

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo do Potencial Zeta e da Elasticidade de
Eritrócitos utilizando Pinças Ópticas e Avaliação
da Ação Conservante do Polifosfato de Sódio
sobre Eritrócitos**

Aluno: Cauêh Nunes Jovino

Orientadora: Prof^a. Dra. Beate Saegesser Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Fontes

Recife, 28 de Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo do Potencial Zeta e da Elasticidade de
Eritrócitos utilizando Pinças Ópticas e Avaliação
da Ação Conservante do Polifosfato de Sódio
sobre Eritrócitos**

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

Aluno: Cauêh Nunes Jovino

Orientadora: Prof^a. Dra. Beate Saegesser Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Fontes

Recife, 28 de Fevereiro de 2011.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 28 de fevereiro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Beate Saegesser Santos.
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite.
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior.
(Universidade Estadual da Paraíba - UEPB).

Assinatura: _____

Aos meus pais Leno e Docarmo, força e coragem, pelo apoio e amor incessantes;
Às minhas irmãs, Mona Larissa e Myrna Laila, minhas melhores amigas;
À minha Clarinha, pela compreensão e amor, pelos momentos vividos e a viver;
Em especial à professora Beate Saegesser, por todas as oportunidades, orientação e amizade. A quem serei eternamente grato;
À admirável professora Adriana Fontes, pela orientação, disposição e grande contribuição;
Ao amigo Diego “CIODs”, companheiro de trabalho, por toda a ajuda e animo nas horas mais difíceis;
A todos os meus parentes, em especial aos meus primos Leandro, Evandro, Junior e Fabrício, verdadeiros irmãos;
Às minhas companheiras Raiane, Fernanda e Ramara, e ao amigo Tiago Gomes por dividir não só despesas, mas muitas alegrias;
À Dona Dadá, Sr. George e Catarina por quem nutro carinho de família;
À todos os amigos do Laboratório Professor Ricardo Ferreira;
Por toda a compreensão, agradeço os amigos Antônio Edson, Maria José, Fernando Arashiro, Emilia Shigueoka e Pedro Henrique, companheiros de uma nova empreitada;
Às Dras. Sheyla Lucena e Ana Maria, e todo o pessoal do serviço de Fracionamento do HEMOPE, em especial ao Carlos;
Aos eternos amigos Jurema, Guilherme, Henrique, Kico, Franco, Rinaldo, Igor, Marquinhos, Mineiro, Chiquinho, Kamila, Ludmilla e Cristopher, “sempre perto do coração”;
Aos amigos Martônio e Eugênio, por toda a alegria de viver;
À minha avó, Dona Mariinha, quem mais admiro, de um coração sem tamanho.

Ao Pai Celestial, por toda graça.

DEDICATÓRIA.....	iv
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Propriedades Biológicas do Eritrócito.....	20
3.1.1 A Membrana Eritrocitária	21
3.1.2 Potencial Zeta da Membrana Eritrocitária	23
3.1.3 Metabolismo do Eritrócito.....	24
3.1.4 Elasticidade do Eritrócito	27
3.2 O Concentrado de Hemácias.....	28
3.2.1 Metabolismo do eritrócito em armazenamento.....	29
3.2.2 Soluções Preservantes	31
3.3 O Polifosfato	32
3.4 Pinça óptica como ferramenta de manipulação celular.....	34
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Coleta e preparação das amostras de concentrados de hemácias.....	39
4.2 Avaliação preliminar do efeito do polifosfato sob hemácias	40
4.3 Inclusão estéril do polifosfato nas bolsas de concentrado de hemácias.....	41
4.4 Testes de controle de qualidade em bolsas de concentrado de hemácias	41
4.5 Avaliação do efeito do polifosfato sobre a coagulação (TP e TTPA).....	42
4.6 Montagem do aparato da pinça óptica.....	43
4.7 Quantificação do Potencial Zeta	46
4.8 Quantificação da Elasticidade.....	48
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1 Resultados da avaliação preliminar do efeito do polifosfato de sódio sobre hemácias	52
5.2 Resultados dos testes de controle de qualidade de concentrados de hemácias com e sem o polifosfato de sódio	53
5.3 Resultados da avaliação do efeito do polifosfato sobre o tempo de coagulação.....	54

5.4 Resultados das quantificações da elasticidade dos eritrócitos pela técnica da pinça óptica	55
5.5 Resultados da avaliação do efeito do polifosfato de sódio sobre a elasticidade de eritrócitos em armazenamento.....	59
5.6 Resultados das quantificações de potencial Zeta dos eritrócitos pela técnica da pinça óptica	60
<i>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</i>	<i>63</i>
<i>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>65</i>

1,3-DPG – 1,3 difosfoglicerato

2,3 DPG – 2,3 difosfoglicerato

3-PG – 3 fosfoglicerato

6-PG – 6 fosfogluconato

ACD – Solução conservante de Ácido Cítrico + Citrato de Sódio + Dextrose

ATP – Adenosina trifosfatada

Ca⁺⁺ – Íon Cálcio

CH – Concentrado de hemácias

Cl⁻ – Íon cloreto

CO₂ – Gás Carbônico

COO⁻ – Íon carboxila

CPD – Solução conservante de Ácido Cítrico + Citrato de Sódio + Fosfato + Dextrose

CPDA – Solução conservante de Ácido Cítrico + Citrato de Sódio + Fosfato + Dextrose + Adenina

EDTA – Etilenodietilamina

Fe⁺² – Íon ferroso

Fe⁺³ – Íon férrico

G-6-PD – Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx – Enzima glutathion peroxidase

GSH – Glutathion reduzido

Hb – Hemoglobina

HbO₂ – Hemoglobina Oxigenada

HCO₃⁻ – Íon carbonato

Hct – Hematócrito

K⁺ – Íon Potássio

Mg⁺⁺ – Íon Magnésio

Na⁺ – Íon Sódio

NADH – Nicotinamida-adeninadinucleotídeo reduzido

NADPH – Nicotinamida-adeninadinucleotídeo-fosfato reduzido

poliP – Polifosfato

PRP – Plasma rico em plaquetas

PVC – Cloreto de Polivinila

RBC – *Red Blood Cells*

Rh – Sistema antigênico Rhesus

ROM – *Reactive Oxygen Metabolites*

SAG-M – Solução aditiva Salina + Adenina + Glicose + Manitol

TP – Tempo de protrombina

TTPa – Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

Figura 1. Hemácias com forma anatômica bicôncava característica (Adaptado de http://intranet.hemobras.gov.br/).....	20
Figura 2. Modelo esquemático de mosaico fluido bilipídico da membrana plasmática (MURADOR, 2007).....	21
Figura 3. Proteínas do citoesqueleto celular (espectrina, anquirina), ancoradas nas proteínas de membrana (banda 3 e banda 4.1) (HERNADES & BLANCO, 2005).....	22
Figura 4. Estrutura de uma molécula de ácido siálico. Em destaque grupo carboxil que em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), maior responsável pela eletronegatividade eritrocitária. (EYLAR, 1962; ALBERTS, 1997).....	23
Figura 5. Representação esquemática do Potencial Zeta em Eritrócito, com carga superficial negativa (Modificada de POLLACK, 1977).....	24
Figura 6. Via glicolítica principal do metabolismo energético eritrocitário (via de <i>Embde-Meyerhof</i>) com vias acessórias (via do fosfogluconato ou ciclo das pentoses e via de <i>Rapoport-Luebering</i>) (Adaptado de LEE, 1999).....	25
Figura 7. Seqüência dos estágios da oxigenação da Hemoglobina. A) Hb desoxigenada; B) e C) fixação de O_2 por globinas alfa; D) e E) fixação de O_2 por globinas beta com deslocamento de 2,3 DPG (adaptado de http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobina/fisio-oxi.htm).....	27
Figura 8. a) Bolsa de Sangue após primeira centrifugação, com separação das fases de hemocomponentes. b) extração do plasma sobrenadante para bolsa satélite (adaptado de http://intranet.hemobras.gov.br/).....	29
Figura 9. a) Hemácias normais com formato bicôncavo. b) Esferócitos, característica da perda de membrana em hemácias envelhecidas. c) Equinócitos, característica da precipitação de espectrina em hemácias envelhecidas. (adaptado de GALVEZ, 2006).....	31
Figura 10. Estrutura molecular de uma cadeia de polifosfato $[\text{PO}_3^-]_n$, com $n = 9$	33
Figura 11. Absorção dos pigmentos melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda (Adaptado do site http://csernigm.hu/).....	35
Figura 12. Transferência de momentum do fóton na pinça óptica para uma esfera. a) sentido do desvio sofrido pelo objeto quando da incidência do laser. b) dois lasers produzindo uma força que mantém a esfera aprisionada por fazer o seu centro coincidir com o foco (FONTES, 1999).....	36
Figura 13. Ilustração do método de aspiração por micropipeta (FONTES, 1999).....	37
Figura 14. a) Aparelho selador de tubo conector de bolsas de coleta de sangue (composeal® Fresenius-Kabi). b) Detalhe do tubo conector estéril, usado para coleta de amostras de hemácias (adaptado de http://intranet.hemobras.gov.br/ e http://www.freseniuskabi.com).....	39
Figura 15. a) Sistema de conexão estéril CompoDock® b) Ligação dos conectores das bolsas satélite e de concentrado de hemácias por radiofrequência.....	41

Figura 16. Influência da abertura numérica na força de aprisionamento da armadilha óptica. Uma maior abertura numérica produz uma maior componente vertical (adaptado de FONTES, 2004).....	43
Figura 17. Função do Telescópio na pinça óptica (FONTES, 2004).....	44
Figura 18. Representações de como as lentes do telescópio podem mudar o tamanho do feixe, f_1 e f_2 são as distâncias focais (FONTES, 2004).....	44
Figura 19. a) Hemácia em Repouso b) Hemácia sob ação da pinça óptica.....	45
Figura 20. Esquema geral de montagem da pinça óptica.....	46
Figura 21. Fotos tiradas da pinça óptica montada no Laboratório de Biofísica Química Professor Ricardo Ferreira.....	46
Figura 22. Câmara especial usada nas medidas de potencial Zeta eritrocitário.....	47
Figura 23. a) Migração de hemácia submetida a campo elétrico. b) Gráfico da velocidade adquirida pela hemácia em função do campo elétrico gerado pela diferença de potencial aplicada.	48
Figura 24. Equação modificada para cálculo da elasticidade (μ) a partir do coeficiente angular (α) da reta da elongação da hemácia em função da velocidade aplicada.....	49
Figura 25. Medição da elongação do eritrócito com auxílio do software ImagePró-Plus.....	49
Figura 26. Exemplos de elongação de hemácias submetidas a velocidades crescentes ($\mu\text{m/s}$).	50
Figura 27. Imagens de microscopia de diferentes campos apresentando: a) Hemácias controle após 24 horas de armazenamento. b) Hemácias com polifosfato (4x) após 24 horas de armazenamento. c) Hemácias controle após duas semanas de armazenamento d) Hemácias com polifosfato (4x) após duas semanas de armazenamento.....	52
Figura 28. a) Evolução do Tempo de Protrombina em quantidades crescentes de polifosfato de sódio ($n = 9$). b) Evolução do Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada em quantidades crescentes de polifosfato de sódio ($n = 9$).....	55
Figura 29. Micrografias de hemácias aprisionadas pela pinça óptica, submetidas a velocidades crescentes ($\mu\text{m/s}$), após primeira e quinta semana de armazenamento.....	56
Figura 30. Comparação da inclinação das retas das elongações celulares médias em função da velocidade aplicada referentes a primeira e a quinta semana de armazenamento.....	57
Figura 31. Evolução temporal da elasticidade de hemácias estocadas em CPD/SAG-Manitol.....	58
Figura 32. Comparativo das evoluções temporais da elasticidade de hemácias estocadas em CPD/SAG-Manitol, na ausência (controle, linha azul) e na presença de polifosfato de sódio(linha vermelha).....	59
Figura 33. Evolução temporal do potencial Zeta de hemácias durante o armazenamento em CPD/SAG-Manitol.....	61

Tabela 1. Alterações observadas em diferentes constituintes de concentrados de hemácias com estoque prolongado de 42 dias (Adaptado de ZUBAIR, 2010).....	30
Tabela 2. Principais soluções preservantes e tempo de conservação de concentrados de hemácias.....	32
Tabela 3. Valores de referência utilizados para cálculo das quantidades de polifosfato de sódio a serem acrescentadas na bolsa de concentrado de hemácias.....	40
Tabela 4. Valores de referência para parâmetros de qualidade de concentrado de hemácias.....	42
Tabela 5. Resultados de testes de controle de qualidade para concentrados de hemácias sem e com a ação do polifosfato após duas e três semanas de armazenamento em CPDA-1.....	53
Tabela 6. Resultados de testes de controle de qualidade para concentrados de hemácias sem e com a ação do polifosfato após duas e três semanas de armazenamento em CPD/SAG-M.....	54
Tabela 7. Valores de elasticidade calculados pela técnica da pinça óptica para hemácias armazenadas em CPD/SAG-Manitol.....	58
Tabela 8. Valores de potencial Zeta (mV) calculados para hemácias armazenadas em CPD/SAG-Manitol.....	61

Estudo do Potencial Zeta e da Elasticidade de Eritrócitos utilizando Pinças Ópticas e Avaliação da Ação Conservante do Polifosfato de Sódio

O estudo de lesões de estoque e a avaliação de parâmetros de qualidade em concentrados de hemácias, hemocomponente amplamente utilizado em transfusões sanguíneas, são importantes por predizerem a viabilidade pós transfusional das células estocadas. Para mensuração do potencial zeta e da elasticidade celular, indicativos do estado oxidativo e do grau de envelhecimento celular, foi utilizada a técnica da pinça óptica, que possibilita manipulações precisas sem causar danos aos sistemas biológicos. A avaliação temporal da elasticidade de eritrócitos armazenados em CPD/SAG-M comprovou a tendência de perda gradual da deformabilidade celular em função do tempo de estocagem, tornando-se menos viáveis. Após cinco semanas de armazenamento, as células se apresentaram 134% mais rígidas. Já os valores do potencial zeta decresceram 43% com a estocagem, indicando perda de carga de membrana, sinal de lesão oxidativa. A ação do polifosfato de sódio, polímero inorgânico antioxidante, sobre as propriedades biomecânicas das hemácias estocadas foi também estudada. As hemácias na presença do polifosfato apresentaram menor perda elasticidade (em função do tempo de estocagem), principalmente a partir da 5ª semana de armazenamento, indicando que o polifosfato pode ser um potencial candidato a solução preservante de concentrado de hemácias. A sua ação sob a coagulação foi também analisada através do tempo de tromboplastina parcialmente ativada e tempo de protrombina, mostrando aumento do tempo de coagulação cálcio dependente proporcionalmente ao aumento da concentração de polifosfato no meio. Por final, uma avaliação de parâmetros usuais de qualidade de concentrado de hemácias (hematócrito, teor de hemoglobina, grau de hemólise e controle microbiológico) não mostrou alterações negativas significantes quando na presença do polifosfato. A Pinça Óptica mostrou-se eficiente na quantificação do potencial zeta e elasticidade de eritrócitos. Essas medidas podem nos ajudar a compreender e avaliar os efeitos de hemácias sobre variadas condições de estocagem.

Palavras-chave: concentrados de hemácias, lesões de estoque, potencial zeta, elasticidade celular, polifosfato de sódio, pinça óptica.

Study of Zeta Potential and Elasticity of Erythrocytes using Optical Tweezers and Evaluation of Preservative Action of Sodium Polyphosphate

The study of storage lesions and evaluation of quality parameters in packed red blood cells, blood components widely used in blood transfusions, are important for predicting post-transfusion viability of stored cells. To measure the zeta potential and cell elasticity, indicative of oxidative status and the degree of cellular aging, we used the technique of optical tweezers, which enables precise manipulation without damage to biological systems. The assessment of temporal elasticity of erythrocytes stored in CPD/SAG-M showed the tendency to gradual loss of cell deformability as a function of storage time, becoming less viable. After five weeks of storage, the cells had 134% more rigid. The values of the zeta potential decreased 43% with storage, indicating loss of membrane charge, a sign of oxidative damage. The action of sodium polyphosphate, inorganic polymer antioxidant, on the biomechanical properties of stored red blood cells was also studied. The red blood cells in the presence of polyphosphate showed less loss elasticity (depending on storage time), mainly from the 5th week of storage, indicating that the polyphosphate may be a potential candidate solution preservative of red blood cells. Its action on coagulation was also analyzed using the activated partial thromboplastin time and prothrombin time, showing an increase of clotting time with increasing calcium dependent on the concentration of polyphosphate in the middle. In the end, an evaluation of the usual parameters of quality of red blood cells (hematocrit, hemoglobin, and hemolysis degree of microbiological control) showed no significant adverse change in the presence of polyphosphate. Optical tweezers proved to be efficient in the quantification of zeta potential and elasticity of erythrocytes. Such measures may help us understand and evaluate the effects of erythrocytes on various storage conditions.

Keywords: packed red blood cells, storage lesions, zeta potential, cell elasticity, sodium polyphosphate, optical tweezers.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O concentrado de hemácias é o hemocomponente mais utilizado nas práticas transfusionais. Obtidas a partir da centrifugação do sangue total, as hemácias são estocadas em soluções especiais que contêm substratos essenciais ao metabolismo celular em sua formulação. O estudo de lesões de estoque e a avaliação de parâmetros de qualidade em concentrados de hemácias são relevantes, pois podem refletir a qualidade da solução preservante utilizada e a viabilidade celular pós transfusional. Normalmente são realizados ensaios de controle de qualidade de rotina nos serviços de hemoterapia, onde a qualidade do hemocomponente é avaliada por análise de hematócrito, níveis de hemoglobina, número de eritrócitos, grau de hemólise e controle microbiológico [ANVISA, 2004].

Algumas características mecânicas e elétricas celulares podem também estar relacionadas à qualidade dos concentrados de hemácias. O potencial zeta, determinado pela distribuição cargas elétricas ao redor da célula em função da estrutura superficial externa da membrana plasmática, pode indicar o estado oxidativo da membrana e refletir a tendência de aglutinação intercelular [GODIN E CAPRANI, 1997; JOVTCHEV, 2000]. A elasticidade ou deformabilidade celular, ligada às características arquitetônicas da célula e às propriedades elásticas e reológicas de constituintes não só da membrana, mas também do citoplasma, pode indicar a condição fisiológica da célula como um todo, sendo também preditivo da viabilidade pós transfusional do eritrócito [MOHANDAS, 1993; PEARSON, 2001].

Dentre várias técnicas de manipulação e microanálise para o estudo dos sistemas biológicos desenvolvidas na década de 80, destaca-se a pinça óptica, desenvolvida por Ashkin. Esta ferramenta é baseada nas propriedades corpusculares da luz, que através da transferência de *momentum* de fótons emitidos por um laser, permite a captura, manipulação e medida de diferentes microestruturas biológicas de maneira eficiente e sem causar danos aos sistemas estudados [ASHKIN et al., 1986]. Esta metodologia pode ser empregada para o estudo das características mecânicas e elétricas celulares [FONTES, 2011].

A mensuração do potencial Zeta e da elasticidade de eritrócitos pela técnica da pinça óptica é interessante por permitir além da quantificação destes parâmetros, avaliar a evolução com o tempo de armazenamento e analisar o efeito provocado por diferentes substâncias adicionadas ao concentrado de hemácias, como conservantes ou agentes tóxicos.

O polifosfato de sódio ($n = 9$), que já vêm sendo utilizado como agente estabilizante e veiculador de fosfato em formulações de Nutrição Parenteral, pelas suas propriedades antioxidante, anticoagulante e tamponante, capacidade de complexar íons cálcio e por ser fonte bioenergética [PEREIRA, 2007], mostra-se como um potencial agente preservante de hemocomponentes estocados.

O estudo da ação do polifosfato ($n = 9$) nas características mecânicas e elétricas de concentrados de hemácia mostra-se interessante para a observação de possíveis efeitos conservantes ou deletérios deste agente candidato a constituinte de soluções conservantes de componentes sanguíneos. Somados à avaliação de parâmetros de qualidade de rotina de concentrados de hemácias, como grau de hemólise e hematócrito, o estudo da elasticidade e potencial Zeta, pode predizer um possível comprometimento da viabilidade pós-transfusional de eritrócitos acrescidos de polifosfato.

Apesar de suas características vantajosas à hemácia, estudos anteriores demonstram a ação pró-coagulante do polifosfato por ativação de fatores da coagulação e estabilização do coágulo de fibrina formado. Porém estes resultados são obtidos apenas para polifosfatos com número elevado de fosfatos condensados ($n > 25$) [SMITH, 2006]. A possível ação do polifosfato sobre a coagulação sanguínea é também interessante de ser avaliada, para observação de potencial ação indesejada por este mecanismo.

Este trabalho sugere que medidas de elasticidade celular e potencial Zeta de membrana podem ser utilizados como indicadores de parâmetros de qualidade transfusional, por estarem relacionados ao estado oxidativo da membrana e ao grau de envelhecimento da célula. Sugere também a avaliação da possível ação preservante do polifosfato de sódio sobre eritrócitos em armazenamento.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aplicar metodologia baseada na técnica da pinça óptica para mensurar a mudança de elasticidade de eritrócitos mantidos em solução preservante com ou sem polifosfato de sódio bem como a mudança do potencial zeta da membrana eritrocitária com o tempo de estocagem.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução temporal do potencial zeta de membrana e da elasticidade em eritrócitos armazenados em bolsas de CPD/SAG-Manitol;
- Analisar a ação do polifosfato de sódio (n=9) sobre parâmetros de qualidade adotados por serviços de hemoterapia para concentrados de hemácias e sobre o tempo de coagulação sanguínea
- Avaliar o efeito do polifosfato de sódio (n=9) sobre propriedades mecânicas de eritrócitos armazenados em CDP/SAG-Manitol.

CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Propriedades Biológicas do Eritrócito

O eritrócito é o tipo celular mais abundante do sangue. Possui forma discoidal bicôncava, com diâmetro médio de 7 a 8 μm , espessura variando de 2 a 1 μm da periferia para o centro e volume celular de 90 μm^3 (Figura 1). Em condições normais o sangue contém de 4,5 a 6,5 milhões de glóbulos vermelhos por milímetro cúbico [KLINKEN, 2002].

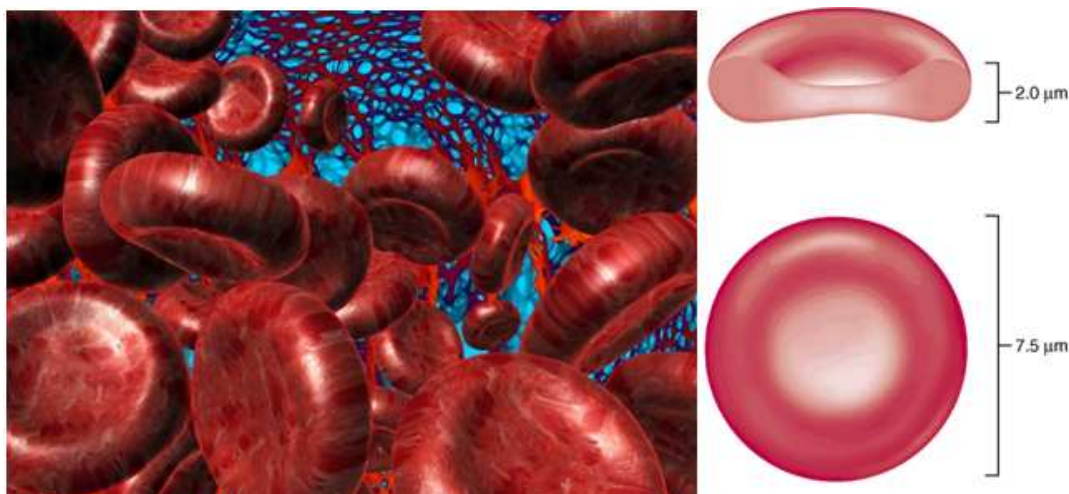


Figura 1. Hemácias com forma anatômica bicôncava característica (Adaptado de <http://intranet.hemobras.gov.br/>).

O eritrócito é uma célula sanguínea da linhagem mielóide. O processo de eritropoiese, maturação a partir de célula precursora (*Stem-cell*) da medula óssea, dura em média 14 dias. Após ganharem a circulação, possuem uma vida média de 120 dias, percorrendo cerca de 250 km neste tempo.

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio dos alvéolos pulmonares para todos os tecidos corporais. Em menor quantidade, transporta gás carbônico dos tecidos para o pulmão. Além de elevada quantidade de hemoglobina no citoplasma, a eficiência do transporte gasoso depende de: manutenção das cargas de membrana, o que permite repulsão intercelular evitando aglutinação; manutenção da forma bicôncava, que garante um rápido fluxo das células na circulação; e a capacidade de prevenir o estresse oxidativo, mantendo os quatro átomos de ferro em cada molécula de hemoglobina no estado ferroso (Fe^{2+}), configuração da ligação reversível com a molécula de oxigênio [KLINKEN, 2002].

A grande capacidade de se deformar permite a hemácia transpor vasos capilares e sinusóides de diâmetro bastante reduzido. Quando perdem estas características as hemácias envelhecidas são eliminadas da circulação por células fagocitárias do sistema reticuloendotelial, principalmente no baço e na medula óssea, órgãos encarregados da hemocaterese [DOBBE, 2002].

3.1.1 A Membrana Eritrocitária

A membrana plasmática é composta por dupla camada de fosfolipídios que delimita o fluído intracelular no líquido extracelular e permite captação de nutrientes, íons e gases. Ela possui várias estruturas protéicas associadas, como canais iônicos, sistemas enzimáticos e proteínas estruturais que formam o citoesqueleto (Figura 2). A membrana da hemácia em especial é dotada de forma e consistência que lhe permite alto grau de deformabilidade [MURADOR, 2007].

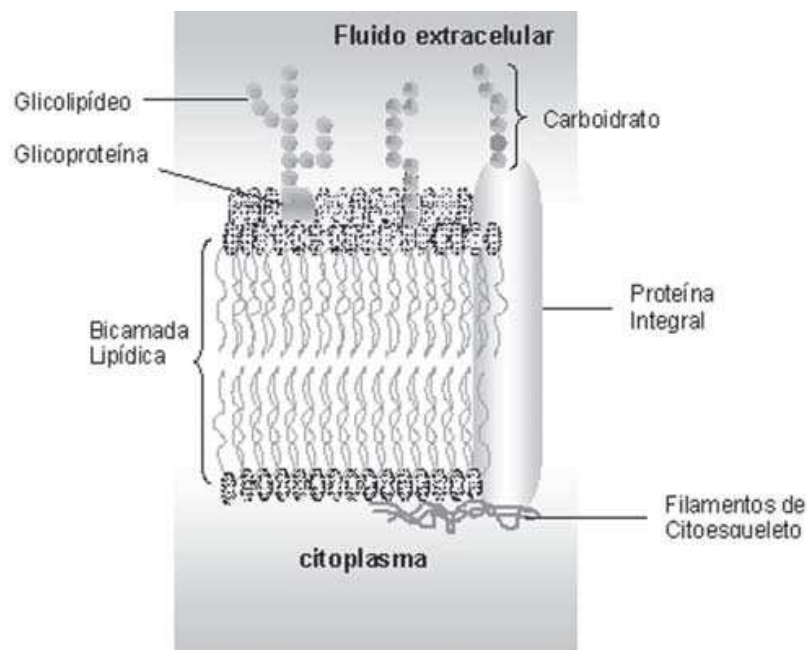


Figura 2. Modelo esquemático de mosaico fluido bilipídico da membrana plasmática (MURADOR, 2007).

A forma do eritrócito é mantida por proteínas extra-membranares localizadas na região periférica interna da bicamada lipídica, voltadas para o citoplasma. Dentre estas

proteínas, que compõem o citoesqueleto membranar, as principais são espectrina, anquirina, actina e tropomiosina.

A **espectrina** é uma proteína bifilamentar flexível e fibrosa, que está ligada por sua cadeia beta a um complexo **actina-tropomiosina**, formando uma malha contrátil envolvida na deformabilidade do eritrócito. Essa estrutura ancora-se na membrana pela ligação da cadeia alfa da espectrina em dois pontos. O primeiro ponto ocorre na proteína integral **glicoforina C**, numa ligação estabilizada pela proteína de banda 4.1. O segundo ponto é através da **anquirina**, que faz a ponte com a **proteína de banda 3**, mais abundante da membrana eritrocitária, incorporada na região mais profunda da bicamada lipídica (Figura 3) [MURADOR, 2007; HERNADES & BLANCO, 2005].

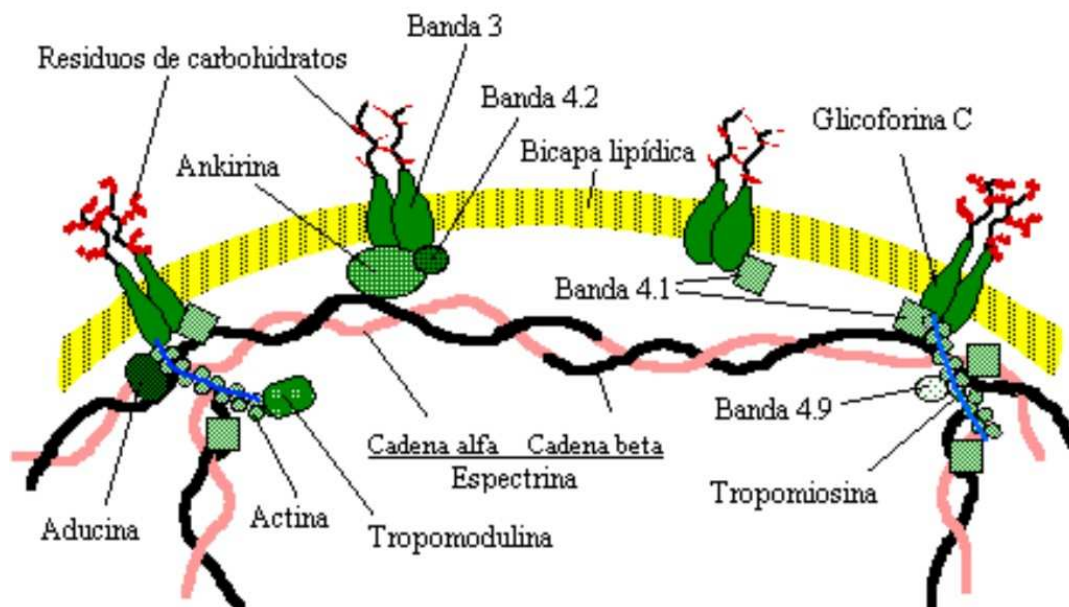


Figura 3. Proteínas do citoesqueleto celular (espectrina, anquirina), ancoradas nas proteínas de membrana (banda 3 e banda 4.1) (HERNADES & BLANCO, 2005).

Além da função mecânica, a proteína de banda 3 é um canal iônico que media a troca de íons cloreto (Cl^-) por carbonato (HCO_3^-). Por esse mecanismo ela regula o equilíbrio ácido-básico celular, aumentando a capacidade de transporte de CO_2 pela hemácia em situações de baixa pressão de oxigênio ou acidose metabólica [MURADOR, 2007].

Outra proteína ionófora, conhecida por **bomba de cálcio**, expulsa o cálcio para fora da célula, evitando o aumento da sua concentração intracelular. O cálcio está

envolvido na regulação e estabilização da estrutura fosfolipídica da membrana. Concentrações elevadas de cálcio no interior da célula tornam-a menos deformável [WOLFE,1985].

3.1.2 Potencial Zeta da Membrana Eritrocitária

A superfície eritrocitária é dotada de carga negativa devido principalmente à presença do ácido siálico conjugado a glicoproteínas de membrana. Este monossacarídeo possui um grupamento carboxil que em meio aquoso e no pH fisiológico torna-se ionizado (COO^-), sendo o principal responsável pela carga negativa da membrana (Figura 4). Assim, a hemácia exerce influência na distribuição espacial dos íons em meio salino, como o plasma e soluções conservantes. Íons de carga oposta se aproximam por atração eletrostática formando uma nuvem eletrônica em volta da célula. A densidade de contra-íons cresce com a aproximação da região perimembranar [EYLAR et al, 1962, ALBERTS et al, 1997].

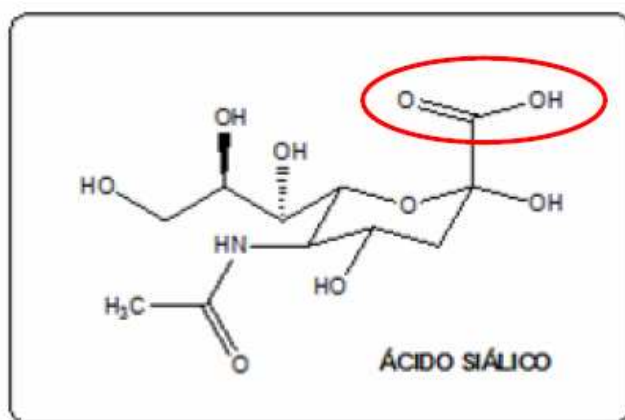


Figura 4. Estrutura de uma molécula de ácido siálico. Em destaque grupo carboxil que em meio aquoso adquire forma ionizada (COO^-), maior responsável pela eletronegatividade eritrocitária. (EYLAR et al, 1962, ALBERTS et al, 1997).

Alguns cátions ligam-se fortemente à superfície do eritrócito, chegando a se mover junto com a célula, formando uma camada compacta de íons, ou camada de Stern. Outros íons positivos continuam sendo atraídos pela carga superficial da hemácia, porém são repelidos pela camada de Stern, resultando na formação de uma segunda camada difusa de contra-íons (Figura 5). A diferença de potencial elétrico no ponto de cisalhamento – plano que delimita as camadas de carga que se movem e que não se

movem com as hemácias – é chamada de potencial zeta. Quanto maior for o potencial zeta de membrana maior será a repulsão intercelular. É esse potencial repulsivo que previne a agregação dos eritrócitos em solução. Esta grandeza é dependente da constante dielétrica e da concentração de contra-íons no meio [HUNTER ET al, 1981].

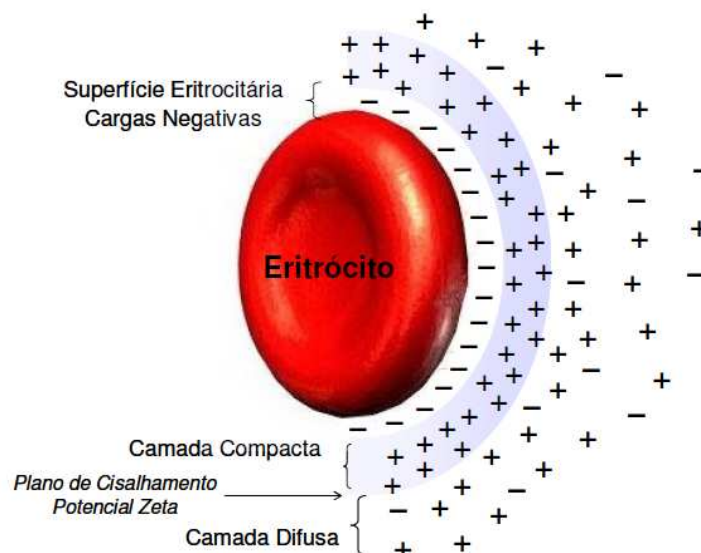


Figura 5. Representação esquemática do Potencial Zeta em Eritrócito, com carga superficial negativa (Modificada de POLLACK et al., 1977).

Nos vasos de pequeno calibre, forças de repulsão eletrostática entre os eritrócitos e células endoteliais facilitam o fluxo de sangue [BORN, 1985; BORN, 1989]. Quando o ácido siálico é removido do glicocálix por tratamento enzimático com neuraminidase, os eritrócitos são capturados em regiões específicas, ocorrendo redução do fluxo sanguíneo [SIMCHON et al. 1988]. Então a redução das cargas da membrana afeta o comportamento do fluxo das hemácias na microcirculação, e ilustra a importância do ácido siálico na patogênese de doenças vasculares.

3.1.3 Metabolismo do Eritrócito

A manutenção da forma e do volume do eritrócito hemácia, o transporte de gases e a proteção contra oxidação da hemoglobina e outras biomoléculas importantes, como lipídios de membrana e proteínas estruturais, são dependentes do funcionamento de sistemas enzimáticos baseados no catabolismo da glicose para produção de adenosina trifosfato (ATP). Devido a sua pressão osmótica celular ser maior que a do plasma, a

Para início e manutenção da via de ***Embde-Meyerhof*** são consumidos dois mols de ATP para cada mol de glicose a ser catabolizado. Ao final são gerados quatro mols de ATP, resultando em rendimento de dois mols de ATP por mol de glicose. Além da reserva energética, metabolitos essenciais à hemácia são gerados por vias assessorias à via principal [RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976].

Pela via do **fosfogluconato**, ou desvio das pentoses, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), converte glicose-6-fosfato (glicose 6-P) a 6-fosfogluconato (6-PG), com produção de nicotinamida-adeninadinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) e glutathion reduzido (GSH). O NADPH é gerado como processo final da transformação do glutathion peroxidase (GPx) em glutathion reduzido (GSH), agentes protetores de processos oxidativos (Figura 6) [RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976].

O NADH gerado é útil na prevenção da oxidação do ferro dos grupamentos Heme, evitando a transformação de oxihemoglobina em metahemoglobina, num processo mediado pela enzima metahemoglobina redutase [RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976].

A via de ***Luebering-Rapoport*** é um caminho alternativo entre o 1,3-DPG e o 3-PG, que diminui o rendimento de produção de ATP, mas gera 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) – metabólito essencial ao mecanismo de liberação de oxigênio fixado a hemoglobina – que pela ação de uma fosfatase é modificado a 3-Fosfoglicerato, dando continuidade às etapas subseqüentes da via principal (Figura 6). Em condições de estresse oxidativo até cerca de 90% da glicose consumida no metabolismo eritrocitário pode ser destinada à produção de 2,3 DPG [RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976; LEE, 1999].

O 2,3 DPG liga-se de maneira reversível à hemoglobina entre as duas globinas beta. A remoção do 2,3 DPG permite a fixação e transporte do oxigênio pela hemoglobina. Quando o oxigênio é liberado no tecido a ser oxigenado, o 2,3 DPG torna a se ligar à hemoglobina, num equilíbrio controlado pela pressão de oxigênio na corrente sanguínea (Figura 7) [MULQUINEY, 1999; WIBACK, 2002].

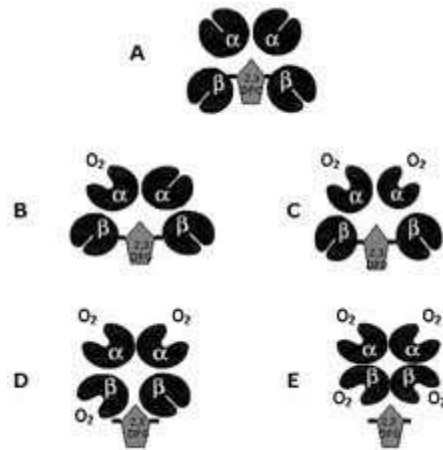


Figura 7. Seqüência dos estágios da oxigenação da Hemoglobina. A) Hb desoxigenada; B) e C) fixação de O₂ por globinas alfa; D) e E) fixação de O₂ por globinas beta e deslocamento de 2,3 DPG. (Adaptado de <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobina/fisio-oxi.htm>).

Todos estes mecanismos metabólicos são interligados e interdependentes, qualificando o eritrócito a desenvolver sua função de transporte de oxigênio durante o seu período vital.

3.1.4 Elasticidade do Eritrócito

Mesmo sendo submetida a ciclos contínuos de deformação e alongação, causados pelo fluxo sanguíneo e pela transposição de vasos de reduzido calibre, a hemácia consegue restabelecer sua forma original, podendo alongar-se até 230% em relação a sua dimensão normal. Esta elevada elasticidade, ou deformabilidade, está ligada às características arquitetônicas da célula e às propriedades elásticas e reológicas dos constituintes da membrana e citoplasma [MOHANDAS, 1993; PEARSON, 2001].

Quanto maior for a razão área superficial/volume celular, maior será a alongação e habilidade de deformação. Hemácias grandes devem se deformar mais para transpor pequenos vasos. O citosol funciona como um fluido newtoniano ideal, com viscosidade constante para uma temperatura discriminada. Seu comportamento reológico correlaciona de maneira linear uma força aplicada à célula com a sua velocidade de deformação. Elevadas concentrações de hemoglobina implica em maior viscosidade celular.

A deformabilidade celular é também influenciada pela fluidez da membrana. Este parâmetro depende da integridade das proteínas periféricas componentes da rede

citoesquelética e da distribuição das estruturas lipídicas. A densidade de proteínas estruturais, com destaque para a espectrina, é diretamente proporcional à rigidez da membrana. A elasticidade celular pode ser regulada pela interação da espectrina com a bicamada lipídica. Em relação aos lipídios constituintes, um conteúdo aumentado de colesterol ou diminuído de fosfatidilcolina torna a membrana mais rígida [NASH, 1993].

3.2 O Concentrado de Hemácias

O concentrado de hemácias é o hemocomponente mais amplamente utilizado nas práticas clínicas. É indicado para aumentar a massa eritrocitária em pacientes que necessitem aumentar sua capacidade de transporte de oxigênio, como em hemorragias agudas e nas anemias normovolêmicas. Entre as suas vantagens frente ao sangue total tem-se a mesma capacidade de oxigenação tecidual com metade do volume transfundido e redução da concentração de isoaglutininas (Anti-A e Anti-B). [RAZOUK, 2004].

Normalmente a separação dos hemocomponentes é feita por técnica de centrifugação refrigerada do sangue total, em função da diferença de tamanho e densidade dos seus elementos. O concentrado de hemácias por ser a porção mais densa se deposita no fundo da bolsa de sangue centrifugada. Uma camada leuco-plaquetária (*buffy-coat*) se forma sobre as hemácias e o plasma sobrenadante rico em plaquetas é extraído para uma bolsa satélite (Figura 8) [CAIRUTAS, 1985].

As bolsas utilizadas para fracionamento e armazenamento dos hemocomponentes são confeccionadas em policloreto de vinila (PVC) e plastificantes (ftalatos) que permitem troca gasosa entre o interior da bolsa e o meio externo [PIERRE, 1981].



Figura 8. a) Bolsa de Sangue após primeira centrifugação, com separação das fases de hemocomponentes. b) extração do plasma sobrenadante para bolsa satélite (Adaptado de <http://intranet.hemobras.gov.br/>).

3.2.1 Metabolismo do eritrócito em armazenamento

Os eritrócitos armazenados sofrem alterações morfofisiológicas que se acentuam com o passar do tempo. Ocorrem as chamadas lesões de estoque, advindas da crise de nutrientes e metabólitos essenciais (Tabela 1). A redução do pH é comum durante estocagem devido ao acúmulo de ácido láctico produzido pela via glicolítica. Inicialmente ocorre uma rápida queda nas concentrações de 2,3 DPG por supressão da via de *Luebering-Rapoport*, para um aumento do rendimento da via principal de produção de ATP, na tentativa de manter as funções biológicas dependentes de energia. Posteriormente a exaustão das reservas glicolíticas leva também a queda de produção de ATP. A própria diminuição dos níveis de 2,3-DPG contribui para a deficiência de ATP, porque no pH ácido este fixa-se preferencialmente à hemoglobina não ligada ao 2,3-DPG e diminui a sua quantidade disponível para bombas de membrana e manutenção das via energética principal [VALTIS, 1954; DERN, 1967; RAAT, 2005].

Tabela 1. Alterações observadas em diferentes constituintes de concentrados de hemácias com o estoque prolongado de 42 dias. (Adaptado de ZUBAIR, 2010)

Constituintes	42 dias de estocagem	
	Pré	Pós
pH	6.8	6.4
ATP (mmol/g Hb)	4.1	2.9
2,3 DPG (mmol/g Hb)	9	0.3
K ⁺ (mEq/L)	2.4	63
Hb livre (MG/dL)	9	372
Hemólise (%)	0	0.61

A diminuição dos níveis de 2,3-DPG durante o armazenamento celular aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, de tal forma que dificulta a oxigenação tecidual após a transfusão [CAIRUTAS, 1985].

A manutenção da forma discóide e da integridade da membrana é também dependente de cadeia energética. A falência da bomba Na/K-ATPase provoca perda da resistência osmótica com acúmulo de sódio e líquido no citoplasma, aumentando o grau de hemólise. A redução do ATP também compromete a deformabilidade celular. O acúmulo de cálcio por falência da bomba $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ATPase, leva a desestabilização da estrutura fosfolipídica da membrana [WOLFE, 1985].

Mudanças conformacionais das glicoforinas e degradação da rede citoesquelética provocam o desprendimento de fosfolipídios da membrana, com formação de microvesículas no meio. As hemácias perdem a forma bicôncava, tornando-se esferócitos (Figura 9). A precipitação de espectrina polimerizada provoca o aspecto característico dos equinócitos [GALVEZ, 2006; HALBHURBER, 1983].

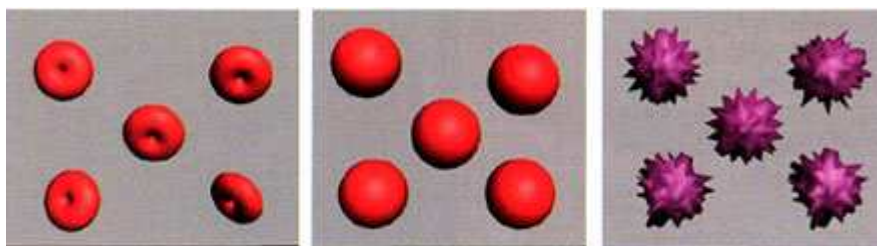


Figura 9. a) Hemácias normais com formato bicôncavo. b) Esferócitos, característica da perda de membrana em hemácias envelhecidas. c) Equinócitos, característica da precipitação de espectrina em hemácias envelhecidas. (adaptado de GALVEZ Et al, 2006)

Com o passar do tempo os fosfolipídios constituintes da membrana também acumulam lesões causadas pelo estresse oxidativo metabólico. Os ácidos graxos polinsaturados constituintes dos fosfolipídios de membrana são alvo dos metabólitos reativos do oxigênio (ROM). As hemácias são células mais suscetíveis a ação destes radicais livres, por estarem sob alta tensão de oxigênio, possuem maior proporção de ácidos graxos polinsaturados na membrana e pela presença de do ferro nos grupamentos heme [CLEMENS, 1987].

Estudos recentes sugerem que a transfusão de glóbulos vermelhos com mais de duas semanas de armazenamento está associada a maiores riscos de complicação pós-operatória e maior taxa de mortalidade, o que reacendeu uma antiga discussão sobre o impacto clínico das lesões de armazenamento nos procedimentos transfusionais [ZUBAIR, 2010].

3.2.2 Soluções Preservantes

O uso de soluções preservantes é uma forma de compensar as perdas de metabólitos essenciais à viabilidade das hemácias, diminuir o aparecimento de lesões de estoque e manter a integridade e a deformabilidade celular, características fundamentais à sobrevida pós-transfusional das hemácias.

As primeiras soluções conservantes utilizadas continham elevada concentração de glicose e citrato de sódio como agente anticoagulante pelo mecanismo cálcio dependente, e mantinham a viabilidade das hemácias por até 21 dias [LOUTIT e MOLLISON 1943]. A adição do íon fosfato, substrato para síntese de ATP e 2,3 DPG, gera um efeito tamponante, retardando a acidificação do meio. O fosfato é também componente dos fosfolipídios de membrana. Hemácias estocadas em CPD (solução

citrato-fosfato-dextrose) são viáveis por até 28 dias. O acréscimo de adenina à composição é benéfico à manutenção dos níveis de ATP. As soluções do tipo CPDA (solução citrato-fosfato-dextrose-adenina) incrementam em até 7 dias a viabilidade celular, se comparadas com CPD, e estão entre as formulações preservantes mais utilizadas em serviços de hemoterapia [GIBSON, 1957; GREENWALT, 1990; NAKAO, 1960].

O advindo da solução aditiva SAG-M (solução de cloreto de sódio, adenina, glicose, manitol) específica para conservação de concentrados de hemácias, trouxe a vantagem de manter o hemocomponente por até 42 dias. É composta por solução salina de tonicidade semelhante ao plasma e manitol, que impede hemaglutinação, além de glicose e adenina. Esta solução é adicionada ao concentrado de hemácias após a completa extração do plasma da bolsa centrifugada, e permite um máximo aproveitamento deste hemocomponente. A solução aditiva favorece indiretamente a produção industrial de proteínas derivadas do plasma (hemoderivados) por aumentar o rendimento de plasma por bolsa de sangue fracionada [HOGMAN, 1991].

A Tabela 2 relaciona as principais soluções utilizadas na preservação de hemocomponentes, com suas composições e respectivos prazos de validade para concentrados de hemácias.

Tabela 2. Principais soluções preservantes e tempo de conservação de concentrados de hemácias.

Soluções	Componentes	Validade (dias)
ACD	ácido cítrico, citrato, dextrose	21
CPD	citrato, fosfato, dextrose	28
CPDA	citrato, fosfato, dextrose, adenina	35
SAG-Manitol	cloreto de sódio, adenina, glicose, manitol	42

3.3 O Polifosfato

O Polifosfato é um polímero inorgânico pertencente ao grupo dos fosfatos condensados, constituídos por unidades básicas de íons ortofosfato (PO_4^{-3}). Possuem fórmula geral $[\text{PO}_3^-]_n$, sendo n o grau de polimerização (Figura 10). Podem ser obtidos

sinteticamente com n variando de 2 a 300 monômeros polimerizados. Porém na natureza são encontrados com n na ordem de 10^6 [KULAEV et al., 2004].

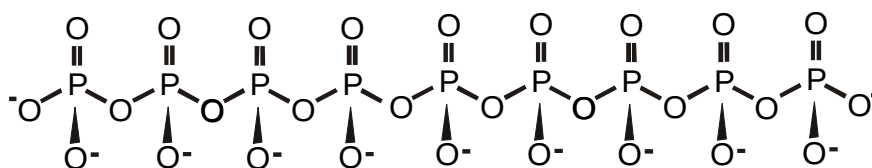


Figura 10. Estrutura molecular de uma cadeia de polifosfato $[\text{PO}_3^-]_n$, com $n = 9$.

Os polifosfatos inorgânicos encontram-se amplamente disseminados em todos os seres vivos (bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais). Em alguns microorganismos o polifosfato atua como fonte de energia, com reciprocidade de conversão com o ATP, que ocorre por meio de enzimas transferases e hidrolases [KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000]. Análises físico-químicas mostram que a hidrólise de ligações P-O-P em polifosfatos lineares libera energia equivalente a aproximadamente 10 kcal/mol, a mesma quantidade de energia liberada pela hidrólise do grupo fosfórico terminal do ATP [KULAEV et al., 2004]. Os polifosfatos constituem uma reserva de grupos fosfatos, necessários ao crescimento e metabolismo celular. A atividade tamponante dos polifosfato também tem importância biológica pela ação neutralizante de álcalis no interior das células [KORNBERG et al., 1999]. Pesquisas comprovaram a presença de polifosfatos inorgânicos em uma larga variedade de células e tecidos humanos [KORNBERG et al., 1999; COWLING & BIRNBOIM, 1994; LEYHAUSEN et al., 1998].

As propriedades conservantes dos poliânions polifosfatos são largamente exploradas nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Os polifostatos retardam a oxidação de gorduras insaturadas, inibem crescimento microbiano e promovem maturação de alimentos cárneos, entre outras utilizações [DALMAS, 2004]. Foi sugerido recentemente que podem também ser utilizados como fonte alternativa de fósforo em formulações para nutrição parenteral [PEREIRA, 2004].

Entre suas características úteis em formulações destacam-se o potencial antioxidante e bactericida, a capacidade de controle do pH (propriedade tamponante), ação quelante sobre íons bivalentes e estabilizante de um modo geral [HOURANT, 2004; KIM, 2004].

Estas características dos polifosfatos aparentemente mostram-se interessantes à preservação de hemocomponentes. A ação quelante sobre íons Ca^{++} torna-o anticoagulante e estabilizante de membrana. O retardo da acidificação do meio, a prevenção de danos oxidativos causados por radicais livres, a fonte de fosfato inorgânico e o potencial de reserva energética podem ser úteis para diminuir as lesões de estoque e aumentar a viabilidade postransfusional de hemácias.

Os efeitos tóxicos dos polifosfatos são equivalentes aos dos monofosfatos e estão relacionados ao desequilíbrio metabólico entre fósforo e cálcio [OMS, 1964]. Por administração parenteral, o polifosfato sofre hidrólise na circulação sanguínea e sua excreção ocorre principalmente por via urinária. Obedecendo-se os limites de concentração corpórea indicados (70 mg/Kg), o uso de polifosfatos em alimentos e produtos farmacêuticos não oferece riscos significativos à saúde [OMS, 1974; WEINER et al., 2001].

Estudos recentes propuseram a uma ação pró-coagulante do polifosfato, por aceleração da via intrínseca e estabilização do coágulo de fibrina. Porém, este efeito é dependente do tamanho do polifosfato, ocorrendo em cadeias a partir de 25 fosfatos condensados, e sendo mais significativo em cadeias maiores que 75 fosfatos, como as encontradas nos grânulos das plaquetas [SMITH, 2006].

3.4 Pinça óptica como ferramenta de manipulação celular

Lasers são amplamente utilizados nas ciências biomédicas para fins diagnósticos, intervenções cirúrgicas e manipulações biológicas. Dentre suas várias aplicações, destaca-se o trabalho pioneiro de Ashkin e colaboradores, que desenvolveram uma técnica de captura e manipulação de estruturas microscópicas, baseada na transferência de *momentum* de fótons de um feixe de luz de laser de argônio ($\lambda = 514 \text{ nm}$) [ASHKIN et al., 1986]. Posteriormente, esta técnica, conhecida por pinça óptica, foi empregada com sucesso para manipulações intra e extracelulares sem causar dano ao sistema orgânico, substituindo a fonte de argônio por *Neodímio Yttrium Aluminum Garnet* (Nd:YAG), de menor frequência e maior comprimento de onda (1064 nm). A maioria das estruturas biológicas é transparente ao infravermelho próximo, com pouca absorção de radiação nessa região de emissão, não sofrendo danos estruturais [ASHKIN e DZIEDZIC, 1987; ASHKIN, 1989]. A figura 11 exemplifica o

comportamento de absorção dos pigmentos de hemoglobina oxigenada (HbO_2) e da melanina em função dos comprimentos de onda.

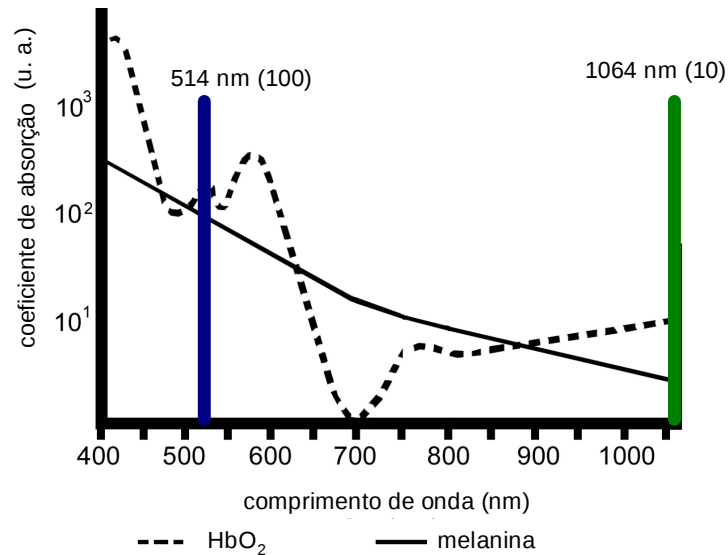


Figura 11: Absorção dos pigmentos melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda (Adaptado do site <http://csernigm.hu/>).

O sistema de pinça óptica consiste de um feixe de laser fortemente focalizado. Para comprimentos de ondas menores do que os objetos aprisionados, a captura pode ser entendida a partir da óptica geométrica. Tem-se uma compreensão mais intuitiva da armadilha óptica examinando dois raios de um feixe de laser cônico incidente sobre uma microesfera. Pela teoria da dualidade onda-partícula proposta por Einstein, a luz pode ser entendida como partícula (fóton) que ao atingir a microesfera terá sua trajetória desviada e imprimirá um recuo ao objeto na direção “F”, como mostra a Figura 12. Os raios “a” e “b” da Figura 12(b) se encontrariam no foco “f” se não houvesse o objeto. O desvio desses raios produz os recuos nas direções “Fa” e “Fb”, que compõem o deslocamento “F”. Esta força “F” leva o centro do objeto a coincidir como o foco do laser mantendo-o aprisionado neste ponto [FONTES, 1999; BRANDÃO, 2003].

Uma forma intuitiva de entender o aprisionamento pela luz é associar uma mola ligando o centro da partícula ao foco do laser. Desta forma um feixe de laser focalizado sobre a microesfera, cria uma “armadilha” que mantém o centro da partícula no foco do laser. Toda vez que deslocarmos o laser, o centro irá atrás do laser e assim a partícula está aprisionada e podemos movê-la em tridimensionalmente.

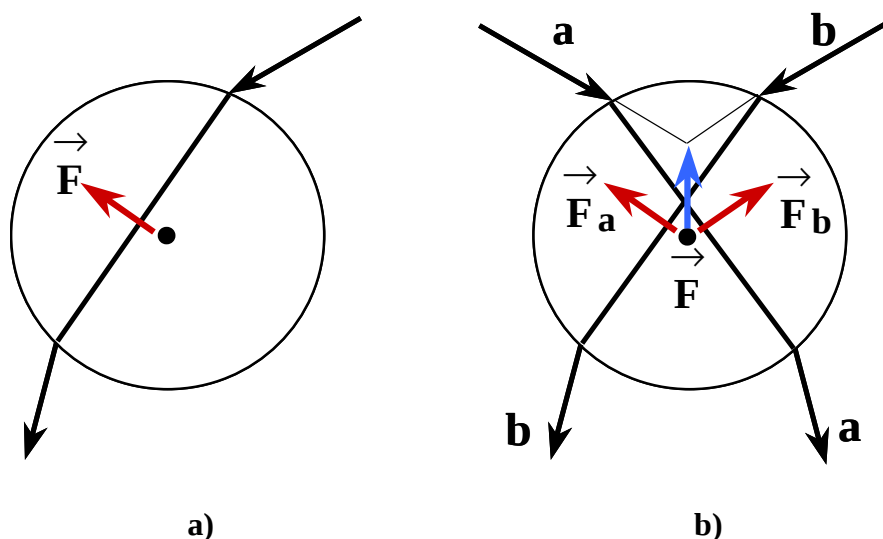


Figura 12. Transferência de momentum do fóton na pinça óptica para uma esfera. a) sentido do desvio sofrido pelo objeto quando da incidência do laser. b) dois laser produzindo uma força que mantém a esfera aprisionada por fazer o seu centro coincidir com o foco (FONTES, 1999).

Desta forma um feixe de laser focalizado sobre a microesfera, cria uma “armadilha” que mantém o centro da partícula no foco do laser. A resultante F é uma força restauradora, assim como força elástica de uma mola, conectando o centro da partícula ao foco do laser. Quando o laser é movimentado, a partícula acompanha seu movimento tridimensionalmente.

Apesar das forças ópticas envolvidas nessa pinça serem muito pequenas, em torno de 0,1 - 100 pico (10^{-12}) Newtons, são suficientemente grandes para capturar partículas com tamanho abaixo de 30 μm , cuja massa é também muito pequena. Dessa forma a pinça óptica é capaz de manipular partículas com dimensões aproximadamente entre 50 nm a 50 μm , tornando-a ideal para estudos de células, microorganismos e biomoléculas [FONTES, 2005]. No entanto esses valores pequenos de força aplicados são importantes para preservar as células e ajudam obter diferenças significativas de medidas mecânicas para populações semelhantes.

Entre várias aplicações, a técnica da pinça óptica já foi utilizada na inserção de material genético em diferentes tipos celulares [PERKINS, 2009], para mensurar o comprimento de moléculas de DNA [SAKATA, 1998], na detecção de concentrações femtomolares de antígenos [LALIBERTE, 2009], para medir deslocamentos celulares e forças de contração actina-miosina cardíaca [SUGIURA et al., 1998], na avaliação da rigidez de microtúbulos e manipulação para engenharia de biomoléculas [FELGER et

al., 1996; DINU et al., 2009] e para análise da motilidade de espermatozóides [NASCIMENTO et al., 2008] e tripanossomídeos [POZZO, 2009].

As primeiras manipulações de eritrócitos com pinça óptica foram feitas por HURUTA *et al.* 1998 e SLEEP *et al.* 1999. Recentemente foram consolidados métodos de medidas de propriedades mecânicas e elétricas eritrocitárias [FONTES et al., 2008; FONTES et al., 2011]. Vários métodos já foram propostos para se avaliar as características elásticas eritrocitária, tais como: aspiração em micropipetas [EVANS e MOHANDAS, 2000], filtração [BEREZINA et. al., 2001], reoscopia [SUTERA et al., 1985; DOBBE et al., 2002] e extensão por campos elétricos de alta frequência [KOZLOV & MARKIN, 2000]. No entanto estas técnicas são baseadas em médias e consideram um único aspecto do comportamento mecânico celular, fornecendo informações somente qualitativas. A técnica de aspiração por micropipetas apresenta a vantagem de analisar cada célula individualmente, fazendo uma correlação entre a porção de membrana invaginada para o interior da micropipeta e a elasticidade celular. Porém este método avalia a influência somente do componente membranar do eritrócito, não considerando o componente citosólico na determinação da elasticidade (Figura 13).

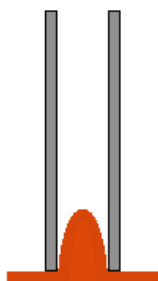


Figura 13. Ilustração do método de aspiração por micropipeta (FONTES, 1999).

Nenhum desses estudos apresenta, como a pinça óptica, as vantagens de fornecer quantitativamente os parâmetros de viscosidade da membrana e elasticidade celular com apenas um método analítico, considerando a contribuição de todos os constituintes celulares, e de ter o controle das forças aplicadas na deformação celular. Por exercer forças bem pequenas (da ordem de piconewtons), a pinça não danifica as células e permite uma maior sensibilidade na detecção de pequenas alterações fisiológicas.

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparação das amostras de concentrados de hemácias

As amostras de concentrados de hemácias utilizadas no estudo foram todas de fenótipo O (sistema ABO) e Rh positivo, coletadas em solução preservante/aditiva CPD/SAG-Manitol. Foram retiradas alíquotas através da segmentação dos tubos conectores das bolsas de concentrado de hemácia, sempre homogeneizadas previamente por ordenha com auxílio de pinça rolete. A separação dos fragmentos foi feita de maneira estéril por aparelho selador de tubo modelo composeal[®] Fresenius-Kabi evidenciado na Figura 14.



Figura 14. a) Aparelho selador de tubo conector de bolsas de coleta de sangue (composeal[®] Fresenius-Kabi). b) Detalhe do tubo conector estéril, usado para coleta de amostras de hemácias (adaptado de <http://intranet.hemobras.gov.br/> e <http://www.freseniuskabi.com>).

Todas as amostras foram fornecidas pelo Hemocentro da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). As bolsas de sangue foram provenientes de doadores de sangue comprovadamente saudáveis, conforme protocolos seleção de doadores, triagem clínica e sorotipagem estabelecidos pela Resolução Sanitária vigente [ANVISA, 2004; ANVISA 2010].

Os estudos foram realizados com anuência dos doadores de sangue, através de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no momento da doação. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOPE (parecer 03/2009).

Para medidas de potencial Zeta e elasticidade das hemácias estocadas, foram preparadas suspensões celulares diluídas em soro humano de modo a facilitar a manipulação pela pinça óptica. Para evitar aglutinação, foi sempre utilizado soro de paciente com fator Rh positivo, isento de isoaglutininas anti-Rh. Para todas as

suspensões foram adicionados 0,5 µl de concentrado de hemácias, retirado de fragmento do tubo conector, em 500 µl de soro humano.

4.2 Avaliação preliminar do efeito do polifosfato sob hemácias

Para avaliação do efeito sob as propriedades mecânicas das hemácias, soluções de polifosfato foram preparadas utilizando o sal Polifosfato de Sódio [(NaPO₃)_n, Aldrich co.] com grau de pureza de 96% e número de polimerização de 9 fosfatos, confirmado por técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ³¹P [PEREIRA, 2004].

A quantidade de partida (x) de polifosfato de sódio adicionado às amostras de células foi de **0,1 mg/ml** de concentrado de hemácias. Essa quantidade foi estimada a partir da equivalência como o fósforo contido na solução conservante CPDA-1 remanescente na bolsa de concentrado de hemácias, depois de retirada a porção correspondente ao plasma rico em plaquetas (PRP). Para este cálculo foram considerados os valores médios por bolsa de sangue total citados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de referência utilizados para cálculo das quantidades de polifosfato de sódio a serem acrescentadas na bolsa de concentrado de hemácias.

Volume de solução CPDA-1	63 ml (140 mg de Fósforo)
Volume da bolsa de Sangue Total (ST)	(450 ml de ST coletado + 63 ml de CPDA-1)
Volume do PRP	263 ml
Volume do CH	250 ml (30 mg de Fósforo)
Hematócrito do ST	40%

Os estudos preliminares foram feitos com quantidade crescente do polifosfato (0,5x, 1x, 2x e 4x) a fim de se verificar possíveis efeitos nocivos sob as células e otimizar a quantidade a ser adicionada nas bolsas doadas. Para esta avaliação inicial adicionou-se o polifosfato em hemácias coletadas em EDTA, suspensas em solução salina isotônica, sem acréscimo de nenhum outro agente conservante, e fez-se análise da sua morfologia em microscópio óptico.

4.3 Inclusão estéril do polifosfato nas bolsas de concentrado de hemácias

A solução de polifosfato a ser adicionada ao concentrado de hemácias foi depositada numa bolsa satélite que é conectada à bolsa de concentrado de hemácias por sistema de conexão estéril CompoDock® Fresenius-Kabi (Figura 15). Os tubos conectores são unidos por radiofrequência, mantendo-se os prazos de validade do hemocomponente. Este mecanismo permite a conexão de múltiplas bolsas satélites, possibilitando a separação de uma bolsa de concentrado de hemácias em várias amostras, com variadas concentrações de polifosfato.



Figura 15. a) Sistema de conexão estéril CompoDock® b) Ligação dos conectores das bolsas satélite e de concentrado de hemácias por radiofrequência.

4.4 Testes de controle de qualidade em bolsas de concentrado de hemácias

Para avaliação de possíveis efeitos negativos sobre os eritrócitos armazenados, foram feitos ensaios de controle de qualidade de rotina em bolsas de concentrado de hemácias coletadas em CPDA-1 e CPD/SAG-M, acrescidas do polifosfato de sódio também em quantidades crescentes (0,5x, 1x, 2x e 4x). Foram determinados hematócrito, níveis de hemoglobina, número de eritrócitos, grau de hemólise e controle microbiológico. A Tabela 4 mostra os valores de referência para estes parâmetros [ANVISA, 2010].

Tabela 4. Valores de referência para parâmetros de qualidade de concentrado de hemácias.

Parâmetros de Qualidade	Valores de Referência
Teor de Hb	> 12.4 g/dL
Hematócrito	50 a 70%
Hemólise	Negativo
Microbiológico	Negativo

A determinação de hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e contagem de eritrócitos (RBC) foi feita de maneira automatizada, por analisador modelo XS-1000i[®] (Sysmex), em tubo de ensaio fechado preenchido com alíquota da amostra de concentrado de hemácias. Para controle microbiológico, as amostras de concentrados de hemácias foram inoculadas em meios de cultura para crescimento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. As culturas foram analisadas automaticamente por sistema BacT/ALERT[®] (bioMérieux) que indica o eventual crescimento bacteriano por detecção de CO₂ produzido no meio. A hemólise é observada após centrifugação dos concentrados de hemácias por em 3500 RPM por 10 minutos. Todos estes ensaios foram realizados para concentrações crescentes de polifosfato (1x, 2x, 4x). As análises foram feitas após duas e três semanas de armazenamento em bolsas de dois doadores diferentes, sendo duas do primeiro coletadas em CPDA-1 e duas do segundo coletadas em CPD/SAG-M.

4.5 Avaliação do efeito do polifosfato sobre a coagulação (TP e TTPA)

A ação direta do polifosfato sobre a coagulação também foi avaliada. Através do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) pretendeu-se constatar possíveis variações nas vias extrínseca e intrínseca da coagulação respectivamente. Estes testes de monitoramento da coagulação envolvem a ativação da cascata da coagulação de modo artificial e medem o tempo transcorrido até a formação do coágulo. Foram feitas análises em plasma citratado adicionado de quantidades crescentes de polifosfato.

As análises do tempo de coagulação foram feitas de maneira automatizada em aparelho coagulômetro ACL 7000® (*Instrumentation Laboratory*), com valores de referência 10,8 e 29,1 segundos para TP e TTPA respectivamente. Foram utilizados kits de insumos reagentes Biotécnica®, específicos para determinação de TP e TTPa.

Foram calculados os tempos de coagulação para amostras de plasma adicionadas de soluções de concentrações crescentes de polifosfato de n=9 (1x, 2x, 4x e 10x).

4.6 Montagem do aparato da pinça óptica

FONTE DE LASER

Foi utilizada fonte emissora de laser do tipo Nd:YAG (*Neodimium Yttrium Aluminium Garnet*) IPG Photonics, com emissão na região do infravermelho ($\lambda = 1064$ nm), pouco absorvido por estruturas biológicas, sendo capaz de aprisionar as hemácias sem lhes causar danos térmicos.

CONJUNTO ÓPTICO

Para focalização nas hemácias o feixe emitido é direcionado, por espelhos dicróicos, a um microscópio de fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha) modificado, com remoção do seu sistema de fluorescência. O seu conjunto óptico direciona o feixe para a amostra posicionada na platina. Foi selecionada a objetiva de 100x (abertura numérica 1.25), que permite a armadilha nas três dimensões, com maior força de captura no plano vertical (figura 16) [FONTES, 2004].

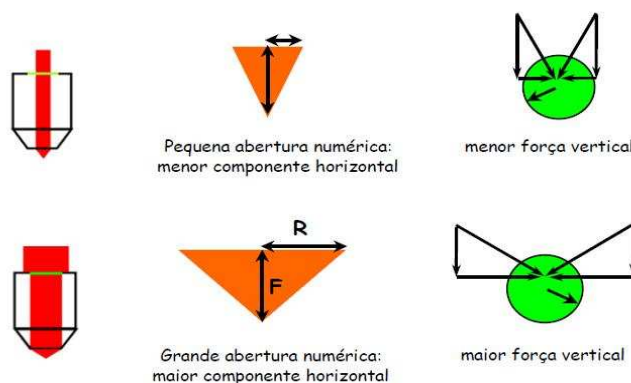


Figura 16. Influência da abertura numérica na força de aprisionamento da armadilha óptica. Uma maior abertura numérica produz uma maior componente vertical (adaptado de FONTES, 2004).

Antes de chegar ao microscópio o feixe de laser emitido deve passar por duas lentes confocais que funcionam como um telescópio. Elas possibilitam modificar a posição do foco do laser incidente na amostra biológica para que coincida com o plano de visão das oculares do microscópio, permitindo a visualização da captura. A mudança da posição de captura é feita ajustando a distância entre as lentes (Figura 17).

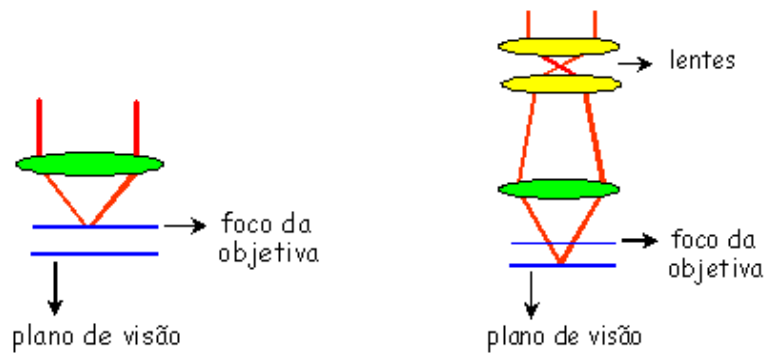


Figura 17. Função do Telescópio na pinça óptica (adaptado de FONTES, 2004).

Outra função do telescópio é regular a largura do feixe de laser que vai entrar no microscópio (Figura 18). O uso de lentes com distâncias focais diferentes, de 6 cm (f_1) e 5 cm (f_2), nesta ordem, possibilitou um melhor “preenchimento” da objetiva, com mais eficiência nas capturas.

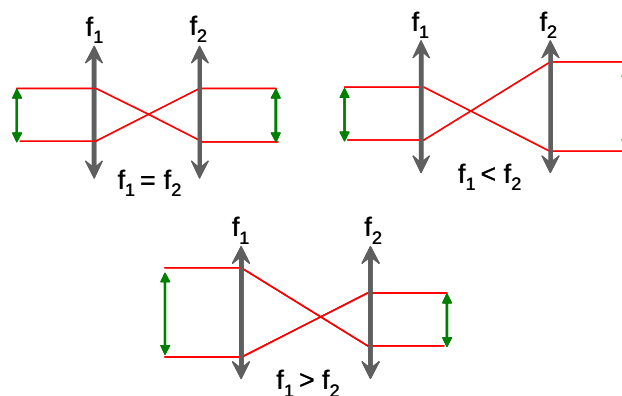


Figura 18. Representações de como as lentes do telescópio podem mudar o tamanho do feixe, f_1 e f_2 são as distâncias focais (adaptado de FONTES, 2004).

A menor potência inicial alcançada pelo laser é 500 mW. Devido à fragilidade da hemácia a essa potência de radiação, para a sua captura foi necessário o uso de uma lente atenuadora, que diminui a potência do laser para valores não superiores a 50 mW,

insuficiente para causar danos à hemácia. A Figura 19 mostra uma hemácia aprisionada na armadilha óptica criada pelo laser incidente, sem sofrer danos estruturais.

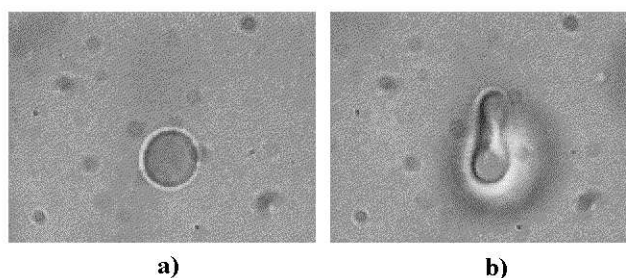


Figura 19. a) Hemácia em Repouso b) Hemácia sob ação da pinça óptica.

SISTEMA CONTROLADOR DE MOVIMENTO

O movimento da platina do microscópio é realizado por um motor de passo (modelo x) interfaceado a um software desenvolvido em plataforma LABVIEW (versão 6.0), denominado “*Corrida das Hemácias*”. Este sistema faz o gerenciamento lógico dos movimentos, controlando sentido, direção, velocidade e intervalos através de comandos previamente programados. Este software permite a realização automática da manipulação da célula a partir momento do aprisionamento.

SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGEM

O microscópio possui um sistema de captura de imagem em tempo real acoplado, constituído de câmera de vídeo (SDC-415ND, Samsung, Japão) e placa de captura (Pinnacle Systems, EUA) conectada a um computador. À câmera foi incluído um filtro móvel azul para não visualização do feixe do laser no momento da manipulação, o que facilita a visualização da estrutura a ser capturada. Este sistema de captura de imagem também é essencial para a calibração da pinça óptica, pois através dele é possível visualizar se feixe do laser está bem focado, incidindo perpendicularmente na amostra e onde está incidindo.

A Figura 20 mostra o esquema geral de montagem da pinça óptica, as fotografias da Figura 21 tiradas no laboratório de Biofísica Química Professor Ricardo Ferreira, ilustram os equipamentos utilizados.

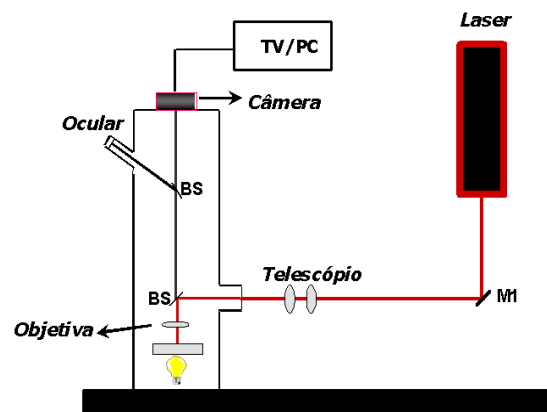


Figura 20. Esquema geral de montagem da pinça óptica.

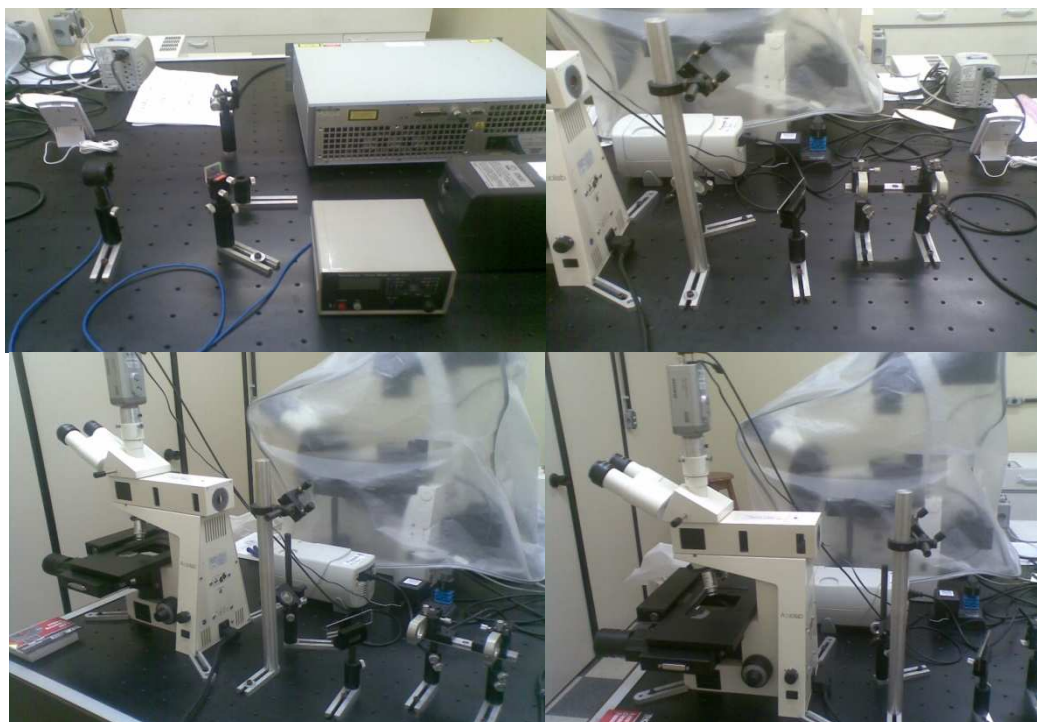


Figura 21. Fotos tiradas da pinça óptica montada no Laboratório de Biofísica Química Professor Ricardo Ferreira.

4.7 Quantificação do Potencial Zeta

O cálculo do potencial zeta de membrana do eritrócito é baseado na mobilidade eletroforética das células submetidas a voltagens crescentes. Para sua mensuração, desenvolveu-se uma câmara especialmente arquitetada para permitir a geração de campo elétrico e migração das células no seu interior. Esta câmara feita em acrílico apresenta dois reservatórios laterais que se comunicam através de um canal de 25 mm de comprimento (L), 1 mm de largura (W) e 75 μm de profundidade (δ). Nos

reservatórios foram instalados eletrodos de platina (99,95%, Heraeus, São Paulo), material não reativo em processos eletrolíticos, a uma distância de 40 mm entre si (Figura 22). Para a geração do campo elétrico foi utilizada uma fonte de alta voltagem ligada aos eletrodos (Figura 22).

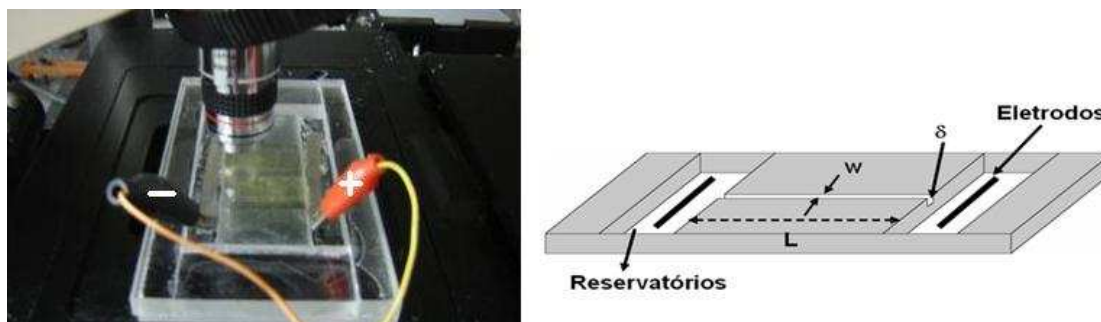


Figura 22. Câmara especial usada nas medidas de potencial zeta eritrocitário.

A suspensão de hemácias em soro humano foi adicionada na câmara acrílica em volume suficiente para preencher o canal que comunica os dois reservatórios que contém os eletrodos ligados a uma fonte geradora de voltagem. Utilizando a Pinça Óptica captura-se uma hemácia e para essa célula são aplicadas voltagens crescentes (10, 40, 50, 60, 70 e 80 V). Com esta voltagem a superfície da hemácia ficará carregada e induzirá a formação de camadas de íons no seu entorno. Ela se moverá com velocidade constante de acordo com a voltagem aplicada, como ilustra a Figura 23 a. Para cada voltagem mede-se a velocidade adquirida pela hemácia. Todas as manipulações foram gravadas em tempo real e as imagens foram analisadas qualitativamente com auxílio dos softwares Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e VirtualDub (by Avery Lee). Pelo menos 15 células foram analisadas para cada situação de armazenamento. O potencial Zeta foi determinado experimentalmente através da equação de Smoluchowski [SZE, 2003]:

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

Onde v é a velocidade adquirida pela célula, E é o campo elétrico dado pela voltagem dividida pela distância entre os eletrodos, ϵ é a constante dielétrica do soro sanguíneo e η é a viscosidade do soro sanguíneo medida utilizando um viscosímetro de

Ostwald. Assim, através da determinação do coeficiente angular da curva de velocidade em função do campo elétrico podemos quantificar o potencial Zeta do eritrócito, em mV (Figura 23 b).

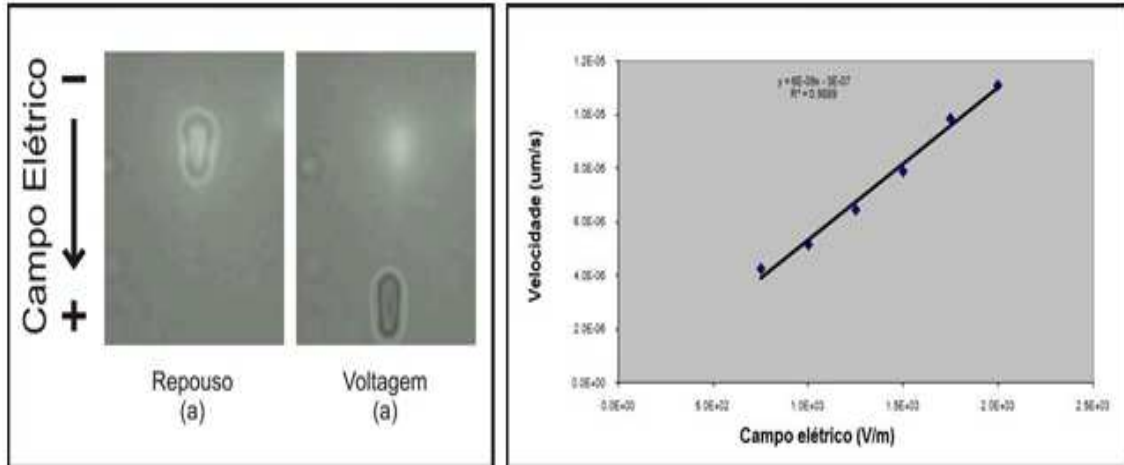


Figura 23. a) Migração de hemácia submetida a campo elétrico. b) Gráfico da velocidade adquirida pela hemácia em função do campo elétrico gerado pela diferença de potencial aplicada.

4.8 Quantificação da Elasticidade

No modelo proposto para cálculo da elasticidade celular a suspensão de hemácias em soro humano é depositada em uma câmara de Neubauer. Depois de capturadas pela armadilha óptica as hemácias são movimentadas com velocidades progressivas constantes (entre 150 e 250 $\mu\text{m/s}$), através do controlador lógico comandado por computador. As hemácias sofrem progressiva elongação quando arrastadas no meio, até o ponto de equilíbrio entre a sua capacidade de deformação (força elástica) e a força hidrodinâmica exercida pelo meio, onde se atinge a máxima elongação celular. Neste momento tem-se:

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

Onde L_0 é a elongação da hemácia em repouso, L é a sua elongação sob efeito da força hidrodinâmica, v é a velocidade cuja célula foi submetida, Z_{eq} é distância da hemácia até o fundo da câmara de Neubauer e η a viscosidade do fluido.

A medida da resistência elástica celular μ pode ser feita pelo cálculo do coeficiente angular α da reta da elongação celular em função da velocidade aplicada (Figura 24).

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

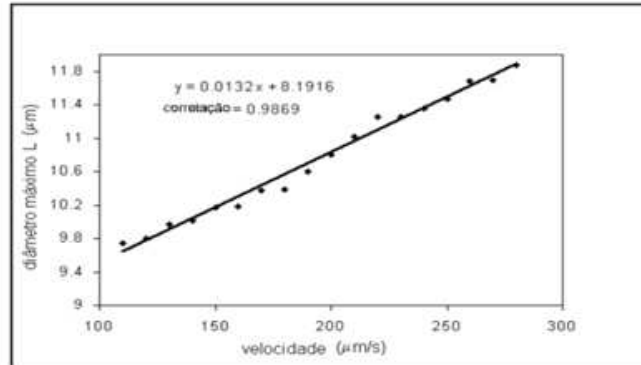


Figura 24. Equação modificada para cálculo da elasticidade (μ) a partir do coeficiente angular (α) da reta da elongação da hemácia em função da velocidade aplicada.

Os softwares Image Pro-Plus e VirtualDub são aqui também usados, para aferição das elongações L_0 e L , a partir das imagens obtidas pelo sistema de captura acoplado ao microscópio da pinça (Figura 25).

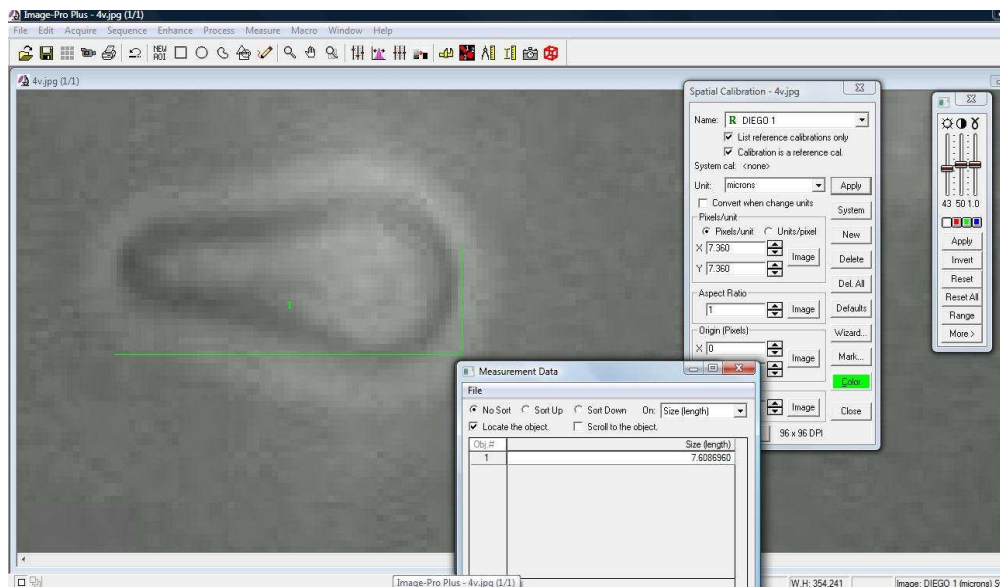


Figura 25. Medição da elongação do eritrócito com auxílio do software Image Pro-Plus.

O valor de μ é expresso em dina/cm^2 . Quanto maior for a variação da elongação entre as velocidades aplicadas a uma mesma célula, menor será o valor de μ . Pelo

menos 15 células foram analisadas para cada situação de armazenamento. A Figura 26 mostra o acréscimo da elongação de uma mesma célula em velocidades progressivas.

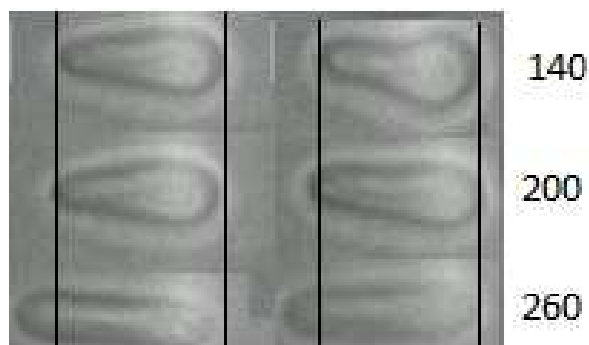


Figura 26. Exemplos de elongação de hemácias submetidas a velocidades crescentes ($\mu\text{m/s}$).

Vale a pena ressaltar que a elasticidade calculada é uma grandeza inversamente proporcional à elasticidade celular, assim como a constante elástica de uma mola: quanto maior for o seu valor, mais rígida será a célula.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados da avaliação preliminar do efeito do polifosfato de sódio sobre hemácias

Os estudos preliminares feitos com quantidades crescentes de polifosfato de sódio (0,5x, 1x, 2x, 4x) adicionadas a hemácias suspensas em solução salina não mostraram alterações morfológicas significantes em relação ao controle (sem adição de polifosfato) após 24 horas de armazenamento. Porém, após duas semanas de incubação, as amostras com polifosfato apresentaram células com melhor morfologia, se comparado à amostra controle. Imagens representativas das hemácias são demonstradas na Figura 27. Vale a pena lembrar que aqui as hemácias foram armazenadas em EDTA a 4°C que não é um conservante e sim apenas um anticoagulante.

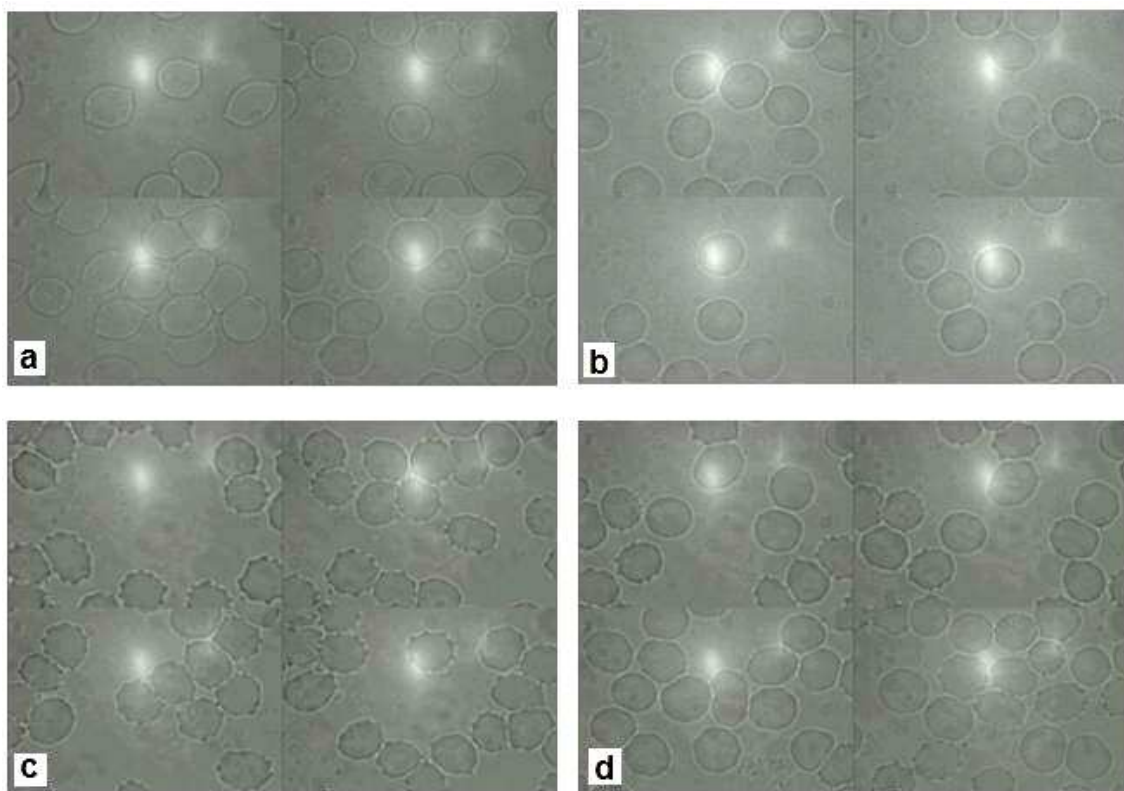


Figura 27. Imagens de microscopia de diferentes campos apresentando: a) Hemácias controle após 24 horas de armazenamento. b) Hemácias com polifosfato (4x) após 24 horas de armazenamento. c) Hemácias controle após duas semanas de armazenamento d) Hemácias com polifosfato (4x) após duas semanas de armazenamento.

Outra observação relevante é de que após duas semanas de incubação, percebe-se uma menor quantidade de equinócitos por campo na amostra de hemácias na presença do polifosfato. As hemácias com a quantidade de polifosfato 4x (0,4 mg/ml)

apresentaram melhor morfologia, sendo então esta quantidade a escolhida para incubação nas bolsas de sangue. A forma de equinócito é a morfologia eritrocitária característica de células envelhecidas, sendo sinal da degradação de proteínas estruturais e de constituintes de membrana. [HALBHURBER, 1983]. A menor quantidade de equinócitos na presença do polifosfato pode indicar um retardo na ocorrência de lesões de estoque, sugerindo sua possível ação preservante sobre hemácias.

5.2 Resultados dos testes de controle de qualidade de concentrados de hemácias com e sem o polifosfato de sódio

Os resultados dos testes de controle de qualidade de concentrados de hemácias, rotineiros nos serviços de hemoterapia, permitem avaliar a eficácia e segurança pós-transfusional do hemocomponente. Os testes de controle de qualidade realizados em bolsas de concentrados de hemácias de dois doadores diferentes, um armazenado em CPDA-1 e outro armazenado em CPD/SAG-M, após duas e três semanas de incubação com polifosfato, mostraram resultados aceitáveis considerando os parâmetros de qualidade estabelecidos pela normatização vigente [ANVISA, 2004; ANVISA, 2010], conforme mostram as Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Resultados de testes de controle de qualidade para concentrados de hemácias sem e com a ação do polifosfato após duas e três semanas de armazenamento em CPDA-1.

Parâmetros de Qualidade	Referência	2 semanas		3 semanas	
		Controle	PoliP	Controle	PoliP
RBC	u/ μ L	8.13×10^6	8.03×10^6	7.6×10^6	7.35×10^6
Hb	> 12.4 g/dL	24.3	24	23.7	23.7
Hct	50 a 80%	71	70.2	73.1	68.9
Hemólise	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Microbiológico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 6. Resultados de testes de controle de qualidade para concentrados de hemácias sem e com a ação do polifosfato de sódio após duas e três semanas de armazenamento em CPD/SAG-M.

Parâmetros de Qualidade	Referência	2 semanas		3 semanas	
		Controle	PoliP	Controle	PoliP
RBC	u/ μ L	6.5×10^6	6.49×10^6	6.6×10^6	6.49×10^6
Hb	> 12.4 g/dL	19.3	19.1	19.2	19.1
Hct	50 a 80%	58.9	60.3	60.6	61.0
Hemólise	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Microbiológico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

A presença do polifosfato provocou uma discreta diminuição na quantidade total de células, sem aumento dos níveis de hemoglobina livre e diminuição do hematócrito. As variações observadas ocorreram em proporções não significantes, permanecendo os concentrados de hemácia acrescidos de polifosfato de sódio em condições viáveis para transfusão, tanto nas bolsas de CPDA-1 quanto nas bolsas de CPD/SAG-M. Os resultados negativos do controle microbiológico indicam a eficiência do procedimento adotado para adição do polifosfato nas bolsas, com manutenção da esterilidade mesmo após a abertura do sistema.

5.3 Resultados da avaliação do efeito do polifosfato sobre o tempo de coagulação

Os resultados do teste de TP (Tempo de Protrombina) indicaram que a presença do polifosfato (n = 9) não interferiu na via extrínseca da coagulação sanguínea (Figura 28 a). Já os tempos observados para o TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada) mostraram um retardo do início da coagulação, indicando influência do polifosfato de sódio na via intrínseca. O TTPa foi crescente com o aumento da quantidade de polifosfato adicionada na amostra avaliada (Figura 28 b).

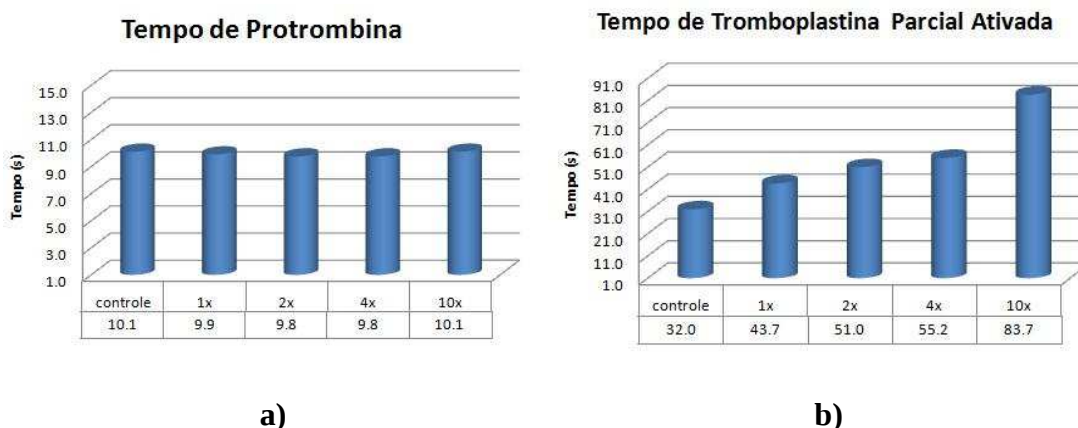


Figura 28. a) Evolução do Tempo de Protrombina em quantidades crescentes de polifosfato de sódio (n = 9). b) Evolução do Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada em quantidades crescentes de polifosfato de sódio (n = 9).

Estudos anteriores mostravam que o polifosfato de sódio atua diminuindo o tempo de coagulação por ativação de fatores da via intrínseca, porém esta ação só se mostrou aparente em cadeias com mais de 25 grupos fosfatos condensados, sendo realmente significativos em cadeias com mais de 75 monômeros [SMITH, 2006]. Os resultados com o polifosfato (n = 9) mostraram que o mesmo não diminuiu o tempo de coagulação, e sim aumentou, possivelmente por ação direta sobre o sequestro de íons Ca^{2+} , agente co-fator da ativação da coagulação. A interação entre cadeias de polifosfato e íons Ca^{2+} é bastante efetiva tendo sido evidenciada através de estudos de RMN ^{31}P em formulações aquosas contendo estes íons [PEREIRA, 2007].

5.4 Resultados das quantificações da elasticidade dos eritrócitos pela técnica da pinça óptica

A perda da deformabilidade pode ser facilmente percebida visualmente pela observação microscópica das células aprisionadas em movimento, sob velocidades crescentes. A Figura 29 mostra a diferença entre a elongação de células na primeira e na quinta semana de estocagem.

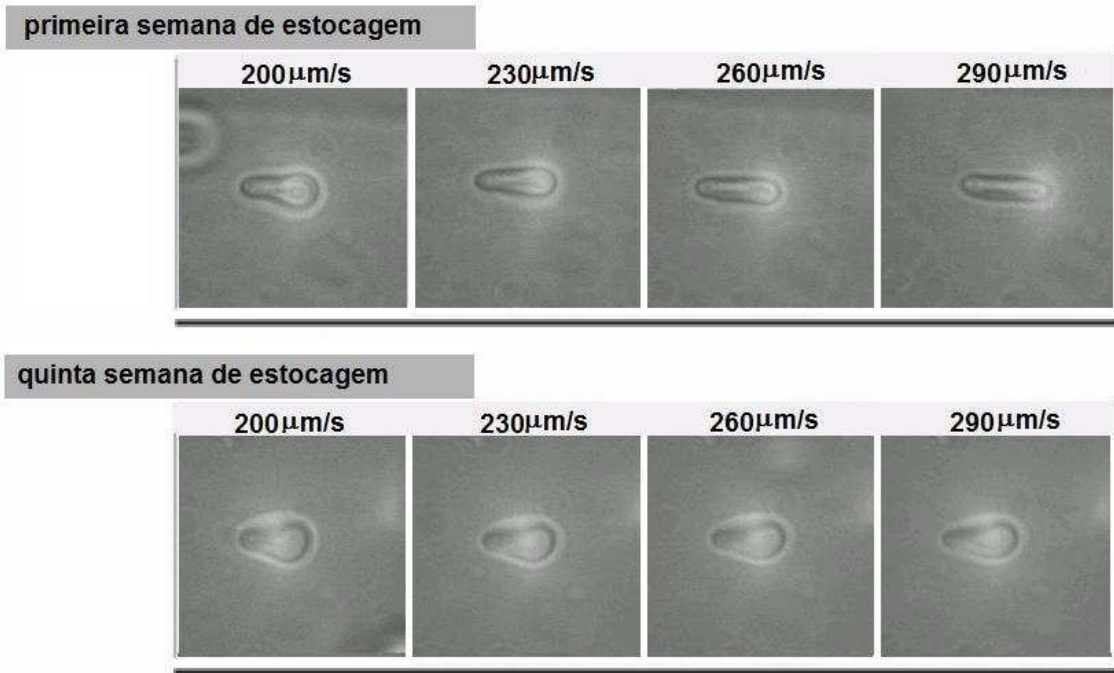


Figura 29. Micrografias de hemácias aprisionadas pela pinça óptica, submetidas a velocidades crescentes ($\mu\text{m/s}$), após primeira e quinta semana de armazenamento.

Após o estabelecimento da metodologia para a medida da elasticidade através das pinças ópticas, a Figura 30 ilustra a elongação em função da velocidade de arraste da primeira hemácia do grupo estudado, na primeira (com 7 dias) e na quinta semana de armazenamento (com 35 dias). Através da comparação entre as retas, é possível verificar a perda de elasticidade sofrida pelas hemácias da quinta semana. A deformação sofrida pela hemácia é proporcional à velocidade e essa proporcionalidade é dada pelo coeficiente angular. Assim como vimos na metodologia, $L - L_0 = \Delta L = \left(\eta L_0^2 / \mu Z_{eq} \right) v$, onde v é a velocidade, L é a elongação, L_0 é o tamanho em repouso extraído do coeficiente linear e $\left(\eta L_0^2 / \mu Z_{eq} \right)$ é o coeficiente angular de onde extraímos a elasticidade μ da hemácia. Quanto menos inclinada a reta, menor é o coeficiente angular e maior o valor de μ – lembrando que quanto maior o μ , menos elástica é a célula – vemos que a hemácia de 35 dias apresenta menor coeficiente angular e, portanto é menos elástica.

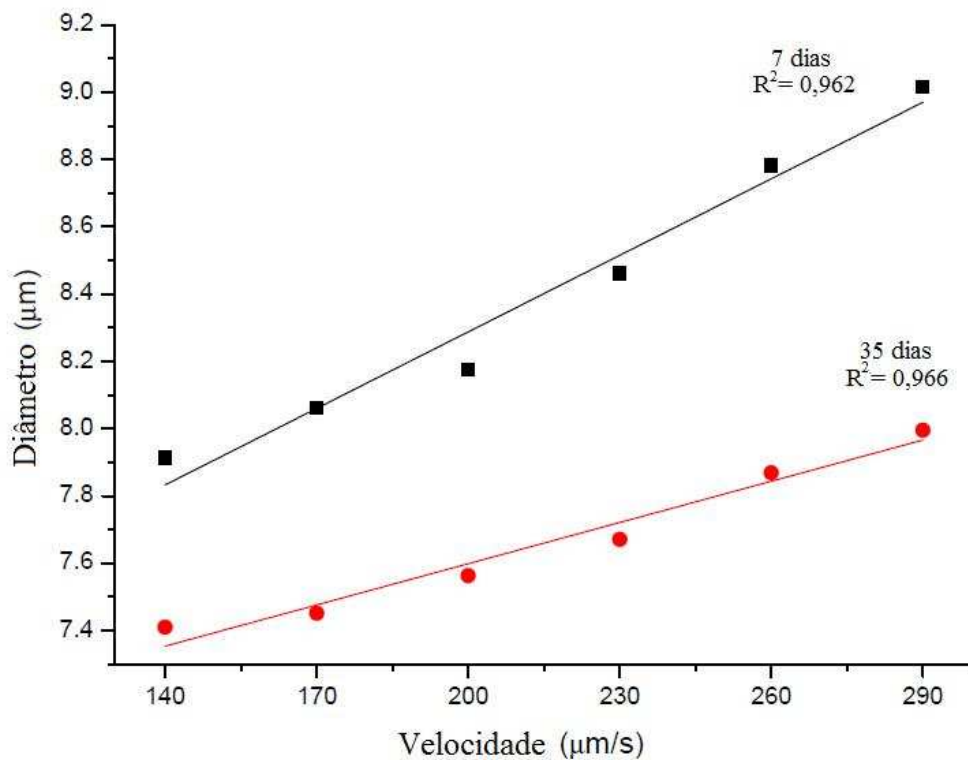


Figura 30. Comparação da inclinação das retas das elongações celulares médias em função da velocidade aplicada referentes à primeira e à quinta semana de armazenamento.

Após a primeira semana de armazenamento (dia 7) o valor médio de elasticidade obtido (após a análise de todas as células medidas) foi de aproximadamente $4,0 \times 10^{-4}$ dina/cm, permanecendo este valor constante até o final da segunda semana (dia 14). Ao final da terceira semana observou-se uma leve diminuição da elasticidade e o valor encontrado foi $4,6 \times 10^{-4}$ dina/cm, acentuando-se ao término da quarta semana apresentando o valor $6,4 \times 10^{-4}$ dina/cm e atingindo o valor de $9,6 \times 10^{-4}$ dina/cm na quinta semana de armazenamento, assim como mostra a Figura 31 e a Tabela 9. Observa-se uma redução de 134% ao longo da estocagem em relação à deformabilidade inicial.

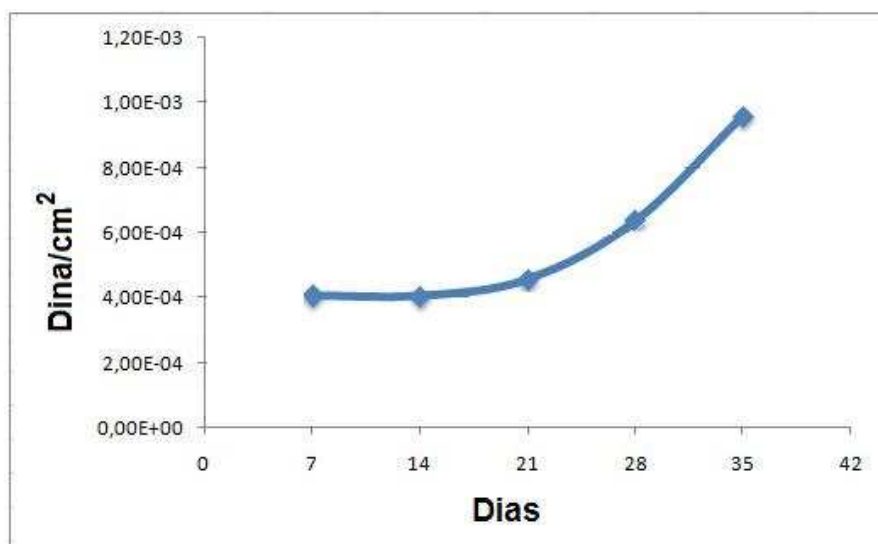


Figura 31. Evolução temporal da elasticidade de hemácias estocadas em CDP/SAG-Manitol.

Tabela 7. Valores de elasticidade calculados pela técnica da pinça óptica para hemácias armazenadas em DPD/SAG-Manitol

Tempo de Armazenamento	Elasticidade (dina/cm ²)
7 dias	4,08 x 10 ⁻⁴
14 dias	4,07 x 10 ⁻⁴
21 dias	4,57x 10 ⁻⁴
28 dias	6,37 x 10 ⁻⁴
35 dias	9,60 x 10 ⁻⁴

A partir de 21 dias de armazenamento, observa-se que a perda de elasticidade torna-se mais acentuada, o que condiz com a condição natural do eritrócito em armazenamento. É conhecido que se a hemácia estivesse na presença de apenas um agente anticoagulante e de glicose, teria viabilidade somente até este prazo [LOUTIT e MOLLISON 1943]. Além disso, estudos feitos em hemácias irradiadas também mostraram perdas mais significantes das propriedades de elasticidade após armazenamento por mais de 21 dias [FONTES, 2011]. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a transfusão de hemácias pode ser mais eficiente durante as três primeiras semanas de armazenamento. Após a quinta semana de armazenamento (prazo de validade do concentrado de hemácias em CPD/SAG-Manitol) o estado fisiológico

das células estava comprometido a ponto de inviabilizar as medidas da última semana de estocagem (42 dias).

5.5 Resultados da avaliação do efeito do polifosfato de sódio sobre a elasticidade de eritrócitos em armazenamento

As hemácias incubadas com polifosfato de sódio apresentaram menor perda de elasticidade em relação às hemácias controle. Porém a diferença só foi significativa após a quarta semana de armazenamento (Figura 32). Com 35 dias, o valor de elasticidade calculado foi de $6,7 \times 10^{-4}$ dina/cm², uma deformabilidade cerca de 30% maior em relação ao controle.

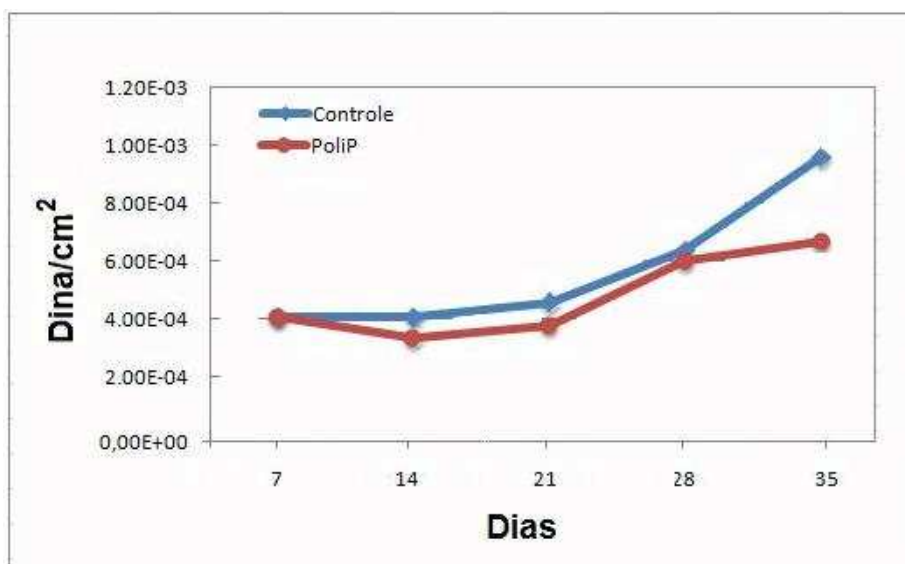


Figura 32. Comparativo das evoluções temporais da elasticidade de hemácias estocadas em CDP/SAG-Manitol, na ausência (controle, linha azul) e na presença de polifosfato de sódio (linha vermelha).

O valor do teste estatístico nível-p para a quinta semana foi 0,038. Isso significa que existe 3,8% de chance de que a diferença observada seja um “acaso”, desta forma podemos dizer então que esse resultado é estatisticamente significativo e que as populações são distintas (nível-p < 0,05 é considerado estatisticamente significativo). Já para as outras semanas, o nível-p foi maior que 0,93 indicando que não há diferença significativa entre as populações.

Estes resultados inicialmente indicam a manutenção da viabilidade das hemácias na presença do polifosfato de sódio (grau de condensação n = 9) e corroboram para

afirmá-lo como um potencial agente conservante de eritrócitos em armazenamento. As suas características conservantes podem explicar a ação do polifosfato no retardo do aparecimento das lesões de estoque em concentrados de hemácias. Pelo menos 15 células foram avaliadas para cada dia para o concentrado de hemácias com e sem polifosfato. Isso totaliza aproximadamente um total de 150 células analisadas. A análise das imagens é laboriosa, pois ainda é manual, já que algoritmos de processamento de imagens ainda apresentam falhas na medida automatizada da elongação. Apesar do número de células analisadas ainda não ser ideal, podemos confiar nos resultados, pois os mesmos apresentam o mesmo perfil de estudos anteriores realizados através da mesma metodologia onde mais de 1000 células foram avaliadas [FONTES, 2011].

5.6 Resultados das quantificações de potencial Zeta dos eritrócitos pela técnica da pinça óptica

Após o estabelecimento da metodologia para a medida de potencial Zeta através das pinças ópticas, o valor médio de potencial Zeta para hemácias com 24 horas de armazenamento em CPD/SAG-Manitol foi de $-14,8$ mV. Assim como mostra a figura 33 e a tabela 10, as células estocadas apresentaram valores decrescentes de potencial Zeta a partir do primeiro dia de doação até segunda semana de armazenamento (até dia 15), estabilizando-se a partir da segunda semana. Observa-se que a maior queda do potencial Zeta ocorre na primeira semana de armazenamento e que no total existe uma queda de aproximadamente 47% do potencial Zeta ao longo da estocagem. Esse trabalho foi publicado na Revista Brasileira de Análises Clínicas em decorrência de ter ganhado o prêmio de melhor trabalho no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas em 2010 [SILVA et. al ., 2011].

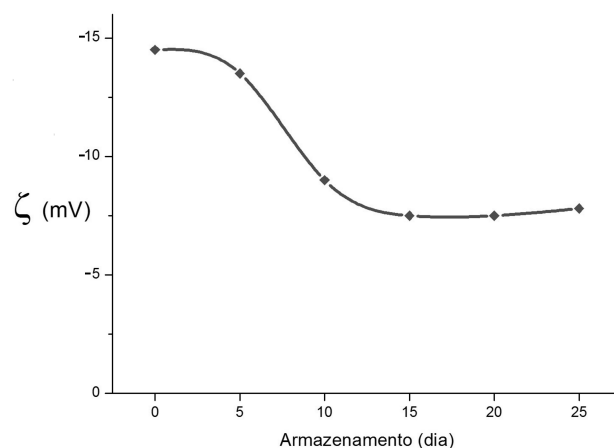


Figura 33. Evolução temporal do potencial Zeta de hemácias durante o armazenamento em CPD/SAG-Manitol.

Tabela 8. Valores de potencial Zeta (mV) calculados para hemácias armazenadas em CPD/SAG-Manitol.

Tempo de Armazenamento	Potencial zeta (mV)
1 dia	-14,8
5 dias	-13,5
10 dias	-9,0
15 dias	-7,5
20 dias	-7,5
25 dias	-7,8

A mobilidade eletroforética do eritrócito está diretamente relacionada com a densidade de ácido siálico, principal responsável pela carga negativa da membrana. A perda gradual de carga superficial sugere um mecanismo fisiológico de eliminação dos eritrócitos senescentes da circulação [DANON e MARIKOSVSKY, 1961; DUROCHER, 1975]. A remoção do ácido siálico da membrana por enzimas sialidases (ex. neuraminidase) diminui a sobrevivência *in vivo* e aumenta a ação fagocítica de macrófagos sobre as hemácias *in vitro* [SEAMAN, 1977]. O aumento da hidrofobicidade por perda de carga eleva a aderência do eritrócito a superfícies, como o endotélio vascular e intercelular [JOVTCHEV, 2000]. Assim verifica-se, que não só a avaliação da elasticidade, mas também a avaliação do potencial Zeta é um parâmetro

importante de qualidade da célula referente ao armazenamento do concentrado de hemácias que pode refletir no rendimento transfusional.

A glicoforina A é uma das proteínas que mais apresenta ácido siálico e, portanto uma das principais responsáveis pela carga negativa das hemácias. A perda de glicoforina está relacionada a danos oxidativos, isso indica que a diminuição do potencial zeta observado no armazenamento pode estar ligada a danos oxidativos gerados em consequência das lesões de estoque [GODIN E CAPRANI, 1997; JOVTCHEV, 2000].

A glicoforina A possui uma interligação com a proteína banda 3. Além da banda 3 ser o principal ponto de ancoragem do citoesqueleto na membrana plasmática, de acordo com os autores a modificação da proteína banda 3 está intimamente relacionada com o comportamento elástico da membrana. Eles relatam que ocorre uma perda da elasticidade em células que tiveram o ácido siálico removido por neuroamidase e que isso pode ter ocorrido devido a próxima relação existente entre a glicoforina A e a banda 3 [GODIN E CAPRANI, 1997]. Dessa forma existe uma hipótese que a diminuição do potencial zeta nas primeiras semanas de armazenamento, ocorrida devido a lesões oxidativas, venha refletir na perda de elasticidade celular observada de forma mais crítica a partir da terceira semana de armazenamento (21 dias).

Além de prever a qualidade das hemácias estocadas, a metodologia proposta para medir o potencial zeta pode ajudar a padronização de rotinas automatizadas nos centros de hemoterapia e melhorar os testes imunoematológicos, baseados na aglutinação celular causada pela interação entre antígenos e anticorpos eritrocitários, que frequentemente necessita da redução do potencial zeta através de substâncias potencializadoras artificiais (ex. Papaína, bromelina e polietilenoglicol) para permitir a aglutinação. Pode ainda ser estendida e usada em outros tipos de amostras, onde o potencial zeta é parâmetro importante. Por exemplo, no caso do câncer, existem relatos que mostram que o potencial zeta e a viscoelasticidade são parâmetros celulares importantes não só para estudar e compreender a doença, mas também para desenvolver novos protocolos de diagnóstico, principalmente métodos mais precoces.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo mostraram a eficiência de uma nova metodologia, sensível e reprodutível, utilizando pinças ópticas para determinação de propriedades elétricas e mecânicas de eritrócitos, permitindo além da análise qualitativa, a quantificação da elasticidade e do potencial Zeta eritrocitários. A capacidade de captura e manipulação da armadilha óptica nos permitiu caracterizar individualmente cada célula, de modo mais sensível a pequenas diferenças do que outras técnicas baseadas em valores médios, que não consideram a estrutura celular como um todo.

O polifosfato de sódio (com $n=9$) mostra-se notadamente interessante como possível agente preservante de eritrócitos, pelas suas características conservantes de membrana e constituintes citoplasmáticos, ação estabilizante, entre outras. Este insumo não causou modificações negativas significativas em parâmetros de qualidade dos concentrados de hemácias e promoveu redução na perda de elasticidade celular em 30% quando comparado ao grupo controle, preditivo da melhora da condição fisiológica e viabilidade pós-transfusional do eritrócito, tão pouco reduziu o tempo de coagulação, apresentando resultados contrários ao relatado na literatura para cadeias maiores de polifosfato.

Apesar dos resultados observados condizerem com estudos anteriores, onde mais de 1000 células foram analisadas. Um maior número de medidas deve ser realizado em unidades de sangue doado, aumentando o “ n ” e tornando os resultados estatisticamente mais significantes. Os estudos célula a célula são vantajosos, mas exigem técnicas mais laboriosas de análise e isso também levou a um menor número de células analisadas. Pretendemos investir esforços na otimização de algoritmos para processamento de imagens e para a automatização das medidas.

Um estudo futuro será realizado para avaliação da ação isolada do polifosfato ($n=9$) em concentrados de hemácias, na ausência de outros agentes preservantes, associado a um estudo quimiométrico para se chegar à formulação de solução com concentração “ideal” de polifosfato para adição às bolsas de concentrados de hemácias. Além disso serão avaliados efeitos do polifosfato sobre células irradiadas por radiação gama. As células irradiadas apresentam lesões de estoque mais significativas e assim a ação do polifosfato pode ser mais aparente. Estudos da ação do polifosfato no potencial Zeta também está entre nossos objetivos futuros.

A segurança clínica do uso do polifosfato ($n=9$) deve ser levantada por estudos toxicológicos, com destaque para possíveis efeitos sobre a coagulação sanguínea.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASHKIN A, DZIEDZIC J, “Internal Cell Manipulation Using Infrared Laser Traps”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:7914-7918 (1989).

ASHKIN A, DZIEDZIC J, “Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria”, *Science*, 235:1517-1520 (1987).

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

BEREZINA TL, ZAETS SB, MORGAN C, SPILLERT CR, KAMIYAMA M, SPOLARICS Z, DEITCH EA, MACHIEDO GW, “Influence of storage on red blood cell rheological properties” *J. Surg. Res.*, 102(1): 6-12 (2001).

BORN GVR, PALINSKI W, “Increased microvascular resistance to blood flow in the rat hindlimb after perfusion with neuraminidase”, *J Physiol* 419:169-176 (1989).

BORN GVR, PALINSKI W, “Unusually high concentration of sialic acid on the surface of vascular endothelia”, *Br J Exp Pathol* 66:543-550 (1985).

BRANDÃO MM, “Aplicação da Pinça Óptica para o estudo da deformabilidade das hemácias” Tese (Doutorado em Clínica Médica), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 102p. (2003).

CAIRUTAS CM, “Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico” v. único, Ed. Universitária UFPE, (1985).

CARTER HB, COFFEY DS, “Cell-surface charge in predicting metastatic potential of aspirated cells from the dunning rat prostatic adenocarcinoma model”, *J. Urol.*, 140: 173-175, (1988).

CLEMENS MR, WALTER HD, “Lipid Peroxidation in erythrocytes”, *Chem. Phys. Lip.*, 45:251-268 (1987).

COWLING RT, BIRNBOIM C, “Incorporation of [32P] Orthophosphate into inorganic polyphosphates by human granulocytes and other human cell types”, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(13):9480-9485 (1994).

DALMAS PS, “Utilização de trifosfato de sódio na elaboração de embutido fermentado a base de carne caprina” Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 54p. (2004).

DANON D, MARIKOVSKY Y, “Difference de charge eletrica de surface entre erythrocytes jeunes et ages” CR Acad Sci., 253: 1271-1272 (1961).

DERN RJ, BREWER GJ, WIORKOWSKI JJ, “Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. J. Lab. Clin. Med. 69: 968-978 (1967).

DINU C, CHAKRABARTY Z, LUNSFORD T, MAUER EC,.; PLEWA J, DORDICK JS, CHRISEY DB, “Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly” Soft Matter, 5: 3818-3822 (2009).

DOBBE JG, HARDEMAN MR, STREEKSTRA GJ, STRACKEE J, INCE C, GRIMBERGEN CA, “Analyzing red blood cell-deformability distributions”, Blood Cells Mol. Dis.,28(3): 373-384 (2002).

DUROCHER JR, PAYNE RC, CONRAD ME, “Role of sialic acid in erythrocyte survival”, Blood, 45: 11-20 (1975).

EVANS E, MOHANDAS N, “Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular and genetic defects”. Annu Rev Biomol Struct., 23:787-818 (2000).

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

FELGNER H, FRANK R, SCHLIWA M. “Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers”, J Cell Sci., 109:509 (1996).

FONTES A, “Manipulação e Microanálise com pinças ópticas”. Tese (Doutorado em Física) Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 271p. (2004).

FONTES A, “Uso de Lasers para Manipulação e Medidas de Células Vivas” Dissertação (Mestrado em Física) Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 99p. (1999).

FONTES A, BARJAS-CASTRO ML, BRANDAO MM, FERNANDES HP, THOMAZ AA, HURUTA RR, POZZO LY, BARBOSA LC, COSTA FF, SAAD STO, CESAR CL, “Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers”, Journal Optics, 13:8p (2011).

FONTES A, BARJAS-CASTRO ML, FERNANDES HP, THOMAZ AA, BARBOSA LC, CESAR CL, “Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers” *Journal of Biomedical Optics*, 13:014001-1 - 014001-6 (2008).

FONTES A, THOMAZ AA, POZZO L, BARJAS-CASTRO ML, BRANDÃO MM, SAAD STO, BARBOS ALC, CESAR CL, “Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers”, *Proceedings of SPIE - Optical Trapping and Optical Micromanipulation II*, 5930:439-444 (2005).

GIBSON JP, REES SB, MC MANUS TJ, SCHEITLIN WA, “A citrate phosphate dextrose solution for the preservation of human blood”, *Amer. J. Clin. Path.*, 28:569-72 (1957).

GODIN C, CAPRANI A, “Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity” *Eur Biophys J.*, 26: 175–182 (1997).

GREENWALT TJ, SOSTOK CZ, DUMASWALA UJ, “Studies in red cell preservation” *Vox Sang.*, 58:90-93 (1990).

HALBHUBER KJ, FEUERSTEIN H, STIBENZ D, LINSS W, “Membrane alteration during banking of red blood cells”, *Biomed Biochim Acta.*, 42(11-12):337-341 (1983).

HERNADES AAH, BLANCO RV, “Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función”, *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 21(3) (2005).

HOGMAN CF, ERIKSSON L, ERICSON A, REPPUCI AJ, “Storage of saline - adenine - glucose - mannitol - suspended red cells in a new plastic container”, *Transfusion*, 31:26-29 (1991).

HOURANT P, “General properties of the alkaline phosphates: Major food and technical applications”, *Proceedings of IMPHOS, Phosphorus Research Bulletin, The Journal of Inorganic Phosphorous Chemistry*, 15:85-94 (2004).

HUNTER RJ. *Zeta potential in colloid science: principles and applications.* London Academic Press (1981).

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

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

KIM HY, "Pharmaceutical composition of health food having antioxidazing activity comprising poliphosphate as na effective ingredient", International application published under the Patent Corporation Treaty (PCT). World Intellectual Property Organization WO 110462 A1 (2004).

KLINKEN SP, "Red blood cells", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12):1513-1518, (2002).

KORNBERG A, RAO NN, AULT-RICHÉ D, "Inorganic Poliphosphate: A molecule of many functions". *Annual Review of Biochemistry*, 68:89-125 (1999).

KOZLOV MM, MARKIN VS, "Model of red blood cell membrane skeleton: eletrical and mechanical properties", *J. Theor. Biol.*, 129:439-452 (2000).

KULAEV I, KULAKOSKAYA T, "Poliphosphate and Phosphate Pump", *Annual Review of Microbiology*, 54:709-734 (2000).

KULAEV I, VAGABOV V, KULAKOSKAYA T, "The Biochemistry of Inorganic Poliphosphate", New York: John Wiley and Sons, p. 277, 2004.

LALIBERTE M, BORDELEAU F, MARCEAU N, SHENG Y, "Antigen detection at atomolar concentration using optical tweezers" *Proceedings of SPIE*, 7386:09 (2009).

LEE ID, PALSSON BO, "A comprehensive model of human erythrocyte metabolism: extensions to include pH effects", *Biomed. Biochim. Acta*. 49: 771-789 (1991).

LEE R, FOERSTER J, LUKENS J, PARASKEVAS F, GREER J, RODGERS G, "Wintrobe's Clinical Hematology" 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p.196-217, (1999).

LEYHAUSEN G, "Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells", *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5):803-812 (1998).

MOHANDAS N, CHASIS JA, “Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids”, *Semin. Hematol.* 30:171-192 (1993).

MULQUINEY PJ, KUCHEL PW, “Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations and parameter refinement”, *Biochem. J.* 342:581-596 (1999).

MURADOR P, DEFFUNE E. “Aspectos estruturais da membrana eritrocitária”, *Rev. bras. hematol. hemoter.*;29(2):168-178 (2008).

NAKAO M, NAKAO T, ARIMATSU Y, YOSHIKAWA H., “A new preservative medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocytes”, *Prog. Jap. Acad.* 36-43 (1960).

NASCIMENTO JM, SHI L, MEYERS S, GAGNEUX P, LOSKUTOFF NM, BOTVINICK EL, BERNIS MW, “The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates” *J. R. Soc. Interface*, 5(20): 297-302 (2008).

NASH GB, GRATZER WB, “Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane”, *Biorheology.* 30:397-407 (1993).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), “Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Phosphoric acid, poliphosphate and their calcium, magnesium, potassium and sodium salts”, *Septuagésimo Informe de Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares, Série de Aditivos Alimentares*, 5:539 (1974).

PEARSON TC, “Hemorheology in the erythrocytoses”, *Mt. Sinai. J. Med.* 68(3):182-191 (2001).

PEREIRA JCB, “Estudo Físico-Químico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para Nutrição Parenteral” *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife*, 119p. (2007).

PEREIRA JCB, AZEVEDO FILHO CA, SÁ JB, BALTAR CAM, SANTOS, BS, “Polifosfato de sódio como fonte alternativa de fosfato em formulações para nutrição parenteral: estudo físico-químico de estabilidade”, In: XXVI CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUÍMICA / 27a reunião anual da sociedade brasileira de química, 2004, salvador. livro de resumos, v. único, 2004.

PERKINS TT, “Optical traps for single molecule biophysics: a primer” *Laser & Photon.* 3:203-220 (2009).

PIERRE B, “DEHP in blood bags medical plastic: their limitations”, *Canad. Res.* 14(4):13-25 (1981).

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

POZZO L, FONTES A, THOMAZ AA, SANTOS BS, FARIAS PMA, COPI D, GIORGIO S, CESAR CL, “Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for *Leishmania amazonensis* parasites” *Micron*, 40: 617-620 (2009).

RAAT NJ, VERHOEVEN AJ, MIK EG, “The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model. *Crit. Care Med.* 33:39-45 (2005).

RAPOPORT TA, HEINRICH R, RAPOPORT SM, “The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes”, *Biochem J.* 154:449-69 (1976).

RAZOUK, FH, REICHE, EMV, “Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes”, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 26(2):126-134 (2004).

RESOLUÇÃO RDC nº 153. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 14 de junho de 2004 ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde (2004).

RESOLUÇÃO RDC nº 57. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 16 de dezembro de 2010 ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde (2010).

SAKATA SK, KURACHI M, SOGAWA K, “Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions” *Eur. Biophys. J. Biophys.*, 27:55-61 (1998).

SEAMAN GV, KNOX RJ, NORDT FJ, REGAN DH, “Red cell agins. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes”, *Blood*, 50: 1001-1011 (1977).

SINCHON S, JAN KM, CHIEN S, “Studies on sequestration of neuraminidase-treated red blood cells”. *Am J Physiol* 254: H1167-H1171 (1988).

SILVA DCN, FERNANDES HP, JOVINO CN, FILHO MM, FILHO MAF, OLIVEIRA ADPR, FARIAS PMA, SANTOS BS, CESAR CL, BARJAS-CASTRO ML, FONTES A, “Uso de Pinças Ópticas para Avaliação do Potencial Zeta de Hemácias em EDTA, CPD-SAGM e estocadas”, *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42:223-236 (2010).

SLEEP J, WILSON D, SIMMONS R, GRATZER W, “Elasticity of the red cells membrane and its relation to hemolytic disorders: na optical tweezers study”, *Biophys J.*, 77:3085-3095 (1999).

SMITH SA, MUTCH NJ, BASKAR D, ROHLOFF P, DOCAMPO R, MORRISSEY JH, “Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(4):903-8 (2006).

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

SUTERA SP, GARDNER RA, BOYLAN CW, CARROL GL, CHANG KC, MARVEL JS, KILO C, GONEN B, WILLIAMSON JR, “Age-related changes in deformability of human erythrocytes”, *Blood*, 65:275-282 (1985).

SZE A, ERICKSON D, REN L, LI, D, “Zeta-potential measurements using Smoluchowski equation and slope of the current-time relationship in electroosmotic flow” *J. Colloid Interface Sci.*, 261:402-410 (2003).

VALTIS DJ, “Defective gas-transport function of stored red blood cells” *Lancet* 266:119-124 (1954).

WEINER ML, “Toxicological review of inorganic phosphates”, *Food and Chemical Toxicology*, 39(8):759-786 (2001).

WIBACK SJ, PALSSON BO, “Extreme Pathway Analysis of Human Red Blood Cell Metabolism”, *Biophysical Journal*, 83: 808-818 (2002).

WOLFE LC, “The membrane and the lesions of storage in preserved red cells” *Transfusion*, 25:185-203 (1985).

ZUBAIR AC, “Clinical impact of blood storage lesions”, Am J Hematol., 85(2):117-122, (2010).