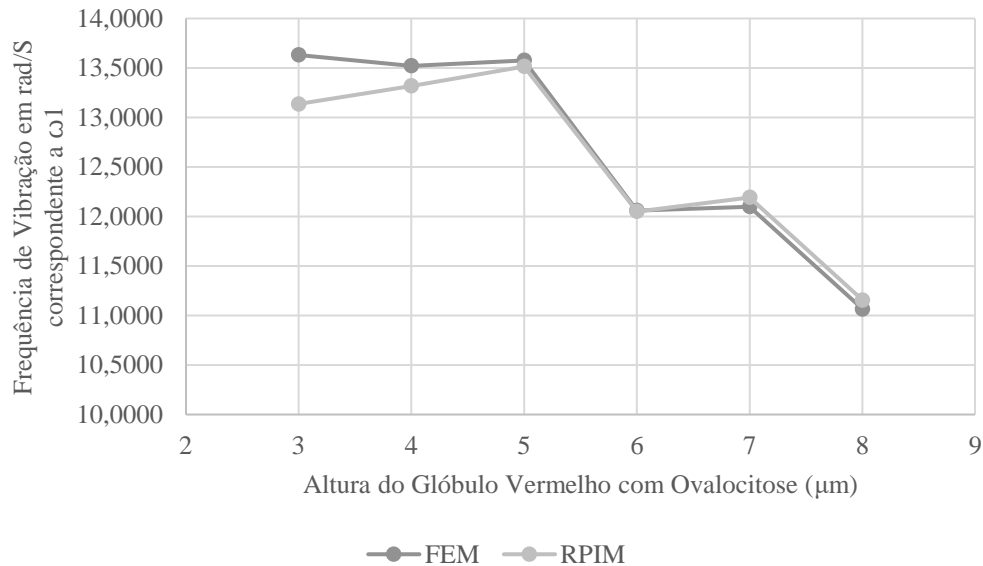


Figura 5.19- Frequências de vibração correspondentes ao primeiro modo de vibração para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” com ovalócitose, considerando as diferentes geometrias.

Com base na **Figura 5.19** podemos afirmar que, considerando o primeiro modo de vibração livre, quando adicionada a membrana à célula com ovalócitose, a frequência de vibração decresce com o aumento da altura da célula.

Na **Tabela 5.51** estão representadas as frequências de vibração obtidas no estudo da fração volúmica homogeneizada da “membrana+citoplasma” do glóbulo vermelho saudável.

Tabela 5.51- Frequências de vibração da fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável.

	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	9,1072	8,1982
$\hat{w}_{1,2}$	9,1462	8,2747
\hat{w}_2	11,1849	8,4568
\hat{w}_3	17,1796	12,8478
$\hat{w}_{4,1}$	17,3129	12,9590
$\hat{w}_{4,2}$	17,3560	16,1720
\hat{w}_5	17,6935	16,2217
$\hat{w}_{6,1}$	18,5012	16,8142
$\hat{w}_{6,2}$	18,6276	16,8658
$\hat{w}_{7,1}$	22,8253	19,1872
$\hat{w}_{7,2}$	23,0087	19,4892
$\hat{w}_{8,1}$	24,0032	20,6100
$\hat{w}_{8,2}$	24,1430	20,8093
\hat{w}_9	25,4780	21,2013

Ao compararmos as primeiras frequências obtidas nestes modelos patológicos, representadas na **Figura 5.19**, com as frequências obtidas para a fração volúmica homogeneizada da “membrana + citoplasma” do glóbulo vermelho saudável, representadas na **Tabela 5.51**, verifica-se que desde que as células com ovalócitose apresentem uma altura entre 3 e 7 μm , não existe coincidência entre a gama de frequências obtidas com os dois tipos células, sendo possível induzir as frequências de vibração obtidas para o primeiro modo de vibração desta célula patológica, sem afetar as células saudáveis. Para alturas superiores, induzir estas frequências de vibração não é tão seguro como seria esperado.

Assim, é possível induzir, por ressonância, o primeiro modo de vibração da célula com patologia para as alturas entre 3 e 7 μm , que variam entre $\hat{\omega} = 12,1003 \text{ rad/s}$ e $\hat{\omega} = 13,5813 \text{ rad/s}$, sem induzir vibração na célula saudável. Devido à semelhança

entre as frequências de vibração das células saudáveis e das células com patologia com altura superior a $7 \mu m$, o tratamento destas células com estas frequências de vibração não é recomendado. No entanto, estes resultados permitem o diagnóstico destas células patológicas, uma vez que ao induzir no meio estas frequências de vibração será possível observar as células com ovalócitose a vibrar (por efeito de ressonância), permitindo a sua distinção das células saudáveis.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

6. Conclusões

Os eritrócitos apresentam uma estrutura única entre os diferentes tipos de células, uma vez que não apresentam núcleo, sendo a sua membrana, a única componente estrutural responsável pelas suas diversas características antigénicas, de transporte e mecânicas. Para além disso, estas células são extremamente importantes no transporte de oxigénio, na regulação do fluxo sanguíneo local e no transporte de dióxido de carbono. A sua geometria e organização estrutural fornecem-lhe uma superfície deformável e resiliente, permitindo a sua passagem por capilares menores que o seu diâmetro.

Alterações patológicas na deformabilidade de eritrócitos estão relacionadas com múltiplas doenças, como malária, anemia falciforme, diabetes e doenças hereditárias, revelando ser necessária uma compreensão da biomecânica dos glóbulos vermelhos de forma a conduzir a um entendimento mais completo destas patologias, uma vez que este tipo de patologia gera um elevado número de diagnósticos e de mortes todos os anos. Assim, existe a necessidade de conhecer as causas, os métodos de progressão e os respetivos tratamentos, com o objetivo de prevenir o aparecimento destas doenças.

Neste trabalho são abordados dois métodos numéricos, o FEM e o RPIM, para simular e determinar as frequências e modos de vibração livres de glóbulos vermelhos saudáveis e com ovalócitose. Uma das grandes vantagens destas ferramentas numéricas é o facto de serem não invasivas.

Nas últimas décadas diversos investigadores tentaram relatar a micromecânica dos glóbulos vermelhos, produzindo vários modelos matemáticos e numéricos. No entanto, a literatura existente ainda é escassa, sendo poucos os estudos relativos à simulação de modelos 2D e 3D de células saudáveis e patológicas focados na determinação dos seus modos de vibração livre.

Com este estudo conclui-se que as frequências e modos de vibração sofrem alterações de acordo com as características dos glóbulos vermelhos, dependendo principalmente da sua geometria e das suas propriedades mecânicas. Além disso, frequências de vibração mais baixas são mais fáceis de identificar, uma vez que produzem modos de vibração mais simples.

Tanto no estudo de convergência da esfera como do glóbulo vermelho saudável, foi possível observar que as malhas utilizadas ainda não permitiam atingir a convergência.

No entanto, malhas com cerca de 4000 nós já permitem obter resultados muito próximos da solução de convergência. Foi também observado que o tempo de processamento é bastante elevado, foram utilizadas malhas entre os 3000 e os 4000 nós, devido ao custo computacional ser menor e, porque as alterações nos resultados não são significativas, quando comparados com malhas com um número de nós mais elevado. Para além disso, verificou-se também que os resultados alcançados com o FEM e com o RPIM são semelhantes.

No estudo das células com citoplasma homogeneizado, constatou-se que não é possível induzir vibração nas células com patologia sem fazer vibrar as células saudáveis. No entanto, a análise das células com membrana permitiu definir que, as frequências de vibração do primeiro modo podem ser utilizadas para excitar as células com ovalócitose que apresentem altura entre 3 e 7 μm , possibilitando a identificação desta patologia. Contudo, para alturas superiores, a utilização destas frequências não é tão segura, não sendo recomendada a aplicação destas frequências para terapia, permitindo apenas o diagnóstico desta patologia.

Por fim, quando é adicionada a membrana à célula existe uma enorme variação das frequências e modos de vibração, sendo superiores para os modelos com a fração volúmica da membrana homogeneizada + citoplasma, podendo-se concluir que, a membrana do glóbulo vermelho é muito resistente.

Referências

- [1] T. W. Secomb, “Red blood cell mechanics and Capillary Blood Rheology,” *Cell Biophys.*, vol. 18, no. 3, pp. 231–251, 1992.
- [2] B. J. Bain, “Structure and function of red and white blood cells,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 45, no. 5, pp. 25–30, 2017.
- [3] G. Tomaiuolo, “Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 5, p. 051501, 2014.
- [4] J. Kim, H. Lee, and S. Shin, “Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review,” *J. Cell. Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 63–79, 2015.
- [5] S. Chien, “Red cell deformability and its relevance to blood flow,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 49, pp. 177–192, 1987.
- [6] J. Ford, “Red blood cell morphology,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 35, no. 3, pp. 351–357, 2013.
- [7] K. Haldar and N. Mohandas, “Erythrocyte remodeling by malaria parasites,” *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 14, no. 3, pp. 203–209, 2007.
- [8] A. S. Ademiloye, L. W. Zhang, and K. M. Liew, “Element-Free Multiscale Modeling of Large Deformation Behavior of Red Blood Cell Membrane With Malaria Infection,” *bioRxiv*, pp. 316–319, 2017.
- [9] C. E. Miller and C. S. Henriquez, “Three-Dimensional Finite Element Solution for Biopotentials: Erythrocyte in an Applied Field,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 35, no. 9, pp. 712–718, 1988.
- [10] K. Tsubota, S. Wada, H. Kamada, and Y. Kitagawa, “A Particle Method for Blood Flow Simulation: Application to Flowing Red Blood Cells and Platelets,” *J. Earth Simulator*, vol. 5, pp. 2–7, 2006.
- [11] J. Belinha, “Meshless Methods: The Future of Computational Biomechanical Simulation,” *J. Biom. Biostat.*, vol. 07, no. 04, 2016.
- [12] N. Mohandas and P. G. Gallagher, “Red cell membrane: past, present, and future,” *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 3939–3948, Nov. 2008.
- [13] A. S. Ademiloye, L. W. Zhang, and K. M. Liew, “Multiscale Meshfree Analysis

- of the Effects of Thermal Treatments on Deformability of Red Blood Cell Membrane,” in *2016 IEEE 16th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering*, Oct. 2016, pp. 186–191.
- [14] M. T. Ahmadian, K. Firoozbakhsh, and M. Hasanian, “Simulation of red blood cell motion in microvessels using modified moving particle semi-implicit method,” *Sci. Iran.*, vol. 19, no. 1, pp. 113–118, 2012.
- [15] S. K. Ballas and S. H. Krasnow, “Structure of erythrocyte membrane and its transport functions,” *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 209–219, 1980.
- [16] J. Belinha, R. . Natal Jorge, J. . Reis Campos, M. A. Vaz, and J. Tavares, *Biodental Engineering V: Proceedings of the 5th International Conference on Biodental Engineering*. 2018.
- [17] S. E. Lux, “Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions,” *Blood*, vol. 127, no. 2, pp. 187–199, 2016.
- [18] J. Narla and N. Mohandas, “Red cell membrane disorders,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 39, no. 1, pp. 47–52, 2017.
- [19] I. Andolfo, R. Russo, A. Gambale, and A. Iolascon, “New insights on hereditary erythrocyte membrane defects,” *Haematologica*, vol. 101, no. 11, pp. 1284–1294, 2016.
- [20] Z. Peng, R. J. Asaro, and Q. Zhu, “Multiscale simulation of erythrocyte membranes,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 81, no. 3, pp. 1–11, 2010.
- [21] J. E. Smith, “Erythrocyte Membrane: Structure, Function, and Pathophysiology,” *Vet. Pathol.*, vol. 24, no. 6, pp. 471–476, 1987.
- [22] T. Shiga, N. Maeda, and K. Kon, “Erythrocyte rheology,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 10, no. 1, pp. 9–48, 1990.
- [23] F. Leterrier, J. Saint-Blancard, and J. F. Stoltz, “Biophysical, morphological and rheological modifications of the erythrocyte during storage: A review,” *Clin. Hemorheol.*, vol. 3, no. 1, pp. 53–95, 1983.
- [24] V. Kuhn *et al.*, “Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 26, no. 13,

- pp. 1–72, 2017.
- [25] N. Hamasaki and M. Yamamoto, “Red Blood Cell Function and Blood Storage,” *Vox Sang.*, vol. 79, no. 4, pp. 191–197, 2000.
- [26] G. A. Barabino, M. O. Platt, and D. K. Kaul, “Sickle cell biomechanics,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 12, pp. 345–367, 2010.
- [27] M. Musielak, “Red blood cell-deformability measurement: Review of techniques,” *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 42, no. 1, pp. 47–64, 2009.
- [28] N. Mohandas and E. Evans, “Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 23, no. 1, pp. 787–818, 1994.
- [29] A. Iolascon, I. Andolfo, and R. Russo, “Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders,” *Br. J. Haematol.*, vol. 187, no. 1, pp. 13–24, 2019.
- [30] A. V. Buys, M. J. Van Rooy, P. Soma, D. Van Papendorp, B. Lipinski, and E. Pretorius, “Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: A scanning electron and atomic force microscopy study,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–6, 2013.
- [31] G. Lippi and C. Mattiuzzi, “Updated Worldwide Epidemiology of Inherited Erythrocyte Disorders,” *Acta Haematol.*, vol. 143, no. 3, pp. 196–203, 2019.
- [32] S. M. Hosseini and J. J. Feng, “How malaria parasites reduce the deformability of infected red blood cells,” *Biophys. J.*, vol. 103, no. 1, pp. 1–10, 2012.
- [33] M. Castillo-Riquelme, D. McIntyre, and K. Barnes, “Household burden of malaria in South Africa and Mozambique: Is there a catastrophic impact?,” *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 13, no. 1, pp. 108–122, 2008.
- [34] R. I. Chima, C. A. Goodman, and A. Mills, “The economic impact of malaria in Africa: A critical review of the evidence,” *Health Policy (New York)*, vol. 63, no. 1, pp. 17–36, 2003.
- [35] J. L. Gallup and J. D. Sachs, “The economic burden of malaria,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 64, no. 1–2, pp. 85–96, 2001.
- [36] F. B. Piel, S. I. Hay, S. Gupta, D. J. Weatherall, and T. N. Williams, “Global

- Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions,” *PLoS Med.*, vol. 10, no. 7, 2013.
- [37] D. C. Rees, T. N. Williams, and M. T. Gladwin, “Sickle-cell disease,” *Lancet*, vol. 376, no. 9757, pp. 2018–2031, 2010.
- [38] W. Jastaniah, “Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia,” *Ann. Saudi Med.*, vol. 31, no. 3, pp. 289–293, 2011.
- [39] L. Gardete-Correia *et al.*, “First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study,” *Diabet. Med.*, vol. 27, no. 8, pp. 879–881, 2010.
- [40] W. Yang *et al.*, “Economic costs of diabetes in the U.S. in 2017,” *Diabetes Care*, vol. 41, no. 5, pp. 917–928, 2018.
- [41] P. Zhang *et al.*, “Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 87, no. 3, pp. 293–301, 2010.
- [42] C. Mapa-Tassou, J. C. Katte, C. Mba Maadjhou, and J. C. Mbanya, “Economic Impact of Diabetes in Africa,” *Curr. Diab. Rep.*, vol. 19, no. 2, pp. 1–8, 2019.
- [43] N. Tangpukdee, C. Duangdee, P. Wilairatana, and S. Krudsood, “Malaria diagnosis: A brief review,” *Korean J. Parasitol.*, vol. 47, no. 2, pp. 93–102, 2009.
- [44] A. F. Cowman and B. S. Crabb, “Invasion of red blood cells by malaria parasites,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 755–766, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.006.
- [45] B. M. Cooke, N. Mohandas, and R. L. Coppel, “The malaria-infected red blood cell: Structural and functional changes,” *Adv. Parasitol.*, vol. 50, pp. 1–86, 2001.
- [46] F. K. Glenister, R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas, and B. M. Cooke, “Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells,” *Blood*, vol. 99, no. 3, pp. 1060–1063, 2002.
- [47] D. A. Fedosov, B. Caswell, and G. E. Karniadakis, “Wall shear stress-based model for adhesive dynamics of red blood cells in malaria,” *Biophys. J.*, vol. 100, no. 9, pp. 2084–2093, 2011.
- [48] T. Wu and J. J. Feng, “Simulation of malaria-infected red blood cells in microfluidic channels: Passage and blockage,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 4, 2013.

- [49] S. Manciu, E. Matei, and B. Trandafir, “Hereditary spherocytosis - diagnosis, surgical treatment and outcomes. A literature review,” *Chirurgia (Bucur.)*, vol. 112, no. 2, pp. 110–116, 2017.
- [50] A. Ashley-Koch, Q. Yang, and R. S. Olney, “Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGE Review,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 151, no. 9, pp. 839–845, 2000.
- [51] H. S. Byun *et al.*, “Optical measurement of biomechanical properties of individual erythrocytes from a sickle cell patient,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 11, pp. 4130–4138, 2012.
- [52] H. Y. Chang, X. Li, and G. E. Karniadakis, “Modeling of Biomechanics and Biorheology of Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Mellitus,” *Biophys. J.*, vol. 113, no. 2, pp. 481–490, 2017.
- [53] J. G. Mohanty, D. M. Eckley, J. D. Williamson, L. J. Launer, and J. M. Rifkind, “Do red blood cell- β -amyloid interactions alter oxygen delivery in alzheimer’s disease?,” *Oxyg. Transp. to Tissue XXIX*, pp. 29–35, 2008.
- [54] F. Baldacci *et al.*, “Potential Diagnostic Value of Red Blood Cells α -Synuclein Heteroaggregates in Alzheimer’s Disease,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 9, pp. 6451–6459, 2019.
- [55] C. Y. J. Lee, K. C. Kim, H. W. Park, J. H. Song, and C. H. Lee, “Rheological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia,” *Microvasc. Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 133–138, 2004.
- [56] J. G. Wang and G. R. Liu, “A point interpolation meshless method based on radial basis functions,” *Int. J. Numer. Methods Eng.*, vol. 54, no. 11, pp. 1623–1648, 2002.
- [57] R. Campilho, *Método de Elementos Finitos - Ferramentas para Análise Estrutural*, Publindúst. 2012.
- [58] F. T. Dias, J. P. Cruz, R. A. F. Valente, and R. J. A. Sousa, *Método dos Elementos Finitos Técnicas de Simulação Numérica em Engenharia*. 2010.
- [59] S. Trivedi, “Finite element analysis: A boon to dentistry,” *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 200–203, 2014.

- [60] S. K. Parashar and J. K. Sharma, “A review on application of finite element modelling in bone biomechanics,” *Perspect. Sci.*, vol. 8, pp. 696–698, 2016.
- [61] J. Fish and T. Belytschko, *A First Course in Finite Elements*. 2007.
- [62] M. M. A. Peyroteo, J. Belinha, S. Vinga, L. M. J. S. Dinis, and R. M. Natal Jorge, “Mechanical bone remodelling: Comparative study of distinct numerical approaches,” *Eng. Anal. Bound. Elem.*, pp. 125–139, 2019.
- [63] J. Belinha, *Meshless Methods in Biomechanics - Bone Tissue Remodelling Analysis*. 2014.
- [64] J. Belinha, A. L. Araújo, A. J. M. Ferreira, L. M. J. S. Dinis, and R. M. Natal Jorge, “The analysis of laminated plates using distinct advanced discretization meshless techniques,” *Compos. Struct.*, vol. 143, pp. 165–179, 2016.
- [65] T. Belytschko, Y. Krongauz, D. Organ, M. Fleming, and P. Krysl, “Meshless methods: An overview and recent developments,” *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.*, vol. 139, no. 1–4, pp. 3–47, 1996.
- [66] L. M. J. S. Dinis, R. M. Natal Jorge, and J. Belinha, “Analysis of 3D solids using the natural neighbour radial point interpolation method,” *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.*, vol. 196, no. 13–16, pp. 2009–2028, 2007.
- [67] M. Ju *et al.*, “A review of numerical methods for red blood cell flow simulation,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 18, no. 2, pp. 130–140, 2013.
- [68] J. B. Freund, “Numerical simulation of flowing blood cells,” *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 46, pp. 67–95, 2014.
- [69] T. J. Chung, *Computational Fluid Dynamics*, Second Edi. New York, 2010.
- [70] T. Ye, N. Phan-Thien, and C. T. Lim, “Particle-based simulations of red blood cells—A review,” *J. Biomech.*, vol. 49, no. 11, pp. 2255–2266, 2016.
- [71] A. Boccaccio, A. Ballini, C. Pappalettere, D. Tullo, S. Cantore, and A. Desiate, “Finite Element Method (FEM), Mechanobiology and Biomimetic Scaffolds in Bone Tissue Engineering,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 112–132, 2011.
- [72] Z. Li, M. W. Kindig, J. R. Kerrigan, R. W. Kent, and J. R. Crandall, “Development and validation of a subject-specific finite element model of a human clavicle,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 16, no. 8, pp. 819–829, 2013.

- [73] V. P. Nguyen, T. Rabczuk, S. Bordas, and M. Duflot, “Meshless methods: A review and computer implementation aspects,” *Math. Comput. Simul.*, vol. 79, no. 3, pp. 763–813, 2008.
- [74] K. Kovářík, J. Mužík, and M. S. Mahmood, “A meshless solution of two-dimensional unsteady flow,” *Eng. Anal. Bound. Elem.*, vol. 36, no. 5, pp. 738–743, 2012.
- [75] Singeresu S. Rao, *The Finite Element Method in Engineering*, Sixth Edit. United States, 2018.
- [76] F. Williamson, “An historical note on the finite element method,” *Int. J. Numer. Methods Eng.*, vol. 15, no. 6, pp. 930–934, 1980.
- [77] R. COURANT, “Variational methods for the solution of problems of equilibrium and vibrations,” *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–23, 1943.
- [78] M. J. TURNER, R. W. CLOUGH, H. C. MARTIN, and L. J. TOPP, “Stiffness and Deflection Analysis of Complex Structures,” *J. Aeronaut. Sci.*, vol. 23, no. 9, pp. 805–823, 1956.
- [79] R. Huiskes and E. Y. S. Chao, “A survey of finite element analysis in orthopedic biomechanics: The first decade,” *J. Biomech.*, vol. 16, no. 6, pp. 385–409, 1983.
- [80] P. K. Basu, A. G. Beall, and D. J. Simmons, “3-D Femoral Stress Analysis using CT Scans and p-version FEM,” *Biomater. Med. Devices. Artif. Organs*, vol. 13, no. 3–4, pp. 163–186, 1985.
- [81] A. E. Anderson, B. J. Ellis, S. A. Maas, and J. A. Weiss, “Effects of idealized joint geometry on finite element predictions of cartilage contact stresses in the hip,” *J. Biomech.*, vol. 43, no. 7, pp. 1351–1357, 2010.
- [82] A. Ural, P. Zioupos, D. Buchanan, and D. Vashishth, “The effect of strain rate on fracture toughness of human cortical bone: A finite element study,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 7, pp. 1021–1032, 2011.
- [83] M. Bessho, I. Ohnishi, J. Matsuyama, T. Matsumoto, K. Imai, and K. Nakamura, “Prediction of strength and strain of the proximal femur by a CT-based finite element method,” *J. Biomech.*, vol. 40, no. 8, pp. 1745–1753, 2007.

-
- [84] E. Basafa, R. S. Armiger, M. D. Kutzer, S. M. Belkoff, S. C. Mears, and M. Armand, "Patient-specific finite element modeling for femoral bone augmentation," *Med. Eng. Phys.*, vol. 35, no. 6, pp. 860–865, 2013.
- [85] R. Sherekar, A. Ganjare, and A. Pawar, "Finite element analysis of human clavicle bone: A methodology review," *Am. J. Mech. Eng. Autom.*, vol. 1, no. 5, pp. 54–59, 2014.
- [86] B. R. Simon *et al.*, "Evaluation of one-, two-, and three-dimensional finite element and experimental models of internal fixation plates," *J. Biomech.*, vol. 10, no. 2, pp. 79–86, 1977.
- [87] D. Lacroix, A. Chateau, M. P. Ginebra, and J. A. Planell, "Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds," *Biomaterials*, vol. 27, no. 30, pp. 5326–5334, 2006.
- [88] C. Sandino, J. A. Planell, and D. Lacroix, "A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering," *J. Biomech.*, vol. 41, no. 5, pp. 1005–1014, 2008.
- [89] W. Ying and C. S. Henriquez, "Hybrid finite element method for describing the electrical response of biological cells to applied fields," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 54, no. 4, pp. 611–620, 2007.
- [90] T. Ganesh, L. E. Laughrey, M. Niroobakhsh, and N. Lara-Castillo, "Multiscale finite element modeling of mechanical strains and fluid flow in osteocyte lacunocanalicular system," *Bone*, vol. 137, p. 115328, 2020.
- [91] Y. Liu, K. Mollaeian, and J. Ren, "Finite element modeling of living cells for AFM indentation-based biomechanical characterization," *Micron*, vol. 116, pp. 108–115, 2019.
- [92] N. Slomka and A. Gefen, "Confocal microscopy-based three-dimensional cell-specific modeling for large deformation analyses in cellular mechanics," *J. Biomech.*, vol. 43, no. 9, pp. 1806–1816, 2010.
- [93] R. Zielinski, C. Mihai, D. Kniss, and S. N. Ghadiali, "Finite element analysis of traction force microscopy: Influence of cell mechanics, adhesion, and morphology," *J. Biomech. Eng.*, vol. 135, no. 7, pp. 1–9, 2013.
- [94] S. Dong, Z. Long, L. Tang, Y. Jiang, and Y. Yan, "Simulation of growth and

- division of 3d cells based on finite element method,” *Int. J. Appl. Mech.*, vol. 6, no. 4, pp. 1–17, 2014.
- [95] S. Dong, Y. Yan, L. Tang, J. Meng, and Y. Jiang, “Simulation of 3D tumor cell growth using nonlinear finite element method,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 19, no. 8, pp. 807–818, 2016.
- [96] M. Saeed, O. Sharabani-Yosef, D. Weihs, and A. Gefen, “A phase-contrast microscopy-based method for modeling the mechanical behavior of mesenchymal stem cells,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 19, no. 13, pp. 1359–1362, 2016.
- [97] I. Cinelli, M. Destrade, M. Duffy, and P. McHugh, “Electrothermal equivalent three-dimensional finite-element model of a single neuron,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 65, no. 6, pp. 1373–1381, 2017.
- [98] D. Shamoon *et al.*, “Assessing the electro-deformation and electro-poration of biological cells using a three-dimensional finite element model,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 114, no. 6, 2019.
- [99] C. C. W. Hsia, R. L. Johnson, and D. Shah, “Red cell distribution and the recruitment of pulmonary diffusing capacity,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 86, no. 5, pp. 1460–1467, 1999.
- [100] M. Sugihara-Seki and R. Skalak, “Numerical study of asymmetric flows of red blood cells in capillaries,” *Microvasc. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 64–74, 1988.
- [101] A. Laadhari, P. Saramito, and C. Misbah, “An adaptive finite element method for the modeling of the equilibrium of red blood cells,” *Int. J. Numer. Methods Fluids*, vol. 80, no. 7, pp. 397–428, 2016.
- [102] T. W. Secomb, B. Styp-Rekowska, and A. R. Pries, “Two-dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 35, no. 5, pp. 755–765, 2007.
- [103] R. Garg, H. Chandra Thakur, and B. Tripathi, “A Review of Applications of Meshfree Methods in the area of Heat Transfer and Fluid Flow: MLPG method in particular,” *Int. Res. J. Eng. Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 329–338, 2015.
- [104] J. Belinha, L. M. J. S. Dinis, and R. M. Natal Jorge, “The meshless methods in the bone tissue remodelling analysis,” *Procedia Eng.*, vol. 110, pp. 51–58, 2015.

- [105] K. M. Liew, H. Y. Wu, and T. Y. Ng, “Meshless method for modeling of human proximal femur: Treatment of nonconvex boundaries and stress analysis,” *Comput. Mech.*, vol. 28, no. 5, pp. 390–400, 2002.
- [106] H. Roohani Ghehsareh, M. S. Seidzadeh, and S. K. Etesami, “Numerical simulation of a generalized anomalous electro-diffusion process in nerve cells by a localized meshless approach in Pseudospectral mode,” *Int. J. Numer. Model. Electron. Networks, Devices Fields*, vol. 33, no. 6, pp. 1–21, 2020.
- [107] M. Dehghan and N. Narimani, “An element-free Galerkin meshless method for simulating the behavior of cancer cell invasion of surrounding tissue,” *Appl. Math. Model.*, vol. 59, pp. 500–513, 2018.
- [108] A. Guerra, J. Belinha, and R. Natal Jorge, “A preliminary study of endothelial cell migration during angiogenesis using a meshless method approach,” *Int. j. numer. method. biomed. eng.*, vol. 36, no. 11, pp. 1–17, 2020.
- [109] H. Jahanshahi, K. Shanazari, M. Mesrizadeh, S. Soradi-Zeid, and J. F. Gómez-Aguilar, “Numerical analysis of Galerkin meshless method for parabolic equations of tumor angiogenesis problem,” *Eur. Phys. J. Plus*, vol. 135, no. 11, 2020.
- [110] L. W. Zhang, A. S. Ademiloye, and K. M. Liew, “A multiscale Cauchy–Born meshfree model for deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum,” *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 101, pp. 268–284, 2017, doi: 10.1016/j.jmps.2017.01.009.
- [111] T. Yamaguchi, T. Ishikawa, and Y. Imai, “Particle Based Modeling and Simulation of the Red Blood Cell Infected by Malaria -Mechanism of the Margination of the Infected Red Blood Cell-,” no. August, pp. 22–24, 2011.
- [112] H.-N. Polwaththe-Gallage, Y. Gu, S. C. Saha, W. Senadeera, and A. Oloyede, “Numerical simulation of red blood cells’ deformation using SPH method,” *4th Int. Conf. Comput. Methods (ICCM 2012)*, pp. 25–28, 2012.
- [113] E. Coccia, V. Fafone, G. Frossati, E. Ter Haar, and M. W. Meisel, “Eigenfrequencies and quality factors of vibration of aluminium alloy spherical resonators,” *Phys. Lett. Sect. A Gen. At. Solid State Phys.*, vol. 219, no. 5–6, pp. 263–270, 1996, doi: 10.1016/0375-9601(96)00452-5.
- [114] V. Heinrich, K. Ritchie, N. Mohandas, and E. Evans, “Elastic thickness

- compressibility of the red cell membrane,” *Biophys. J.*, vol. 81, no. 3, pp. 1452–1463, 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75800-6.
- [115] E. A. Evans, R. Waugh, and L. Melnik, “Elastic area compressibility modulus of red cell membrane,” *Biophys. J.*, vol. 16, no. 6, pp. 585–595, 1976, doi: 10.1016/S0006-3495(76)85713-X.
- [116] S. Hénon, G. Lenormand, A. Richert, and F. Gallet, “A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers,” *Biophys. J.*, vol. 76, no. 2, pp. 1145–1151, 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77279-6.
- [117] A. S. Ademiloye, L. W. Zhang, and K. M. Liew, “Numerical computation of the elastic and mechanical properties of red blood cell membrane using the higher-order Cauchy-Born rule,” *Appl. Math. Comput.*, vol. 268, pp. 334–353, 2015, doi: 10.1016/j.amc.2015.06.071.
- [118] C. Nixon *et al.*, “Accurate light microscopic diagnosis of Southeast Asian Ovalocytosis,” *Br. J. Haematol.*, vol. 40, no. 6, pp. 655–662, 2018.
- [119] S. Muñoz, J. L. Sebastián, M. Sancho, and J. M. Miranda, “Transmembrane voltage induced on altered erythrocyte shapes exposed to RF fields,” *Bioelectromagnetics*, vol. 25, no. 8, pp. 631–633, 2004.

Anexos

Anexo A

Neste anexo são apresentadas as frequências de vibração obtidas no estudo de convergência do glóbulo vermelho saudável utilizadas para construção dos gráficos presentes na secção 5.2.

Tabela A.0.1- Frequências de vibração, expressas em rad/s, obtidas no estudo de convergência do glóbulo vermelho saudável.

	767 nós		1747 nós		3275 nós		6001 nós	
	FEM	RPIM	FEM	RPIM	FEM	RPIM	FEM	RPIM
$\hat{w}_{1,1}$	1,55426	1,16681	1,57109	1,26488	1,562841	1,325897	1,53692	1,36501
$\hat{w}_{1,2}$	1,57292	1,18336	1,57789	1,27454	1,57134	1,330722	1,54594	1,36862
\hat{w}_2	2,76409	2,05476	2,82837	2,18866	2,800977	2,270628	2,7037	2,32892
$\hat{w}_{3,1}$	3,06014	2,56343	3,18842	2,78477	3,267507	2,934779	3,30923	3,03101
$\hat{w}_{3,2}$	3,07843	2,56672	3,2047	2,80481	3,272536	2,944715	3,31496	3,03933
$\hat{w}_{4,1}$	3,19012	2,98307	3,28625	3,14486	3,333149	3,240676	3,33928	3,30019
$\hat{w}_{4,2}$	3,25474	3,00534	3,33007	3,1567	3,362621	3,246926	3,34849	3,30394
$\hat{w}_{5,1}$	3,9393	3,96154	4,23128	4,26895	4,399753	4,423668	4,50909	4,51838
$\hat{w}_{5,2}$	3,98098	3,96909	4,23515	4,27576	4,411243	4,435336	4,51577	4,52598
$\hat{w}_{6,1}$	4,81959	3,99883	5,02008	4,28275	5,058544	4,446044	5,03263	4,55965
$\hat{w}_{6,2}$	4,93256	4,01191	5,04821	4,30257	5,092838	4,456768	5,04537	4,56313
$\hat{w}_{7,1}$	4,97417	4,05994	5,10143	4,36078	5,184708	4,620945	5,20223	4,77645
$\hat{w}_{7,2}$	4,98408	4,11065	5,11833	4,39087	5,208922	4,62257	5,23268	4,79092
\hat{w}_8	5,06155	4,78672	5,23333	5,0591	5,33927	5,227472	5,40395	5,33235

Anexo B

Neste anexo são apresentados os tempos de processamento total, em segundos, utilizados para construção do gráfico presente na secção 5.2.

Tabela B.0.2- Tempo de processamento total que o FEMAS leva a gerar resultados para as malhas com diferentes números de nós.

	FEM	RPIM
767 nós	48	70
1747 nós	130	212
3275 nós	658	810
6001 nós	3214	3156