



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA**

**AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E EM ERITRÓCITOS –**  
**APLICAÇÕES EM HEMOTERAPIA**

**RECIFE**

**2013**

**CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E EM ERITRÓCITOS  
– APLICAÇÕES EM HEMOTERAPIA**

**Dissertação de Mestrado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco,  
como parte dos requisitos à obtenção  
do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas, área de concentração:  
Biotecnologia.**

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Adriana  
Fontes (UFPE)

**CO-ORIENTADOR:** Dr. Clayton Anderson  
Azevedo Filho (UFPE)

**RECIFE**

**2013**

**CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E EM ERITRÓCITOS  
– APLICAÇÕES EM HEMOTERAPIA**

**Dissertação de Mestrado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco,  
como parte dos requisitos à obtenção  
do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas, área de concentração:  
Biotecnologia.**

**Data da Aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Adriana Fontes- Orientadora e Presidente da banca.  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia/UFPE

---

Dr. Aderson da Silva Araújo-  
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-  
Fundação- Hemope

---

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia- Departamento de  
Bioquímica/UFPE

*Não sou a pessoa que precise ser lembrada de que dentro de tudo há o sangue. Não só não esqueço o sangue de dentro como eu o admiro e o quero, sou demais o sangue para esquecer o sangue...*

*(Perdoando Deus)*

*Clarice Lispector*

*A meus pais, **Clóvis e Lenilda**, por tudo que sou, que aprendi, e pelo amor incondicional e indissolúvel.*

*Mais uma vez à **Rainha**, pelo exemplo de fé e coragem, de superação e vitória.*

*À minha esposa **Keyla** que iluminou a minha vida, a quem amo profundamente e com quem quero viver para sempre.*

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso Deus, que criou tudo e todos. A Ele devo tudo o que sou e tenho. Do que tenho, agradeço principalmente as amizades verdadeiras que Ele pôs em minha vida, minha maior riqueza e felicidade. Aqui, quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente promoveram esta pesquisa comigo.

À minha orientadora, Dra. Adriana, cuja denominação “mãe científica” lhe cabe bem. Quero agradecê-la por todas as vezes que ela fez por mim muito mais do que deveria ou poderia. Por todas as vezes que, por puro carinho, pensou e agiu para promover o meu bem e o bem da nossa pesquisa. Agradeço por que posso dizer a todos que me cercam: minha orientadora é maravilhosa, que tenho sorte, que os resultados da minha pesquisa foram muito além dos científicos, que tenho uma excelente referência de cientista, pesquisadora e professora... (Vão me chamar de babão, mas até isso me alegra. Como é bom babar a quem só nos fez bem!). Sai do mestrado motivado pelo doutorado graças à boa orientação que dela recebi.

Diego, Carol, Cauêh e Aline são nomes obrigatórios neste espaço de gratidão e reconhecimento. Diego e Cuêh foram instrumentos de Deus na minha vida. Eu não estaria concluindo esse trabalho hoje se não fosse a generosidade dessas pessoas. Eles não se importaram em dividir comigo sua orientadora e amiga, e conhecimento que construíram ao longo da sua jornada científica. Ao contrário, se esforçaram para me ensinar o que podiam e para que eu conquistasse o espaço no laboratório ao qual pertenciam. Eu que entrei no mestrado sem experiência alguma em pesquisa científica só poderia ter obtido o êxito que obtive por que vocês foram generosos comigo guiando-me e corrigindo-me quando precisavam. E o que dizer de pessoas que passaram tantas noites acordadas, tantos dias atarefados realizando análises laboriosas que eram meu trabalho? Um muito obrigado a Carol e a Aline é pouco! Mas receba-o com a mesma alegria que tenho ao contar com vocês. É tão difícil encontrar pessoas que promovam a nossa vida! Vocês fazem parte dessa espécie rara e, por isso, essa gratidão profunda transformada em amor.

A Dr. Clayton que junto comigo acreditou no projeto, sempre disposto a me ensinar e contribuir com o trabalho. Segurou algumas vezes na minha mão quando eu ainda não tinha a habilidade de manusear alguns instrumentos. Gesto que considero nobre para quem quer abraçar o ofício da educação. Naquele momento isso fez toda a diferença para mim. A ele devo o êxito da formulação com a vitamina E. Agradeço a segurança e confiança que ele me fez sentir ao longo desse período.

A Dra. Beate que sempre solícita e disposta a contribuir conosco, apoiou-me e auxiliou-me durante a pesquisa, além de levantar o astral do laboratório.

Uma gratidão emocionada às Dra. Sheyla Cavalcante, Dra. Elmiza Barros e Dra. Ana Maria do Hemope, onde tudo começou. O grande projeto de Deus na minha vida começou quando fui envolvido pelo amor dessas guerreiras da hemoterapia. Pessoas admiráveis em todos os sentidos, com as quais tive o convívio valioso ao longo de um ano. Este ano que mudaria a minha vida para sempre, por que além de toda a oportunidade que me deram, disponibilizaram-me algo até então para mim desconhecido: A admiração e orgulho do chefe. Isso é o resultado que esperam de líderes e que poucos conseguem. Trabalhar com elas não era uma tarefa difícil para mim, que ainda cursava dois cursos de graduação, mas era o momento em que eu me sentia incrivelmente livre e satisfeito. O trabalho tem um significado mais digno pra mim por que aprendi com elas que líderes, chefes, são simples, humildes, são humanos. Quero agradecer a vocês por que mesmo depois que terminou o período, contei e conto com o valioso apoio na nossa pesquisa em concentrados de hemácias, sem o qual não seria possível a realização do nosso trabalho.

Gratidão mais que devida também a Dr. Rogério, Dra. Luciana e Paulo. Essas pessoas alegraram todos os meus dias no laboratório com sua presença agradável e valiosíssima. Já disse para eles em outras oportunidades do amor que sinto por cada um. Dr. Rogério com o seu carinho disfarçado de “brutalidade” se esforçou em me ensinar a fazer uma boa apresentação de trabalhos, o que rendeu alguns “traumas benignos” e maior confiança em mim mesmo. Realmente a sua técnica funciona (risos)! Dra. Luciana que me ensinou tantos outros conhecimentos, dando sempre sua contribuição nos meus trabalhos, conferindo-lhes uma melhor qualidade.

Onde há o dedo dela, há qualidade. Quando crescer desejo ser igualzinho a vocês! E Paulo que veio lá da minha infância surubinese trazer a alegria da sua amizade e apoio, esforçando-se para me ensinar o que aprendeu com sua experiência. Quero agradecer a você pelo bom convívio, e pela consideração que demonstra ter por mim. Vejam que a equipe na qual estou inserido é de peso!

Agradeço também a Amanda e Ana Carolina que realizaram comigo as análises na citometria de fluxo, e a Renata que caracterizou comigo as emulsões. O nosso trabalho não seria possível se não contássemos com a disponibilidade de vocês.

Aos colegas do laboratório de Biofísica, pela boa convivência, motivação, alegria e compreensão.

Na pessoa de Dra. Maria Helena agradeço a todos que fazem parte do laboratório de Engenharia Biomédica, pela boa convivência, amizade e alegria.

Nunca agradecerei o bastante por tudo que meus pais fizeram e fazem por mim. Cada dia os amo mais e tenho mais orgulho de vocês.

Agradeço a Keyla que na sua companhia encontrei motivos para avançar águas mais profundas. Depois de você, meu amor, toda felicidade que obtenho é acréscimo, pois a felicidade que tenho com você é algo sem medidas.

Aos meus amigos e familiares que me motivaram e me encheram de carinho e afeto.

A Fernanda Nataly e Romero. Fernanda estudou comigo pelo menos uns dezessete anos, e durante quase nossa vida inteira construímos uma amizade solidificada na confiança e amor fraterno. Somos como irmãos mesmo, e por muitas vezes pude contar com seu apoio. Romero completou o grupo trazendo muitas felicidades para ela e para nós também.

## RESUMO

Durante o armazenamento em bancos de sangue, os eritrócitos sofrem progressiva deterioração, o que pode comprometer a integridade pós-transfusional de hemácias na circulação sanguínea. Muitas destas lesões de armazenagem podem ser causadas por danos oxidativos nas membranas das hemácias. Alguns estudos relataram que a vitamina E é um dos antioxidantes mais importantes que pode atuar sobre os lipídios das membranas celulares. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se as propriedades antioxidantes da vitamina E são capazes de melhorar as condições de armazenamento de concentrados de hemácias (CHs). Devido à sua natureza hidrofóbica, foram preparadas emulsões de vitamina E com tensoativos em diferentes solventes (tampão fosfato salino 1X - PBS, 0,9% de solução salina ou Sagmanitol - SAG-M). As caracterizações das emulsões mostraram a presença de partículas na escala nanométrica e confirmaram a presença de vitamina E nas formulações preparadas. Após essa etapa, os CHs foram divididos em duas unidades. Uma delas recebeu as emulsões e a outra foi usada como controle. As formulações foram adicionadas às bolsas de sangue de forma asséptica e, em seguida, os CHs foram armazenados a 4°C. As análises de controle de qualidade realizadas no 35º dia de armazenamento mostraram que emulsões de vitamina E em PBS levavam a hemólise. Os resultados de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) não mostraram nenhuma diferença entre o sistema com salina e vitamina E quando comparado ao controle. No entanto, o sistema com a vitamina E e SAG-M apresentou diminuição relativa na produção de ROS de pelo menos 35% durante o armazenamento. A elasticidade das hemácias para o sistema com SAG-M foi então medida usando uma pinça óptica e os resultados mostraram que a capacidade de deformação dessas hemácias não diferiu significativamente do controle durante todo o armazenamento. Assim, concluímos que a solubilização da vitamina E em meio aquoso foi eficaz, formando emulsões com gotículas em escala manométrica e mantendo a integridade da vitamina. Quando a emulsão foi formulada em SAG-M houve redução significativa da produção de ROS, mas não houve alteração nas propriedades elásticas das hemácias, provavelmente por a vitamina E atuar como antioxidante principalmente sobre apenas um dos componentes da membrana eritrocitária, os lipídeos.

Palavras-Chaves: Vitamina E, Eritrócitos, Concentrados de Hemácias, Oxidação.

## ABSTRACT

During the storage in blood banks, erythrocytes suffer progressive deterioration, which can compromise the post-transfusion red blood cells (RBCs) integrity in blood circulation. Many of these storage lesions can be caused by oxidative damages on the RBCs membranes. Some studies have reported that vitamin E is one of the most important antioxidant acting on lipids of cellular membranes. Thus, the present study aimed to evaluate if the vitamin E antioxidant properties are able to improve the storage conditions of RBCs units. Due to their hydrophobic nature, we prepared vitamin E emulsions with Tweens 20 and 80 in different solvents (Phosphate Buffer Saline 1X - PBS, 0.9% saline or Sagmanitol – SAG-M). The emulsion characterizations showed the presence of particles in nanometer range and confirmed the presence of vitamin E in the formulations prepared. After, RBCs units from healthy donors were divided into two units. One of them received the emulsions and the other was used as control. Freshly prepared formulations were added to blood components aseptically and then the RBCs units were stored at 4°C. Quality control analyses performed at 35<sup>th</sup> day of storage showed that vitamin E emulsions in PBS leads to hemolysis. Results for the saline vitamin E formulation showed no difference in reactive oxygen species (ROS) production when compared to the control. However, the system with SAG-M vitamin E presented an average relative ROS production decay of at least 35% during storage. RBCs elasticity for SAG-M systems was then measured by using an optical tweezers. Results showed that the deformability for samples with SAG-M vitamin E emulsion did not differ significantly from control during the storage. Thus, we conclude that the solubilization of vitamin E was effective in aqueous medium and form emulsions with droplets in nanometer scale gauge, maintaining the integrity of the vitamin. When the emulsion was formulated in SAG-M, the ROS production was significantly reduced, but there was no change in the elastic properties of erythrocytes, probably because the vitamin E acts as antioxidant mainly on only one component of the erythrocyte membrane, lipids.

Keywords: Vitamin E, Erythrocytes, RBCs Units, Oxidation.

## LISTA DE FIGURAS

Conferir páginas das listas de figuras e tabelas e do sumário...

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

- Figura 1.** Representação esquemática da eritropoiese (adaptado de <http://www.biomedicinapadrao.com>, 2010). 3
- Figura 2.** Ilustração de uma hemoglobina carreando moléculas de oxigênio dentro da hemácia (adaptado de <http://forum.netxplica.com>, 2009). 4
- Figura 3.** Representação da Membrana Plasmática de eritrócito (MURADOR, 2007). 5
- Figura 4.** Representação das formas que o eritrócito pode assumir: (A) Discócitos, (B) Esferócitos e (C) Equinócitos, característica da precipitação de espectrina em hemácias envelhecidas (adaptado de GALVEZ et al, 2006). 8
- Figura 5.** Representação esquemática da Via glicolítica principal do metabolismo energético eritrocitário (via de *Embde-Meyerhof*) e suas vias acessórias (via do Fosfogluconato ou ciclo das pentoses e via de *Rapoport-Luebering*, produtora de 2,3-BPG) (adaptado de <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/nh/energy.cfm>). 10
- Figura 6.** Representação esquemática da seqüência dos estágios da oxigenação da hemoglobina. A) Hb desoxigenada; B) e C) fixação de O<sub>2</sub> por globinas alfa; D) e E) fixação de O<sub>2</sub> por globinas betas e deslocamento de 2,3-BPG.  
(adaptado de <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobina/fisio-oxi.htm>). 11
- Figura 7.** Representação esquemática da cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica (adaptada de Lipid Oxidation Pathways, KAMAL-ELDIN, 2003). 13

**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/>). **16**

**Figura 9.** Representação esquemática do aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois feixes de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la (FONTES, 1999). **25**

**Figura 10.** Pinça Óptica Dupla (dois pontos de captura) (a) “rouleaux” de hemácias, (b) hemácias deslizando entre si ao terem uma das extremidades presa e a outra arrastada, ambas pela pinça óptica, (c) máximo deslizamento entre as hemácias, mostrando uma forte adesão nas bordas (adaptado de FONTES, 1999). **26**

**Figura 11.** Ilustração da deformação sofrida pela hemácia presa pela pinça óptica em função de velocidades constantes (FONTES, 2005). **28**

#### **ARTIGO:**

**Figure 1.** (a) HPLC chromatogram for SAG-M with vitamin E emulsion and (b) Saline (in blue) and SAG-M (in black) vitamin E emulsions absorption spectra. **51**

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

- Tabela 1.** Tipos de Soluções preservantes: Composição e perspectivas de validade da estocagem de Concentrados de Hemácias. **18**
- Tabela 2.** Alterações observadas em diferentes parâmetros dos concentrados de hemácias com o estoque prolongado de 42 dias (adaptado de ZUBAIR, 2010). **20**
- Tabela 3.** Especificações para a garantia da qualidade de unidades de eritrócitos do ministério da saúde: RDC nº 57 de 2010. **21**

### ARTIGO:

- Table 1.** Quality control results at 35<sup>th</sup> day of storage for formulations in saline and SAG-M. **52**
- Table 2 –** Sizes in function of time for saline and SAG-M vitamin E emulsions. **53**
- Table 3.** ROS evaluation in function of the storage for saline and SAG-M vitamin E emulsions. **54**
- Table 4.** RBCs average elasticities for control (only with SAG-M) and test (with SAG-M vitamin E emulsion) in function of storage. **55**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,3 BPG	2,3 bisfosfoglicerato
ACD	Solução aditiva contendo: adenina, citrato e dextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina 5'trifosfato
ATPase	Adenina trifosfatase
CH	Concentrado de Hemácias
CPD	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato e dextrose
CPDA	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato, dextrose e adenina
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DLS	
EPO	Eritropoietina
GM-CSF	Fator estimulador de Colônias Granulocíticas e monocíticas
Hb	Hemoglobina
ME	Microemulsão
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
PFK	Fosfofrutoquinase
PVC	Polivinil cloreto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAGM	Solução aditiva contendo: salina, adenina, glicose e manitol
SPT	Sobrevida pós-transfusional
ST	Sangue total

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ERITRÓCITOS HUMANOS	3
2.2 MEMBRANA E CITOESQUELETO DOS ERITRÓCITOS	4
2.3 A DEFORMABILIDADE DOS ERITRÓCITOS	6
2.4 A MORFOLOGIA DOS ERITRÓCITOS	6
2.5 O METABOLISMO ENERGÉTICO E OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS	8
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS	11
2.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NATURAL DO SANGUE	13
2.8 O CONCENTRADO DE HEMÁCIAS	15
2.9 SOLUÇÕES PRESERVANTES	17
2.10 METABOLISMO ERITROCITÁRIO E LESÕES DE ESTOQUE NO ARMAZENAMENTO	18
2.11 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ERITRÓCITOS EM BANCOS DE SANGUE	21

2.12 VITAMINA E	22
2.13 MICROEMULSÕES	23
2.14 PINÇAS ÓPTICAS COMO FERRAMENTA DE MEDIDA DE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE CÉLULAS	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>41</b>
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
5.1 CONCLUSÃO	58
5.2 PERSPECTIVAS	58
<b>6. ANEXO - NORMAS DO JBPA</b>	<b>60</b>

## **1. INTRODUÇÃO:**

As hemácias são células essenciais para a manutenção do organismo humano por promoverem as trocas gasosas. O transporte bem sucedido de O<sub>2</sub> por essas células depende, por exemplo, do seu conteúdo energético e da sua elasticidade celular (SHONAT & JOHNSON, 1997). Como essas células são ricas em oxigênio, tornam-se alvos da ação de espécies reativas que se originam a partir do oxigênio molecular. Quando estão na circulação sanguínea normal, as hemácias dispõem de um sistema antioxidante natural que minimiza ou elimina os radicais livres (TEDESCO et al., 2000). Entretanto, para a obtenção de concentrados de hemácias (CHs) utilizados para fins transfusionais é necessário se remover aproximadamente 80% do plasma de uma unidade de sangue total e, com isso, perde-se grande parte do suprimento energético e da capacidade antioxidante nativa associada a esse fluido biológico.

As soluções aditivas atuais de CHs, tais como CPDA<sub>1</sub> (Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina) e CPD/SAG-M (Citrato-Fosfato-Dextrose e Salina-Adenina-Glicose-Manitol) suprem apenas as necessidades energéticas garantindo a produção de ATP. Com sua capacidade antioxidante diminuída, os eritrócitos de CHs ficam em condições muito diferentes da circulação sanguínea e, ao longo do período de armazenamento (35 ou 42 dias dependendo da solução preservante), essas células ficam então susceptíveis aos danos oxidativos que podem levar às chamadas “lesões de estoque”. As lesões de estoque se referem a um conjunto de alterações que ocorrem nas hemácias durante sua preservação, que podem gerar danos irreversíveis e reduzir a sobrevida pós-transfusional (CHIN-YEE, ARYA E D’ALMEIDA, 1997).

Dentre as lesões de estoque podemos destacar a perda da elasticidade eritrocitária e a diminuição da carga elétrica da membrana celular, avaliada pela mensuração do potencial zeta (FONTES et al., 2008; WOLFE et al., 1985). A deformabilidade é uma propriedade mecânica fundamental para as hemácias, pois permite que elas atravessem capilares e sinusóides esplênicos com diâmetros menores que seu tamanho. Recentemente foi demonstrado que o armazenamento

de CHs leva não somente à diminuição da elasticidade, como também à diminuição do potencial zeta, devido à perda de ácido siálico (SILVA et al., 2010). Essas e outras lesões de estoque estão diretamente relacionadas à gradual oxidação e à perda dos componentes celulares, como a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas (SILVA et al., 2012). Poucos trabalhos têm estudado os danos eritrocitários relacionados ao armazenamento de CHs para fins transfusionais. Um melhor conhecimento nesta área poderá ajudar no desenvolvimento de novas soluções conservantes de CHs, o que poderá proporcionar uma melhor maneira de manter a viabilidade celular, isto é, a integridade física e funcional na circulação sanguínea do receptor e um melhor rendimento transfusional.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a vitamina E (tocoferol) vem ganhando destaque. Ao longo dos anos, estudos demonstraram que a ação antioxidante da vitamina E está principalmente relacionada com sua atividade biológica sobre a oxidação dos lipídeos, atuando no bloqueio da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas (KAY et al., 1986). A vitamina E intercepta o radical hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) resultando na formação do radical tocoferila que pode ser inclusive regenerado pela vitamina C (RUCKER et al., 2001; RENDÓN-RAMÍREZ et al., 2007). Alguns estudos demonstraram que a suplementação com vitamina E pode melhorar os sintomas clínicos de indivíduos portadores de anemias hereditárias, que apresentam aumento do estresse oxidativo, como a anemia falciforme (CHAN et al., 1999). Outros estudos mostraram que a concentração de vitamina E presente na membrana protege a célula contra hemólise (MAY, 1998).

Considerando-se que muitas das lesões de estoque estão relacionadas com a peroxidação dos lipídios de membrana das hemácias dos CHs, esta dissertação teve então o objetivo de avaliar a ação da vitamina E como possível antioxidante de CHs.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

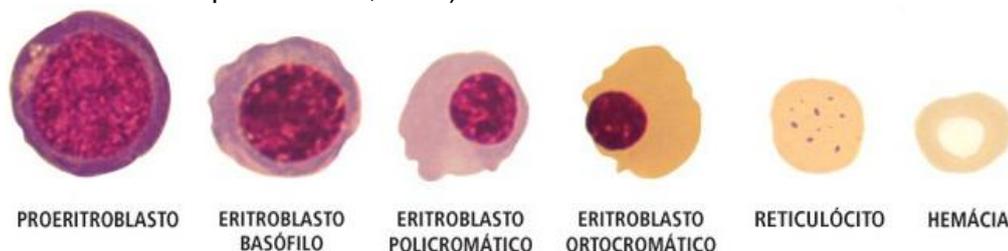
### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ERITRÓCITOS HUMANOS

O sangue pode ser considerado um tecido líquido vermelho complexo com células em suspensão. A parte líquida do sangue é o plasma, constituído de água, proteínas, lipídios, glicídios e sais minerais. Dentre as células em suspensão destacam-se as da linhagem eritrocítica, conhecidas como eritrócitos, hemácias ou células vermelhas (STEPHEN et al., 1989; FRIED, 2009).

Os eritrócitos humanos são produzidos na medula óssea por fatores estimuladores e reguladores da eritropoiese [eritropoietina (EPO), interleucina 3 (IL-3), fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas (GM-CSF), testosterona, hormônios tireoidianos e hipofisários], além de fatores nutricionais como: vitaminas B12 (cobalamina), ácido fólico (folato), ferro e a vitamina B6 (piridoxina) (STEPHEN et al., 1989; KOURY& PONKA, 2004; FRIED, 2009).

O principal fator estimulador e regulador é a eritropoietina, que é produzida pelos rins (aproximadamente 90%) e pelo fígado (aproximadamente 10%). A vitamina B12 e o ácido fólico são utilizados na síntese da timidina, constituinte do DNA. O ferro é necessário à síntese da hemoglobina, enquanto que a vitamina B6 é utilizada na síntese do grupo heme hemoglobínico (STEPHEN et al., 1989; OGAWA, 1993; KOURY& PONKA, 2004; FRIED, 2009).

**Figura 1.** Representação esquemática da eritropoiese (adaptado de <http://www.biomedicinapadiao.com>, 2010).



Sob a ação desses fatores, células tronco pluripotentes sofrem divisões e diferenciações sequenciadas (assim como mostra a Figura 1) resultando em células

anucleadas, com forma de disco bicôncavo, de diâmetro entre 7 e 9  $\mu\text{m}$ , altura entre 1,5 e 2,5  $\mu\text{m}$ , volume com  $\pm 90 \text{ fL}$  ( $1 \text{ fL} = 10^{-15} \text{ L}$ ), os eritrócitos (SCHWABBAUER, 1998; DACIE & LEWIS, 1995).

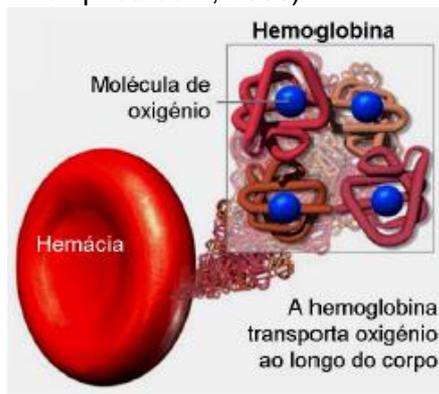
Estas células são as mais abundantes e especializadas do organismo humano. Estima-se que num adulto normal sejam produzidas diariamente aproximadamente 2,5 bilhões delas. Elas são compostas de água (721 mg/mL do eritrócito), proteínas (321 mg/mL do eritrócito), lipídios (5,1 mg/mL do eritrócito) e carboidratos (80 mg/mL do eritrócito) (YOSHIHI, 2003).

Elas não são capazes de se dividir, sintetizar proteínas e promover reações oxidativas mitocondriais pelo fato de serem desprovidas de núcleo, ribossomos e mitocôndrias. Dessa forma, essas células que na normalidade tem uma sobrevivência média de 120 dias, necessitam ser renovadas constantemente no organismo (DACIE & LEWIS, 1995; ÇIMEN, 2008).

A principal função do eritrócito é transportar e manter a integridade de um pigmento respiratório de cor vermelha, chamado hemoglobina (Hb), que é responsável por carrear oxigênio ( $\text{O}_2$ ) dos pulmões para os tecidos, e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) dos tecidos para os pulmões (Figura 2). A eficácia desse transporte depende não só da hemoglobina, mas também da deformabilidade da membrana e citoesqueleto celular e do seu conteúdo energético (SHONAT & JOHNSON, 1997).

A hemoglobina corresponde a cerca de 95% do conteúdo citoplasmático do eritrócito. Essa proteína mantém o ferro no seu estado reduzido  $\text{Fe}^{2+}$ , o que permite a ligação reversível do  $\text{O}_2$  ao grupo heme, além de facilitar a troca do  $\text{CO}_2$  produzido pelos tecidos com os pulmões (ÇIMEN, 2008).

**Figura 2.** Ilustração de uma hemoglobina carregando moléculas de oxigênio dentro da hemácia (adaptado de <http://forum.netxplica.com>, 2009).

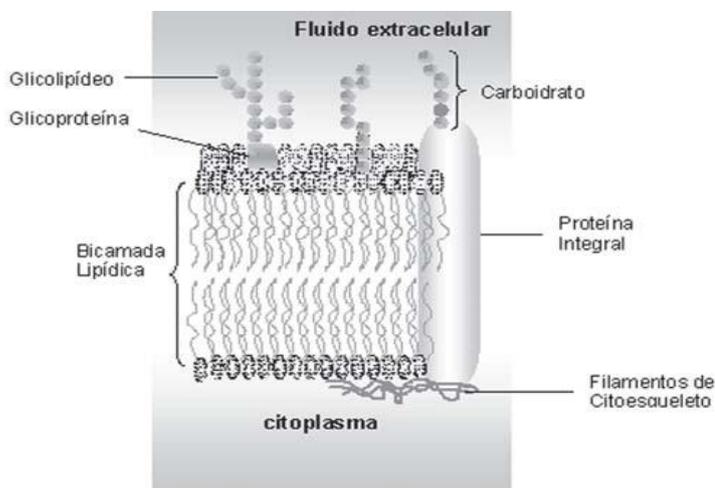


## 2.2 MEMBRANA E CITOESQUELETO DOS ERITRÓCITOS

A membrana dos eritrócitos é composta por 19,5% (peso/peso) de água, 39,6% de proteínas, 35,1% de lipídios e 5,8% de carboidratos (YOSHIHI, 2003). A bicamada lipídica dos eritrócitos é composta por aproximadamente 60% de fosfolipídios, 30% de colesterol e 10% de glicolipídios (YOSHIHI, 2003). No que diz respeito aos fosfolipídios, sabe-se que os eritrócitos possuem na porção externa da membrana principalmente a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, enquanto que na porção interna predominam a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina (YOSHIHI, 2003).

Essa bicamada é toda atravessada por proteínas integrais inseridas na membrana através dos domínios hidrofóbicos de suas sequências de aminoácidos (Figura 3). Exemplos típicos desse grupo são as proteínas banda 3 e as glicoforinas. As proteínas da membrana dos eritrócitos podem ser encontradas também na periferia da membrana ajudando a formar o citoesqueleto, entre as quais estão as espectrinas (cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ ), as proteínas banda 4.1 e a actina. Estas proteínas se associam especificamente entre si para formar um citoesqueleto localizado diretamente abaixo da bicamada lipídica. As proteínas ancoradas são formadas por proteínas que se conectam com as proteínas integrais e com as proteínas do citoesqueleto. Os exemplos mais representativos deste grupo são a anquirina e a banda 4.2 (YOSHIHI, 2003; ÇIMEN, 2008). Como veremos mais adiante, tanto o citoesqueleto eritrocitário como a sua membrana são essenciais na manutenção

tanto da deformabilidade, quanto da forma normal do eritrócito, sendo vital para a permanência dessas células na circulação.



**Figura 3.** Representação da Membrana Plasmática de eritrócito (MURADOR, 2007).

### 2.3 A DEFORMABILIDADE DOS ERITRÓCITOS

Ao longo do sistema circulatório, os eritrócitos necessitam atravessar vasos e capilares estreitos, muitas vezes menores que sua própria circunferência, mantendo sua integridade estrutural (podendo se alongar até 230% da sua dimensão original). Isso pode ser exemplificado na passagem dessas células pelos capilares e orifícios sinusoidais do baço (3 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), órgão responsável pelo sequestro de células velhas, danificadas e menos deformáveis (SHOHET & MOHANDAS, 1988). Desta forma, a organização estrutural e as propriedades elásticas da membrana celular e do citoesqueleto dos eritrócitos devem conferir-lhes grande capacidade de deformabilidade para garantir que essas células alcancem os tecidos e órgãos, onde exercem sua função, prevenindo a retirada prematura da circulação e, conseqüentemente, a diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos.

Diversos fatores influenciam a elasticidade celular, entre eles a razão área superficial/volume celular. Quanto maior for esta razão, maior será a capacidade da célula se alongar e se deformar. Assim, hemácias maiores devem se deformar mais para transpor vasos pequenos. A membrana também influencia a deformabilidade dos eritrócitos, pois a distribuição regular dos lipídeos e a integridade de proteínas

periféricas e de componentes do citoesqueleto garantem uma maior fluidez. Por exemplo, a densidade de proteínas estruturais, como a espectrina, é diretamente proporcional à rigidez da membrana. Mudanças na organização do citoesqueleto podem levar a alterações na forma dos eritrócitos, interferindo na deformabilidade. Sabe-se também que um conteúdo aumentado de colesterol ou diminuído de fosfatidilcolina torna a membrana mais rígida (NASH, 1993).

## **2.4 A MORFOLOGIA DOS ERITRÓCITOS**

Como visto, o eritrócito saudável possui uma sobrevida em torno de 120 dias. E durante esse ciclo de vida, essas células passam por uma série de modificações morfológicas decorrentes do envelhecimento. As formas mais comuns assumidas pelos eritrócitos são: discócito, equinócito ou estomatócito e esferócito. O controle da forma eritrocitária é dependente de energia das proteínas da membrana, da bicamada lipídica e de suas interações (ELGSAETER & MIKKELSEN, 1991).

A forma de discócito é a ideal porque apresenta a melhor proporção superfície/volume. Isto possibilita um melhor rendimento nas trocas gasosas porque garante uma excelente deformabilidade, essencial para a passagem por pequenos capilares (Figura 4A).

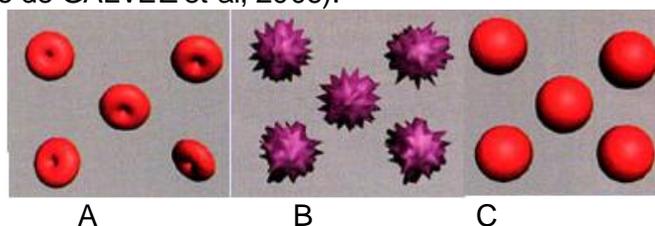
O equinócito ou estomatócito se forma a partir da diminuição de ATP no meio, num processo conhecido como depleção metabólica, ou a partir do excesso de  $Ca^{2+}$  no meio, ou ainda por agentes químicos (FÉO & MOHANDAS, 1977). Este tipo de morfologia também pode ser resultado da expansão da porção externa ou da porção interna da bicamada. Esta forma pode se reverter à forma de discócito, desde que não haja perda de fragmentos da membrana (Figura 4 B) (CHAILLEY et al., 1973) através da adição de concentrações adequadas de ATP ou da fosforilação dos fosfolípidos (FERRELL & HUESTIS, 1982).

Quando há perda de fragmentos de membrana pela continuidade das lesões causadas pela depleção metabólica, excesso de  $Ca^{2+}$  ou agentes químicos aumenta-se a viscosidade e rigidez do eritrócito. Assim, dá-se origem à outra forma

eritrocitária, o esferócito (Figura 4C). Este é irreversível e susceptível à degradação por hemólise.

A depleção metabólica resulta em algumas consequências importantes como a polimerização do complexo espectrina na face interna da membrana celular (SHEETZ & SINGER, 1977); assim também como a falta de manutenção da fosforilação pelas quinases, devida à contínua ação de fosfatases (GRATZER, 1984). A bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , uma ATPase, perde a eficiência na depleção metabólica. Assim, a membrana celular não consegue realizar trocas de íons entre o eritrócito e o meio extracelular, comprometendo também a expulsão de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , que é realizada em conjunto com sua propriedade osmótica (KLEIN et al. 2007).

**Figura 4.** Representação das formas que o eritrócito pode assumir: (A) Discócitos, (B) Equinócitos, característica da precipitação de espectrina em hemácias envelhecidas e (C) Esferócitos (adaptado de GALVEZ et al, 2006).



## 2.5 O METABOLISMO ENERGÉTICO E OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS

Como visto, as células vermelhas maduras precisam de energia para desempenhar bem sua função de transporte de gases e manter sua integridade física. Além disso, a energia também é necessária na defesa contra a oxidação de suas biomoléculas. Isso porque, devido à pressão osmótica dos eritrócitos ser maior que a do plasma, a integridade da membrana é mantida por uma intensa troca de íons sódio e potássio, num transporte ativo (dependente de ATP) realizado pela bomba de sódio-potássio (NAKAO, 1960). A glicose atravessa com facilidade a membrana plasmática e, portanto, é a principal fonte energética dos eritrócitos.

O metabolismo energético dos eritrócitos depende da glicólise conhecida no caso dessas células como via de **Embden-Meyerhof**, do tipo não-oxidativa e que interliga três vias menores: a via **Fosfogluconato** (ou via das **pentoses**) do tipo oxidativa; via de **Metahemoglobina Redutase**; e a via de **Rapoport-Luebering** (RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976; MULQUINEY, 1999; WIBACK,

2002). Sabe-se que em condições normais, 90% da glicose que entra na célula são metabolizados pela glicólise e o restante pela via das pentoses. Entretanto, em situações de estresse oxidativo, a situação metabólica é invertida (LEE et al., 1999).

O catabolismo da glicose depende do funcionamento de um sistema enzimático para produção de três produtos importantes para o eritrócito: duas moléculas de ATP, duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e 2,3 bisfosfoglicerato (2,3-BPG), através do desvio de **Rapoport-Luebering** (HAMASAKI & YAMAMOTO, 2000). O ATP é utilizado na ativação da bomba de cátions que mantém a forma e a capacidade de deformação da membrana por fosforilação da espectrina, além de modular a quantidade de 2,3-BPG gerada (STIENE-MARTIN et al.,1998). O NADH atua como co-fator enzimático em algumas etapas da glicólise. Atua também na reação de conversão da meta-hemoglobina a hemoglobina, que é útil na prevenção da oxidação do ferro dos grupamentos heme, num processo mediado pela enzima meta-hemoglobina redutase (MeSH) (KLINKEN, 2002 ; RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976).

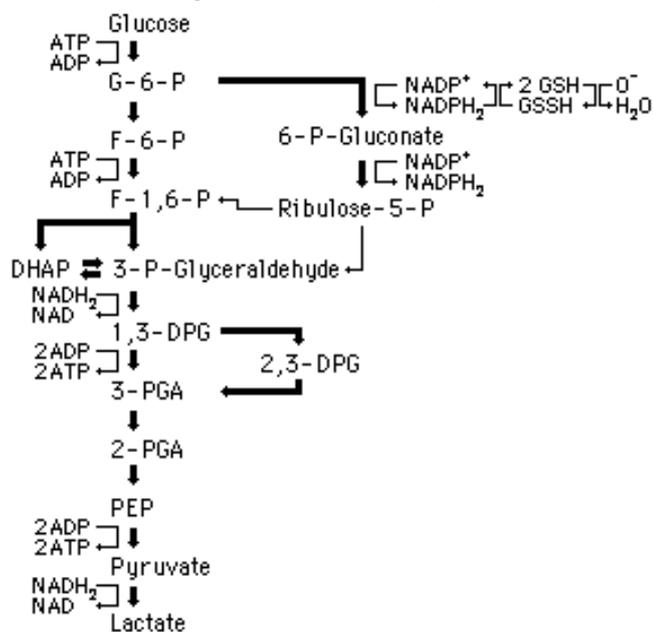
O sistema enzimático que regula a glicólise parece ser constituído por três enzimas principais: a hexoquinase (HX), a fosfofrutoquinase (PFK) e a piruvato quinase (PK). A regulação da HX é realizada por seu produto, a glicose-6-fosfato (G6-P), que inibe a ação da enzima, e pelo substrato, o ATP-Mg, que estimula a reação (KLINKEN, 2002). Esta etapa da via é irreversível, pois mantém a glicose aprisionada no interior da célula já que ao adicionar um grupo fosfato à glicose, transforma-a numa molécula carregada negativamente, impedindo-a de atravessar passivamente a membrana celular (SHONAT & JOHNSON, 1997). A PFK é afetada pelo pH, cujo pH ótimo é 8,0. A atividade desta enzima tende a aumentar com a elevação do pH e a diminuir com a queda deste. A regulação da PK é realizada também por seu produto, o ATP (GRIMES, 1980).

Durante a via de **Embden-Meyerhof** são consumidos dois mols de ATP para cada mol de glicose a ser catabolizado e quatro mols de ATP são gerados. Assim, há o rendimento de dois mols de ATP por mol de glicose. Além da reserva energética, metabólitos essenciais à hemácia são gerados por vias acessórias à via principal (RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976).

Pela via do **Fosfogluconato**, ou via das pentoses fosfato, 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-adeninad nucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) e glutathiona reduzida (GSH). O NADPH é gerado como processo final da transformação do glutathiona peroxidase (GPx) em GSH, agentes protetores de processos oxidativos (Figura 5) (RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976). Dessa forma, a importância de NADPH no meio está na manutenção dos níveis de GSH no eritrócito, que é uma das principais fontes de defesa contra o ataque oxidativo (STIENE-MARTIN et al.,1998).

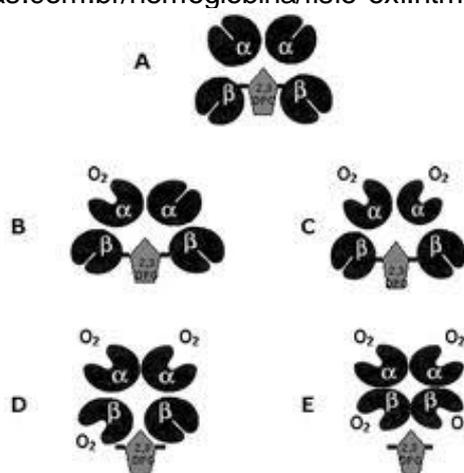
A via de **Rapoport-Luebering** é uma via alternativa entre o 1,3-DPG e o 3-PG, que apesar de diminuir o rendimento de produção de ATP, gera 2,3-BPG, um metabólito essencial ao mecanismo de liberação de oxigênio fixado a hemoglobina. Pela ação de uma fosfatase, o 2,3-BPG é modificado a 3-Fosfoglicerato que pode, portanto, dar continuidade às etapas subsequentes da via principal (Figura 5). Estima-se que em condições de estresse oxidativo até cerca de 90% da glicose consumida, no metabolismo eritrocitário, pode ser destinada à produção de 2,3-BPG (RAPOPORT, HEINRICH & RAPOPORT, 1976; LEE, 1999).

**Figura 5.** Representação esquemática da Via glicolítica principal do metabolismo energético eritrocitário (via de *Embde-Meyerhof*) e suas vias acessórias (via do Fosfogluconato ou ciclo das pentoses e via de *Rapoport-Luebering*, produtora de 2,3-BPG (adaptado de <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/nh/energy.cfm>).



O 2,3-BPG se liga reversivelmente à hemoglobina entre as duas globinas betas. A remoção do 2,3-BPG permite a fixação e transporte do oxigênio pela hemoglobina. Quando o oxigênio é liberado no tecido a ser oxigenado o 2,3-BPG torna a se ligar à hemoglobina, num equilíbrio controlado pela pressão de oxigênio na corrente sanguínea (assim como mostra a Figura 6) (MULQUINEY, 1999; WIBACK, 2002).

**Figura 6.** Representação esquemática da seqüência dos estágios da oxigenação da hemoglobina. (A) Hb desoxigenada; (B) e (C) fixação de O<sub>2</sub> por globinas alfa; (D) e (E) fixação de O<sub>2</sub> por globinas betas e deslocamento de 2,3-BPG (adaptado de <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobina/fisio-oxi.htm>).



## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Entre as principais espécies reativas de oxigênio (ROS) estão: o peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), os radicais peroxila (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e além do óxido nítrico (NO) (ÇIMEN et al., 2008).

Os eritrócitos humanos, como são células aeróbicas transportadoras de oxigênio, são alvo da formação de ROS ou radicais livres. Essas espécies são continuamente formadas em pequenas quantidades pelo processo metabólico normal. Entretanto, quando em grandes quantidades, elas podem interagir com diversas biomoléculas, lesando diferentes estruturas celulares (NEPOMUCENO et al., 1997; CURTIS et al., 1984), inclusive as membranas. Os danos às membranas estão relacionados com a peroxidação lipídica e oxidação e inativação de proteínas

[enzimas ou mesmo proteínas da membrana celular ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) e/ou as pontes dissulfeto (-SS-)] (TEDESCO et al., 2000; MONTINE et al., 2004). Além de causar danos às próprias células vermelhas grandes quantidades de ROS provenientes dos eritrócitos podem causar danos a outros componentes do sangue (ÇIMEN et al., 2008). Nos eritrócitos a principal fonte de radicais livres é a própria proteína carreadora de oxigênio, a hemoglobina. Ao se auto-oxidar, esta proteína pode produzir ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e essa reação é acompanhada da oxidação da Hb para metaHb (na qual o estado de oxidação do ferro é o  $Fe^{3+}$ ), uma proteína que não liga ou transporta  $O_2$  (ÇIMEN et al., 2008).

Uma via de formação de ROS com grande importância biológica para os eritrócitos é a que consiste na redução do oxigênio à água. Nesta via há a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promovendo o aparecimento do  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\cdot}$ , intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular, conforme o esquema mostrado na equação abaixo:



A dismutação do  $O_2$  gera quantidades excessivas de  $H_2O_2$  (HEBBEL et al., 1982). O principal problema é que enquanto o radical  $O_2^{\cdot-}$  precisa passar pelos canais iônicos, o  $H_2O_2$  pode atravessar a membrana com a mesma facilidade da água e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro da Hb, origina o radical hidroxila, como descrito pela reação de Fenton:

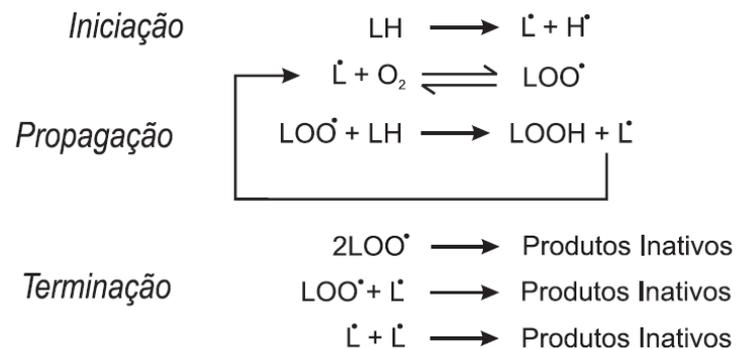


Resultante da reação de Fenton, o  $OH^{\cdot}$ , é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos, pois necessita apenas de mais um elétron para se estabilizar. Para que este tipo de ROS possa se estabilizar, necessita doar ou receber elétrons de uma outra molécula, assim acontecendo esta última molécula resultará também em um radical. (NEPOMUCENO et al., 1997; TEDESCO et al., 2000; LIMA & ABDALLA, 2001).

A teoria de oxidação de ácidos graxos polinsaturados aceita pela literatura sugere que esse processo ocorre como uma cadeia de reações, que possuem pelo menos três fases: (i) iniciação, (ii) propagação, e (iii) terminação (conforme mostra a

Figura 7). Nesse processo, os lipídios são atacados com energia suficiente para formar radicais orgânicos que reagem com o O<sub>2</sub> e resultam no radical peroxil. A consequência disto são danos aos fosfolipídios de membranas celulares (AFAF KAMAL-ELDIN, 2003).

**Figura 7.** Representação esquemática da cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica (adaptada de Lipid Oxidation Pathways, KAMAL-ELDIN, 2003).



A maioria das metodologias utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica mede a formação de produtos gerados durante as diferentes fases desse processo oxidativo. Um dos métodos mais eficientes para se avaliar a oxidação lipídica é a verificação da formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela da marcação com o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). A citometria de fluxo identifica a conversão do DCFH-DA em 2',7'- diclorofluoresceína (DCF). Essa conversão ocorre em vários passos. Primeiro o DCFH-DA é transportado através da membrana da célula, é desacetilado por esterases e forma um composto não fluorescente, o DCFH. Esse composto, já no interior das células, é então convertido em DCF pela presença de peróxido de hidrogênio (RIPLER et al., 2002)

## 2.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NATURAL DO SANGUE

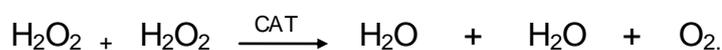
Quando o nível de oxidação ultrapassa o limite aceitável, os organismos vivos lançam mão de moléculas antioxidantes que limitam o estresse oxidativo promovido pelas ROS. Com o auxílio de antioxidantes é possível minimizar os danos causados a macromoléculas, combatendo os radicais livres presentes no microambiente antes

mesmo que estes possam causar uma lesão, ou bloqueando a formação dos mesmos. É este mecanismo de defesa antioxidante que permite ao eritrócito resistir aos ataques oxidativos, impedindo a peroxidação lipídica acelerada e outros danos celulares, tais como a inativação proteica (TEDESCO et al., 2000)

No sangue há dois sistemas antioxidantes classificados em enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ :



Já a catalase (CAT) atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ :



Ainda há a Glutathiona Peroxidase (GPx) que junto com a glutathiona (GSH) atuam sobre os peróxidos em geral (ÇIMEN et al., 2008)



sendo a GSSG a glutathiona oxidada (MENDANHA-NETO, 2010).

O sistema antioxidante não enzimático consiste dentre outros, na GSH que é o principal antioxidante intracelular, na vitamina E, a qual atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica principalmente dos ácidos graxos polinsaturados das membranas e na vitamina C, a qual atua diretamente como antioxidante sobre ROS no ambiente aquoso, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E (VASCONCELOS et al., 2007).

Há também outros antioxidantes do sistema não enzimático que se pode citar: o ácido úrico, o ácido tânico, o  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de íons de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e a ceruloplasmina (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema antioxidante enzimático e a glutathiona agem predominantemente no meio intracelular, enquanto que o sistema não enzimático predomina no meio extracelular, o plasma, evidenciando o importante papel desse meio na prevenção do estresse oxidativo dos eritrócitos.

## 2.8 O CONCENTRADO DE HEMÁCIAS

O concentrado de hemácias (CHs) é um hemocomponente amplamente utilizado nas práticas clínicas. É uma suspensão de eritrócitos obtida a partir de uma unidade de sangue total (ST) da qual grande parte do plasma, aproximadamente 80%, é retirado. Como a maior parte desse plasma é retirado, perde-se não somente grande parte do fornecimento energético como também das substâncias atuantes no mecanismo anti-oxidativo presentes nele. Atualmente, os CHs dispõem apenas do suprimento energético para as células, que se dá por uma solução aditiva preservadora (GRIMES, 1980).

Há pelo menos duas formas de obtenção de CHs, a forma convencional e a forma denominada *buffy-coat*, ambas baseadas na 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 (conforme mostra a Figura 8 A). Na técnica convencional, a técnica mais utilizada nos bancos de sangue, o plasma rico em plaquetas é extraído e novamente centrifugado numa rotação mais pesada para a obtenção do Concentrado de Plaquetas e Plasma Pobre em Plaquetas, ou Plasma Fresco (Figura 8 B). Na outra técnica, uma camada leuco-plaquetária (*buffy-coat*) se forma sobre as hemácias e o plasma sobrenadante pobre em plaquetas é extraído para uma bolsa satélite (Figura 8) (CAIRUTAS, 1985). Oito unidades de bolsas com a camada leuco-plaquetária são unidas para obtenção de concentrado de plaquetas. Obtido os CHs, este é armazenado em câmara fria a mais ou menos 4°C por um tempo variável, de acordo com a solução empregada (SHI & NESS, 1999).

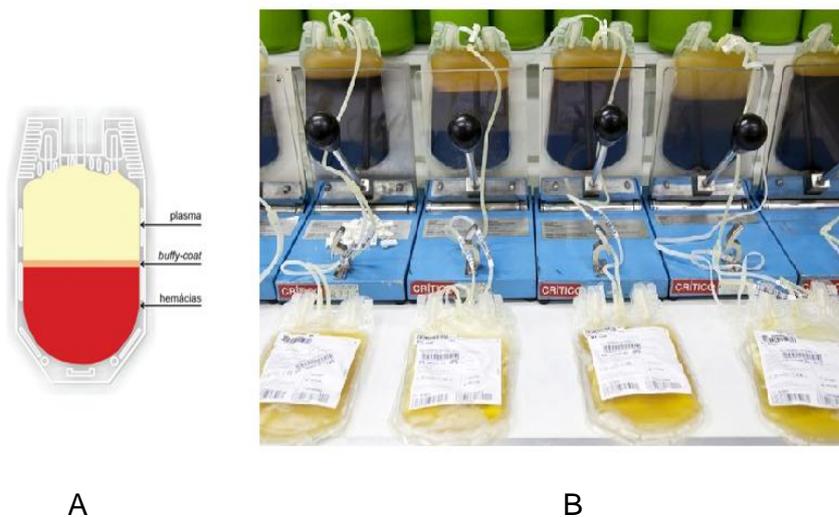
A decisão de transfundir eritrócitos deve ser baseada em uma avaliação dos riscos da anemia contra os riscos da transfusão (POLK et al., 1995). A transfusão de CHs é indicada no tratamento de casos de hipovolemia e anemia. Como na maioria dos casos de anemia, os tratamentos medicamentosos controlam a situação, apenas nos casos com valores de hemoglobina muito baixos o CH deverá ser indicado (LEE et al., 1999)

O desenvolvimento dos hemocomponentes tem limitado o uso de sangue total a poucas condições clínicas. O uso de sangue total fresco não é mais aceito, devendo ser evitado na hemoterapia atual. Ele apenas deverá ser usado nos casos em que tenha ocorrido perda superior a 30% da volemia. Todavia, essas hemorragias também poderão ser repostas com a transfusão de glóbulos vermelhos e soluções eletrolíticas e/ou coloidais (MURPHY, et al., 2001; RAZOUK, et al., 2004).

Entre as vantagens dos CHs 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). Os CHs para transfusão deveriam, preferencialmente, estar livres de plaquetas ou leucócitos funcionais. As reações clínicas adversas do uso do CH são: reações febris, urticária e outras reações cutâneas, aloimunização, reações hemolíticas, injúria pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI), contaminação por agentes biológicos, entre outras (KLEIN et al., 2007).

As bolsas utilizadas na coleta e obtenção dos hemocomponentes são confeccionadas em policloreto de vinila (PVC) e plastificantes 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/>).



## 2.9 SOLUÇÕES PRESERVANTES

Muitos foram os avanços nos estudos de preservação de eritrócitos para fins transfusionais visando estabelecer uma melhor maneira de garantir um bom rendimento com menores efeitos colaterais, isto é, garantir a integridade física e funcional na circulação sanguínea do receptor. Um dos primeiros passos na preservação do sangue foi o armazenamento em condição hipotérmica, em temperatura abaixo da fisiológica e mais alta que a do ponto de congelamento (GAMBERO et al. 2004). Nestas condições, são inibidos processos metabólicos dependentes de temperatura, que esgotariam metabólitos celulares críticos e acumulariam danos às células (HÖGMAN et al., 1991).

Com a descoberta do citrato de sódio como um anticoagulante em 1914 por Hustin, e glicose como um conservante em 1916 por Rous e Turner, as primeiras soluções conservantes utilizadas continham elevada concentração desses elementos (MOLLISON et al., 2000; LOUTIT & MOLLISON 1943). A primeira solução preservante padrão continha ácido cítrico, citrato de sódio e glicose e era conhecida por ACD (GAMBERO et al., 2004).

Com a adição do íon fosfato, substrato para síntese de ATP e 2,3-BPG, gerou-se um efeito tamponante, retardando a acidificação do meio. O fosfato também é constituinte dos fosfolipídios da membrana celular. Hemácias estocadas em CPD (solução citrato-fosfato-dextrose) são viáveis por até 28 dias. Com a adição do ACD ou CPD, o tempo de preservação não melhorou, mas assegurou uma sobrevida pós-transfusional melhor aceitável para os eritrócitos até 21 dias de preservação (MOORE et al., 1987). Entretanto, soluções como ACD e CPD não eram empregadas rotineiramente, sendo preteridas pelo sangue total para preservar a viscosidade e outras propriedades do sangue total, adequadas para transfusão (GRIMES, 1980). Entretanto, uma década mais tarde, com a separação do sangue total em hemocomponentes, passou-se a armazenar os eritrócitos em concentrados de hemácias, com hematócrito entre 50 e 80% (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

Posteriormente, adicionou-se a adenina à composição da solução, que se mostrou benéfico à manutenção dos níveis de ATP. As soluções do tipo CPDA<sub>1</sub> (solução citrato-fosfato-dextrose-adenina) aumentaram 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). A solução aditiva mais utilizada, o SAG-M, (HESS & GREENWALT, 2002), contém solução de cloreto de sódio, adenina, glicose, manitol. A adenina aumenta a concentração de adenilatos e muda as condições de equilíbrio em direção à produção de ATP, sendo que a energia para a primeira metade da via glicolítica e a integridade da membrana são mantidas. A glicose é fonte de nutriente, enquanto que o manitol e o citrato são estabilizadores da membrana (HÖGMAN, 1987). O fosfato inorgânico atua corrigindo o pH, continuamente decrescente, e como substrato para a síntese de 2,3-BPG. Essa solução trouxe a vantagem de manter o CH por até 42 dias.

A Tabela 1 relaciona as principais soluções utilizadas na preservação de hemocomponentes, com suas composições e respectivos prazos de validade para CHs.

**Tabela 1.** Tipos de Soluções preservantes: Composição e perspectivas de validade da estocagem de CHs.

Soluções	Componentes	Validade (dias)
ACD	ácido cítrico, citrato, dextrose	21
CPD	citrato, fosfato, dextrose	28
CPDA <sub>1</sub>	citrato, fosfato, dextrose, adenina	35
SAG-Manitol	cloreto de sódio, adenina, glicose, manitol	42

## 2.10 METABOLISMO ERITROCITÁRIO E LESÕES DE ESTOQUE NO ARMAZENAMENTO

Ao longo do armazenamento, a cerca de 4°C, os eritrócitos sofrem algumas alterações, que podem eventualmente gerar danos irreversíveis e reduzir a

sobrevida pós-transfusional (SPT). Essas células quando estocadas se encontram em condições bastante diferentes da circulação sanguínea normal. O metabolismo dessas células, nessas condições, está relacionado à temperatura e às soluções anticoagulantes e aditivas (HÖGMAN & MERYMAN, 2006, LIUMBRUNO; JAMES; AUBUCHON, 2010; KIM-SHAPIRO; LEE; GLADWIN, 2011; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

Ao longo desse período, o eritrócito estimula a glicólise para a produção de ATP. Com o consumo e conseqüente decréscimo na quantidade de glicose na solução preservante, ocorre uma crise de ATP, num processo conhecido como depleção metabólica (Tabela 2). Isso resulta no acúmulo de lactato produzido pela via glicolítica e conseqüentemente na redução gradativa do pH do meio (Tabela 2) e dessa forma, muitas enzimas reduzem suas atuações nos processos metabólicos (HESS & GREENWALT, 2002; LIUMBRUNO; JAMES; AUBUCHON, 2010; KIM-SHAPIRO; LEE; GLADWIN, 2011; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

Como vimos anteriormente, a manutenção da forma discóide e da integridade da membrana também dependente de energia. Dessa forma, com a redução do ATP nas soluções preservantes, ao final do período de estocagem, os eritrócitos tendem a se apresentar na forma de esferócito e rompem a membrana, liberando seu conteúdo e elevando a concentração de hemoglobina extracelular (LEONART, 1994).

A redução nos níveis de ATP compromete a deformabilidade celular (LACROIX; TUCCI, 2011; EDGREEN et al., 2010; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI; VAGLIO, 2012). A deficiência das ATPases e a queda exponencial de ATP promovem falência da bomba de sódio e potássio, provocando perda da resistência osmótica e à inversão na concentração de potássio intracelular e sódio extracelular, resultando na elevação do grau de hemólise. Ainda, por carência de ATP, a falência da bomba  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase resulta no acúmulo de íons cálcio, tendo como conseqüência a desestabilização da estrutura fosfolipídica da membrana celular (WOLFE, 1985).

Ocorre também, durante o período de armazenamento de CHs, uma rápida redução nas concentrações de 2,3-BPG por supressão da via de **Rapoport-**

**Luebering**, para um aumento do rendimento da via principal de produção de ATP, na tentativa de manter as funções biológicas dependentes de energia (Tabela 2) (LIUMBRUNO; JAMES; AUBUCHON, 2010; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

A própria diminuição dos níveis de 2,3-BPG contribui para a deficiência de ATP, já que em pH ácido este fixa-se preferencialmente à hemoglobina não ligada ao 2,3-BPG e diminuindo a quantidade de ATP disponível para as bombas de membrana e manutenção da via energética principal (VALTIS, 1954; DERN, 1967; RAAT, 2005). Essa redução dos níveis de 2,3-BPG aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, de tal forma que dificulta sua liberação e oxigenação dos tecidos após a transfusão (CAIRUTAS, 1985, LIUMBRUNO; JAMES; AUBUCHON, 2010; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

**Tabela 2.** Alterações observadas em diferentes parâmetros dos CHs 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-BPG (mmol/g Hb)	9	0.3
K <sup>+</sup> (mEq/L)	2.4	63
Hb livre (mg/dL)	9	372
Hemólise (%)	0	0.61

Além da depleção metabólica, essas alterações podem ser promovidas pelos processos oxidativos. Um dos motivos prováveis para o desenvolvimento e acumulações de lesões oxidativas em CHs é a redução da atividade do sistema de defesa antioxidante, já que grande parte desse sistema é perdida com a extração do

plasma, deixando os eritrócitos mais vulneráveis aos ataques. Alguns autores afirmam que o estresse oxidativo é acompanhado de desestabilização da membrana celular resultando numa redução da sua capacidade de deformabilidade, aumento da fragilidade osmótica e predisposição para mudanças de forma e fragmentação (JOHNSON et al., 1994, EDGREEN et al., 2010; LACROIX; TUCCI, 2011; RINALDUCCI et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

Das lesões de estoque, algumas chamam a atenção: a diminuição dessa deformabilidade celular de membrana, o aumento do volume celular, a perda da morfologia bicôncava, a hemólise e a diminuição do potencial zeta (SILVA et al., 2010). A redução da capacidade das hemácias se deformarem e tendências à maior agregabilidade celular são consequências da perda dessas propriedades eritrocitárias (SILVA et al., 2010, LACROIX; TUCCI, 2011; EDGREEN et al., 2010; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

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; LEE; GLADWIN, 2010; RINALDUCCI et al., 2011; KIM-SHAPIRO; LEE; GLADWIN, 2011; GRAZZINI; VAGLIO, 2012).

## **2.11 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ERITRÓCITOS EM BANCOS DE SANGUE**

Para que a transfusão sanguínea seja realizada com segurança e eficácia, os CHs devem estar enquadrados nos critérios avaliativos de controle de qualidade (LACROIX; TUCCI, 2011). Este controle, no Brasil, deve-se seguir as especificações contidas na resolução de diretoria colegiada (RDC) Nº 57 de 2010. Os fatores a serem avaliados e seus respectivos parâmetros aceitáveis, de acordo com a RDC, estão representados na Tabela 3 e inclui volume, hematócrito, teor de hemoglobina, grau de hemólise e teste microbiológico (RESOLUÇÃO RDC nº 57, 2010) .

**Tabela 3.** Especificações para a garantia da qualidade de unidades de eritrócitos do ministério da saúde: RDC nº 57 de 2010.

<b>Controle de Qualidade de Concentrados de hemácias</b>	
<b>Valores Padrão</b>	
Volume	270±50 ml
Hemoglobina	> 45 g/unidade
Hematócrito	50 a 80%
Grau de hemólise	< 0,8 da massa eritrocitária (no último dia de armazenamento)
Esterilidade	Estério (microbiológico negativo)

## **2.12 VITAMINA E**

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans & Bishop quando estudaram a infertilidade em ratas com uma dieta deficiente dessa vitamina (TRABER, 1994). Vitamina E é um nome genérico de oito compostos lipossolúveis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferóis e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocotrienóis). Cada um desses compostos pode apresentar a mesma ou diferentes atividades biológicas, entretanto, com especificidade. A atividade biológica dessa vitamina, relacionada à ação antioxidante, tem chamado atenção em diversos estudos envolvendo o retardamento do envelhecimento ou a proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, como; Parkinson, Alzheimer, câncer e doenças cardiovasculares (BRIGELIUS et al., 2002). Essa vitamina tem sido empregada pela indústria farmacêutica em várias aplicações como um antioxidante natural, pois além dessa função, é também um componente essencial ao organismo humano (BUCKLEY et al., 1995 ).

Estudos tem demonstrado que o  $\alpha$ -tocoferol natural é a forma da vitamina E com maior potência antioxidante. Ele é constituído por um único esteroisômero, sendo denominado D- $\alpha$ -tocoferol ou RRR- $\alpha$ -tocoferol. Já a forma sintética, designada por DL- $\alpha$ -tocoferol ou all-rac- $\alpha$ -tocoferol, trata-se de uma mistura equimolar de 8 esteroisômeros, sendo apenas um idêntico ao natural. O que difere

na isomeria desses 8 compostos é a cadeia lateral que possui centros quirais que podem apresentar configuração R, para direita, ou S, para esquerda (HOPE et al., 2000; BURTON et al., 1998). Os esteroisômeros encontrados na forma sintética são: RRR-, RRS-, RSS-, SRR-, SRS-, SSR-, SSS- (BIANCHINI & PENTEADO, 2003).

No sangue, os níveis plasmáticos de vitamina E dependem da ingestão de alimentos ricos dessa vitamina, ou de alimentos fortificados e até de suplementos de vitamina E e C (KANG et al., 2004). No estresse oxidativo, as membranas celulares são as estruturas mais afetadas pela peroxidação lipídica que provoca alterações estruturais e perdas da seletividade na troca iônica, com liberação de compostos citoplasmáticos e formação de produtos tóxicos. A vitamina E, por ser lipossolúvel e também compor as membranas celulares, é capaz de impedir ou minimizar a lipoperoxidação, devido à sua capacidade antioxidante. A sua presença na membrana é de extrema importância pois exerce um efeito protetor contra a peroxidação lipídica. Essa capacidade antioxidante depende da sua concentração no tecido.

Considerado um potente antioxidante, podendo reagir cerca de 200 vezes mais rápido contra radicais peroxila, quando comparado a antioxidantes sintéticos, a vitamina E protege as células do processo de oxidação contra agentes óxido-redutores.

Alguns estudos concluíram que a suplementação da vitamina E associada à vitamina C protegeu a membrana dos eritrócitos contra a deterioração oxidativa em paciente diabéticos (SHINDE et al., 2011). Além disso, a suplementação de vitamina E pode melhorar os sintomas clínicos de indivíduos portadores de anemias hereditárias, que apresentam aumento do estresse oxidativo, como a anemia falciforme e  $\beta$ -Talassemia (CHAN et al., 1999, PFEIFER et al., 2008). Outros estudos mostraram que a concentração de vitamina E presente na membrana protege a célula contra hemólise (MAY, 1998). O  $\alpha$ -tocoferol quando associado à vitamina C pode diminuir a oxidação de membrana relacionada ao armazenamento (CHUNG & BENZIE, 2000). Ainda na área da Hemoterapia, estudos sugerem que a administração de antioxidantes como as vitamina E e C a doadores de sangue pode

melhorar parâmetros eritrocitários importantes relacionados aos danos promovidos pelos radicais livres durante o armazenamento (RACKEL et al., 1997).

A vitamina E atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados das membranas e lipoproteínas, interceptando o radical peroxila, resultando com formação do radical tocoferila (BUETTNER, 1993).

## **2.13 MICROEMULSÕES**

Para sua aplicação em CHs, a vitamina E, por ser lipossolúvel, precisa ser solubilizada em meio aquoso. Essa solubilização pode ser realizada pelo desenvolvimento de microemulsões (MEs). As MEs são sistemas importantes para veicular substâncias lipofílicas no organismo (HO et al., 1996; Lawrence, 1996). Elas atuam na solubilização, dissolução e biodisponibilidade das moléculas de interesse, permitem a liberação mais prolongada e aplicação do transporte dessas moléculas por muitas vias, inclusive parenteral (BAKER et al., 1984; CONSTANTINIDES et al., 1995; FORMARIZ et al., 2006; KAWAKAMI et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2002; SILVA et al., 2010; TENJARLA et al., 1999).

Descoberta por Hoar e Shulman, microemulsão é um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (ABOOFAZELI et al., 1993; CONSTANTINIDES et al., 1994; CONSTANTINIDES et al., 1995; HO et al., 1996). Assim, a formulação de MEs envolve a combinação de pelo menos três componentes: óleo, água e tensoativo (ABOOFAZELI et al., 1993; CONSTANTINIDES et al., 1994; HO et al., 1996; ROSANO, 1974).

A formação de sistemas microemulsionados se baseia em três teorias: (1) teoria da solubilização, (2) teoria da tensão interfacial e (3) teoria termodinâmica. Então a estrutura formada é determinada pelas propriedades físico-químicas dos componentes utilizados e da razão entre os componentes.

A tensão interfacial de uma ME deve ser baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão, o que leva a formação espontânea de MEs e,

consequentemente, a um pequeno tamanho das gotículas (BAGWE et al., 2001; TENJARLA et al., 1999). Também devido ao pequeno tamanho das gotículas, as MEs são termodinamicamente estáveis (LANGEVIN et al., 1988). O tamanho da gotícula de ME é muito reduzido, podendo variar entre 10-300 nm, aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10  $\mu\text{m}$  (KAWAKAMI et al., 2002; LANGEVIN, 1988). Esse pequeno tamanho é responsável pela aparência relativamente translúcidas das MEs, ou seja, elas são opticamente límpidas, o que se justifica pelo fato de o diâmetro médio das gotículas ser menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda da luz incidente. Dessa forma, as MEs não espalham luz e o sistema fica transparente (LANGEVIN et al., 1988; ROSANO et al., 1974).

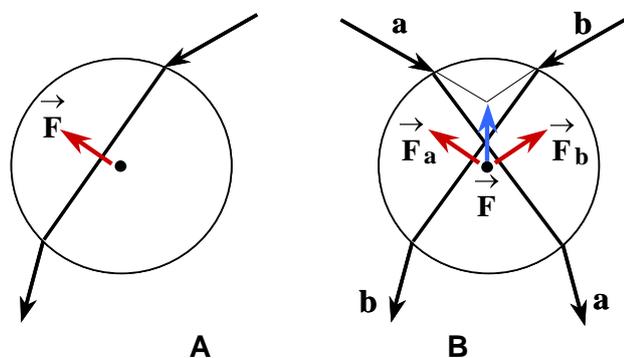
A caracterização das MEs pode ser realizada por diversas técnicas. Dentre a técnica mais difundida destaca-se o espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering) que é uma técnica para a medição do tamanho das partículas, com tamanho menor que 1  $\mu\text{m}$ . Após essas gotículas serem iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento deste, que, pode ser detectado em um ângulo determinado, o qual varia em uma taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é baseada pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006). Assim, obtêm-se informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas, permitindo o cálculo do tamanho destas gotículas através de relações empíricas adequadas.

Para aplicações intravenosas são necessárias microemulsões do tipo óleo em água, pois as gotículas podem ser facilmente diluídas e difundidas pelos fluidos fisiológicos, tais como o sangue. Além disso, esses sistemas devem ser estéreis, apirogênicos, isotônicos e atóxicos que correspondem a cuidados imprescindíveis quando se deseja a aplicação de qualquer sistema terapêutico através dessa via de administração.

## **2.14 PINÇAS ÓPTICAS COMO FERRAMENTA DE MEDIDA DE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE CÉLULAS**

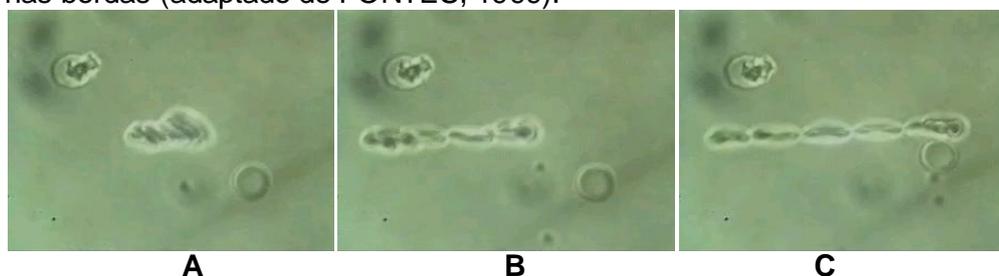
A pinça óptica é uma ferramenta de manipulação de células que consiste em um feixe de laser no infravermelho próximo fortemente focalizado através de uma objetiva de um microscópio (ASHKIN et al., 1986). Essa ferramenta como o próprio nome sugere, consegue capturar uma célula sem causar danos. A captura acontece devido à transferência de momento do fóton para a partícula capturada, que carrega momento  $p = hv/c$  (no vácuo). Pode-se dizer que o fóton é como uma partícula que ao ter sua trajetória desviada obriga o objeto que a desviou a sofrer um recuo na direção de  $\mathbf{F}$  (Figura 9A). Os raios a e b da (Figura 9 B) se encontrariam no foco  $f$  se não houvesse a esfera. O desvio desses raios produz os recuos na direção  $\mathbf{F}_a$  e  $\mathbf{F}_b$ , e a combinação dos dois leva ao recuo na direção  $\mathbf{F}$  em 9B. O que se observa é que o recuo  $\mathbf{F}$  tende a obrigar o centro da esfera a coincidir com o foco do laser  $f$ , o que faz com que o centro da partícula se mantenha não só no foco do laser, como também acompanhando o laser. Dessa forma, tendo o centro da partícula relacionado ao foco do laser, quando se movimentar o laser, a partícula acompanha o seu movimento tridimensionalmente. Um aspecto importante para o desenvolvimento da técnica é que o índice de refração da partícula deve ser maior que o índice de refração do meio externo, pois do contrário a direção da força resultante  $\mathbf{F}$  tenderia a afastar o centro da partícula do foco do laser, expulsando-a ao invés de aprisioná-la. O objeto também não pode ser refletor e não pode absorver a luz do laser, pois essas situações tendem a expulsar e não capturar a partícula (FONTES, 1999; BRANDÃO, 2003; FONTES, 2005).

**Figura 9.** Representação esquemática do aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois feixes de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la (FONTES, 1999).



A pinça óptica é capaz de manipular partículas com dimensões aproximadamente entre 50 nm a 50  $\mu\text{m}$ , conferindo-lhe importância nos estudos com células e biomoléculas. A Figura 10 exemplifica manipulações de hemácias utilizando as pinças ópticas (FONTES, 2005). A pinça óptica tem sido utilizada em pesquisas de biofotônica, bioengenharia e nanociência (DHOLAKIA et al., 2002; SONI et al., 2002; BUSTAMANTE et al., 2003). Essa técnica já foi inclusive aplicada em pesquisas de manipulação de material genético em diferentes tipos celulares (PERKINS, 2009), mensuração do comprimento de moléculas de DNA (SAKATA et al., 1998), detecção de concentrações femtomolares ( $10^{-15}$  M) e atomolares ( $10^{-18}$  M) de antígenos (LALIBERTE et al., 2009), manipulação de microtúbulos para montagem dirigida de biomoléculas (DINU et al., 2009), medição de mecanismos de adesão leucocitária (WANG et al., 2004), análise da motilidade de espermatozoides (NASCIMENTO et al., 2008) e tripanossomatídeos (POZZO et al., 2009) e medidas de propriedades mecânicas e elétricas eritrocitárias (BRANDÃO et al., 2009; FONTES et al., 2008).

**Figura 10.** Pinça Óptica Dupla (dois pontos de captura) (A) “rouleaux” de hemácias, (B) hemácias deslizando entre si ao terem uma das extremidades presa e a outra arrastada, ambas pela pinça óptica, (C) máximo deslizamento entre as hemácias, mostrando uma forte adesão nas bordas (adaptado de FONTES, 1999).



As medidas de propriedades mecânicas e elétricas eritrocitárias utilizando pinças ópticas têm sido alvo de estudos realizados pelo grupo (SILVA et al., 2012; FONTES et al., 2008). As metodologias de avaliação com essa ferramenta já foram bem estabelecidas. Em alguns dos estudos realizados pelo nosso grupo, por exemplo, observou-se que hemácias de pacientes com anemia falciforme tendem a ser mais rígidas que hemácias de indivíduos normais. Além disso observou-se que há uma melhora da deformabilidade nas hemácias desses pacientes a medida que são medicados com a hidroxiuréia (BRANDÃO et al., 2003). Em outro estudo, também realizado pelo grupo, observou-se que hemácias irradiadas por raios gama

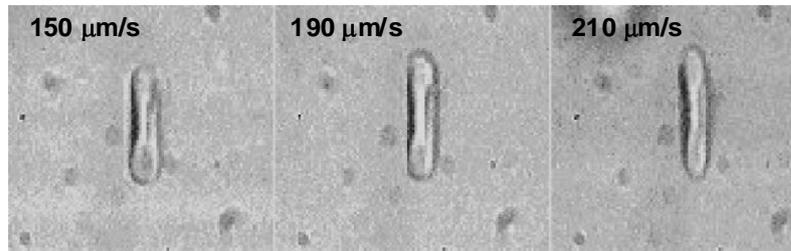
são cerca de 200% e 600% mais rígidas após a estocagem por 21 dias e 28 dias, sugerindo que os CH, após a irradiação, só sejam estocadas por até 14 dias. (BARJAS-CASTRO et al., 2002).

Recentemente foi demonstrado que o armazenamento de CH leva não somente à diminuição da deformabilidade, como também à diminuição do potencial zeta, devido à perda de ácido siálico (SILVA et al., 2010). O potencial zeta é uma característica que merece destaque, pois mantém as hemácias afastadas não só uma das outras impedindo assim agregação celular, como também evita a adesão dessas células às superfícies endoteliais. Esse potencial repulsivo é causado por cargas elétricas negativas presentes na membrana das hemácias devido ao ácido siálico das glicoproteínas.

A utilização da pinça óptica no estudo da deformabilidade eritrocitária apresenta algumas vantagens, por exemplo: analisa a elasticidade da hemácia como um todo, considerando a contribuição de todos os constituintes celulares (membrana e citoesqueleto); possibilita uma análise individual não fornecendo somente valores médios da elasticidade, isso permite, por exemplo, que a assinatura de uma doença seja observada; e por exercer forças bem pequenas (da ordem de Piconewtons) não danifica as células e permite uma maior sensibilidade na detecção de pequenas alterações sofridas pelas células (ASHKIN & DZIEDZIC, 1987; ASHKIN, 1989; BRANDÃO et al., 2003).

Na técnica utilizando a pinça óptica, o concentrado de hemácias é diluído em plasma sanguíneo em uma câmara de Neubauer. As hemácias são então capturadas pelo laser e arrastadas contra o líquido com velocidades progressivas constantes, assim como pode se observar na Figura 11. Quando as hemácias são arrastadas no plasma, elas se deformam e duas forças atuam sobre as células: força hidrodinâmica e força elástica. No equilíbrio, essas forças devem ser iguais e dessa análise obtém-se então o valor da elasticidade (BRANDÃO et al., 2003). É importante esclarecer que elasticidade é uma grandeza inversamente proporcional, onde quanto maior é seu valor, mais rígida é a célula, assim como é para a constante elástica das molas.

**Figura 11.** Ilustração da deformação sofrida pela hemácia presa pela pinça óptica em função de velocidades constantes (FONTES, 2005)



Dessa forma, sendo a deformabilidade uma propriedade importante para o desempenho eficaz da função dos eritrócitos, já que a sua perda ou diminuição pode diminuir o rendimento transfusional, a avaliação desta elasticidade e da carga da membrana eritrocitária se torna uma forma importante de se monitorar as lesões de estoque.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABOOFAZELI, R.; LAWRENCE, M. J. Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions .1. Pseudo-Ternary Phase-Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Alcohol-Isopropyl Myristate. *Int J Pharm.* v.31; 93, n.1-3, p.161-75, 1993.

AFAF, KAMAL-ELDIN, editor. Lipid Oxidation Pathways. AOCS Press Illinois, 2003.

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

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

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

BAGWE, R. P.; KANICKY, J. R.; PALLA, B. J.; PATANJALI, P. K.; SHAH, D. O. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* v.18, n.1, p.77-140, 2001.

BAKER, R. C.; FLORENCE, A. T.; TADROS, T. F.; WOOD, R. M. Investigations into the Formation and Characterization of Microemulsions .1. Phase-Diagrams of the Ternary-System Water Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol and the Quaternary System Water Xylene Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol. *J Colloid Interface Sci.* v.100, n.2, p.311-31, 1984.

BARJAS-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; FONTES, A.; COSTA, F. F.; CESAR, C. L. & SAAD, S. T. O. Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers. *Transfusion*, 42 (9), p.1196 – 1199, 2002.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C.; Vitamina E. In: Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. *Barueri: Manole.* p.23-164, 2003.

BRANDÃO, M. M. ; FONTES, A. ; BARJAS CASTRO, M. L. ; BARBOSA, L. C. ; COSTA, F. F. ; CESAR, C. L. ; SAAD, S. T. O. Optical tweezers for measuring

red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, v. 70, n.4, p. 207-211, 2003.

BRANDÃO, M. M.; Barjas-Castro, M. L.; FONTES, A.; CESAR, C. L.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O. Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. v.43, p.217 - 221, 2009.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY, F. J.; SALONEN, J. T.; NEUZIL, J.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*. 76(4)703-16, 2002.

BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *J Anim Sci*. v.73 10: 3122-30, 1995.

BUETTNER, G. R. *Arch. Biochem. Biophys*. 300, 535, 1993.

BURTON, G. W.; TRABER, M. G.; ACUFF, R. V.; WALTERS, D. N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L. L. Human plasma and tissue  $\alpha$ -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*. v.64, n.4, p. 669-84, 1998.

BUSTAMANTE, C.; BRYANT, Z.; SMITH, S. B. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature* 421, 423, 2003.

CAIRUTAS, C. M. Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico *Ed. Universitária UFPE*. v. único, 1985.

CHAILLEY, B. Formes échinocytaires et stomatocytaires du globule rouge. *Nouvelle revue française d'hématologie*, Paris, v.13, p.71 – 88, 1973.

CHAN, A.; CHOW, C.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, New York, v. 222, p. 274-282, 1999.

CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, MARK S. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfusion Science*, v.18, n.3, p.447–458, 1997.

ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. V.390, p.1-11, 2008.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCALART, J. P.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L. Formulation and Intestinal-Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides. *Pharm Res*. v.11, n.10, p.1385-90, 1994.

CONSTANTINIDES, P. P.; YIV, S. H. Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions. *Int J Pharm*. v.7;115, n.2, p.225-34, 1995.

CURTIS, M. T.; GILFOR, D.; FARBER, J. L. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.235, n.2, p.644-649, 1984.

D'ALESSANDRO, A.; D'AMICI, G. M.; VAGLIO, S.; ZOLLA, L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica*. 97:2001–9, 2012.

DERN, R. J.; BREWER, G. J.; WIORKOWSKI, J. J. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other *in vitro* measures to red cell storageability. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. New York, v. 69, n. 6, p. 968 – 978, 1967.

DHOLAKIA, K.; SPALDING, G.; MAC DONALD, M.: Optical Tweezers: the next generation. *Physics World*. V.15, p.31, 2002.

DINU, C.; Z.; CHAKRABARTY, T.; LUNSFORD, E.; MAUER, C.; PLEWA, J.; DORDICK, J. S. & CHRISEY, D. B. Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly. *Soft Matter*. v. 5, p. 3818–3822, 2009.

EDGREN, G.; KAMPER-JORGENSEN, M.; ELORANTA, S.; ROSTGAARD, K.; CUSTER, B.; ULLUM, H.; MURPHY, EL.; BUSCH, MP.; REILLY, M.; MELBYE, M.; HJALGRIM, H.; NYRÉN, O.. Duration of red blood cell storage and survival of transfused patients. *Transfusion*. 50:1183–93, 2010.

ELGSAETER, A.; MIKKELSEN, A. Shapes and shape changes *in vitro* in normal red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Biomembranes*, Stockholm. v. 1071, n. 3, p. 273 – 290, 1991.

FEO, C.; MOHANDAS, N. Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function. *Nature, London*, v. 265, p.166 – 168, 1977.

FERRELL, J. E.; HUESTIS, W. H. Calcium does not mediate the shape change that follows ATP depletion in human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*, Amsterdam, v. 687, p. 321 – 328, 1982.

FONTES, A. Manipulação e Microanálise com pinças ópticas. Tese (Doutorado em Física) defendida pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil. 2004.

FONTES, A. Uso de Lasers para Manipulação e Medidas de Células Vivas. Dissertação (Mestrado em Física) defendida pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil. 1999.

FONTES, A.; FERNANDES, H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA, L. C.; BARJAS-CASTRO, M.L.; CESAR, C.L. Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers. *Journal of Biomedical Optics*. v.13, p.014001-1 - 014001-6, 2008.

FONTES, A.; FERNANDES, H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA, L. C.; BARJAS-CASTRO, M. L.; CESAR, C. L.. Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers. *Journal of Biomedical Optics*. , v.13, p.014001-1 - 014001-6, 2008.

FONTES, A.; THOMAZ, A. A.; POZZO, L.; BARJAS-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; SAAD, S. T. O.; BARBOSA, L. C.; CESAR C. L. Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers In: *Optics & Photonics, 2005, San Diego. Proceedings of SPIE. Optical Trapping and Optical Micromanipulation II*. v.5930. p.439 – 444, 2005.

FORMARIZ, T. R.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf.* v.1;51, n.1, p.54-61, 2006.

GAMBERO, S. Anti-A and anti-B hemolysin frequencies in blood donors from the Hemotherapy Center of Unesp, Botucatu. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto. v. 26, n. 1, p.28 – 34, 2004.

GIBSON, J. P.; REES, S. B.; MC MANUS, T. J.; SCHEITLIN, W. A. A citrate phosphate dextrose solution for the preservation of human blood. *Amer J. Clin. Path.* 28:569-72,1957.

GRATZER, W. More read than dead. *Nature*, London, v. 310, p. 368 – 369, 1984.

GRAZZINI, G.; VAGLIO, S. Red blood cell storage lesion and adverse clinical outcomes: *post hoc ergo propter hoc?* *Blood Transfusion.* v.10, p. 2: s4-6, 2012.

GREENWALT, T. J.; SOSTOK, C. Z.; DUMASWALA, U. J. Studies in red blood cell preservation. Comparison of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. *Vox Sanguinis*, Basel, v. 58, p. 90 – 93, 1990.

GRIMES, A. T. Human red cell metabolism. *Oxford: Blackwell*, p.384, 1980.

HAMASAKI, N.; YAMAMOTO, M. Red blood cell function and blood storage. *Vox Sanguinis*, Basel, v. 79, n. 9, p. 191 – 197, 2000.

HEBBEL, R. P.; EATON, J. W.; BALASINGAM, M.; STEINBERG, M. H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, v.70, p.1253-1259, 1982.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red cells: new approaches. *Transfusion Medicine Reviews*, Hamilton, v. 16, n. 4, p. 283 -295, 2002.

HO, H. O.; HSIAO, C. C.; SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J Pharm Sci.* v.85, n.2, p.138-43, 1996.

HÖGMAN, C. F. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4° *in vitro*. *Vox Sanguinis*. Basel, v. 53, p. 84 - 88, 1987.

HOGMAN, C. F.; ERIKSSON, L.; ERICSON, A.; REPPUCI, A. J.; Storage of saline - adenine - glucose - mannitol - suspended red cells in a new plastic container. *Transfusion*. v.31, p.26-29, 1991.

HÖGMAN, C. F.; LÖF, H.; MERYMAN, H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. *Transfusion*, Philadelphia, v. 46, n. 9, p. 1543 - 1552, 2006.

HOPE, P. P.; KRENNRICH, G. Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic  $\alpha$ -tocopherol in the human: a dispute. *Eur J Nutr*. v.39, n.5,p.183-93, 2000.

KANG, M. J.; LIN, Y. C.; YEH, W,H, WEN-HARN, P. Vitamin E status and its dietary determinants in Taiwanese: results of the Nutrition and Health Survey in Taiwan 1993-1996. *Eur J Nutr*. v.43, n.2, p.86-92, 2004.

KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; MOROTO, Y.; KANAOKA, E.; TAKAHASHI, K.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design. *J Controlled Release*. v.17;81, n.1-2,p.65-74, 2002.

KAY, M. M. B.; BOSMAN, G. J. C. G. M.; SHAPIRO, S. S.; BENDICH, A.; BASSEL, P. S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v.83, p.2463-2467, 1986.

KIM-SAMPAIO, D. B.; LEE, J. GLADWIN, M. T. Storage Lesion. Role of Red Cell Breakdown. *Transfusion*. v.51 (4), p. 844-851, 2011.

KLEIN, H.; SPAHN, D.; CARSON, J. Red blood cell transfusion in clinical practice. *The Lancet, Oxford*, v. 370, n. 9585, p. 415 – 426, 2007.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. London, v. 34, n. 12, p. 1513-1518, 2002.

LACROIX, J.; TUCCI, M. Impact clinique de la durée de conservation des globules rouges avant transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique*.18:97–105, 2011.

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

LANGEVIN, D. Microemulsions. *Acc Chem Res*. v.21,n.7, p.255-60, 1988.

LEE, J.; GLADWIN, M. T. Bad blood: the risks of red cell storage. *Nature Medicine*; 16: 381-2, 2010.

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

LEONART, M. S. S. Estudos sobre a preservação de eritrócitos. 1994. 131 p. *Tese (Doutorado em Análises Clínicas)* – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Lipid P-eroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.37, p.114-119, 2000.

LIUMBRUNO, G. M.; JAMES, P.; AUBUCHON, J. P. Old blood, new blood or better stored blood? *Blood Transfus*. 8:217–9, 2010.

MAY, J. M.; Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Frontiers in Bioscience*. Philadelphia, v. 2, p. 1-10, 1998.

MOLLISON P. L. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative. *British Journal of Haematology*. v. 108, n.1 , p. 13 -18, 2000.

MOORE, G. L. Post-thaw storage at 40°C of previously frozen red cells with retention of 2,3 DPG. *Vox Sanguinis*, Basel. v. 53, p.15 - 18, 1987.

MULQUINEY, P. J.; KUCHEL, P. W. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations equations and parameter refinement. *Biochem. J*. v.342, p.581-596, 1999.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev. bras. hematol. hemoter.* v.29, n.2,168-178, 2008.

MURPHY, S. P. Dietary References Intakes of the U.S. and Canada: update on implications for nutrients databases. *J Food Compos Anal.* v.5, p.411-7, 2002.

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.* p. 36-43, 1960.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L.; MEYERS, S.; GAGNEUX, P.; LOSKUTOFF, N. M. BOTVINICK, E. L.; BERNIS, . The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *J. R. Soc. Interface.* V.5, n.20, p.297-302, 2008.

NASH, G. B.; GRATZER, W. B. Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane. *Biorheology.* v.30, p.397-407,1993.

NEPOMUCENO, M. F.; ALONSO, A.; PEREIRA-DA-SILVA L.; E M. TABAK, E. M. Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. *Free radical biology& Medicine.* v.23, p.1046-1054, 1997.

PERKINS, T. T. Optical traps for single molecule biophysics: a primer. *Laser & Photon. Rev.* v. 3, p.203–220, 2009.

PIERRE, B. DEHP in blood bags medical plastic: their limitation, *Canad. Res.* V.14(4), p.13-25,1981.

POLK, H. C. & GARRISON, J. R. Blood Management Practice Guidelines: Conference Highlights. *The American Journal of Surgery*, Birmingham. v.170, n. 6, p. S1 – S2, 1995.

POZZO, L.; FONTES, A.; THOMAZ, A. A.; SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; COPI, D.; GIORGIO, S.; CESAR, C. L. Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for *Leishmania amazonensis* parasites. *Micron*, v.40, p. 617-620, 2009.

RAPOPORT, T. A.; HEINRICH, R.; RAPOPORT, S. M.; 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, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.26(2), p.126-134, 2004.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.26, n.2, p.126-134, 2004.

RENDÓN-RAMÍREZ, A.; CERBÓN-SOLÓRZANO, J.; MALDONADO-VEGA, M.; QUINTANAR-ESCORZA, M. A. e CALDERÓN-SALINAS, J. V. Vitamin-E reduces the oxidative damage on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in Vitro.* v. 21, p. 1121-1126. 2007.

RENDÓN-RAMÍREZ, A.; CERBÓN-SOLÓRZANO, J.; MALDONADO-VEGA, M.; QUINTANAR-ESCORZA, M. A. e CALDERÓN-SALINAS, J. V. Vitamin-E reduces the oxidative damage on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in Vitro.* v. 21, p. 1121-1126, 2007.

RESOLUÇÃO RDC nº 57. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 16 de dezembro de 2010 ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>.

RINALDUCCI, S.; D'AMICI, G. M.; BLASI, B.; VAGLIO, S.; GRAZZINI, G.; ZOLLA, L. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion.* 51:1439–49, 2011.

ROSANO, H. L. Microemulsions. *J Soc Cosmet Chem.* v.25, n.11, p.609-19, 1974.

ROSSETI, F. C. Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele. [Dissetação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2006.

RUCKER, R. B.; SUTTIE, J. W.; MCCOEMICK, D. B.; MACHLIN, L. J. Handbook of vitamins. New York: Marcel Dekker, ed.3, 2001.

SAKATA, S. K.; 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.* v.27, p.55-61, 1998.

SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *The Journal of Cell Biology*, USA. v.73, n.3, p.638-46, 1977.

SHINDE, S. A.; SUERYAKAR, A. N.; SONTAKKE, A. N.; MORE, U. K. Effect of antioxidant vitamin supplementation on erythrocyte membrane composition in Type I diabetes mellitus in context of oxidative stress. *Biomedical Resear.* v.21 (2): 156-160, 2010.

SHI, P. A.; NESS, P. M. Two-unit red cell apheresis and its potential advantages over traditional whole-blood donation. *Transfusion*, Philadelphia. v. 39, p. 218 – 225, 1999.

SHOHET, S. B.; MOHANDAS, N. Methods in Hematology: Red Cell Membranes. London, UK: Churchill Livingstone, 1988.

SHONAT, R. D.; JOHNSON, P. C. Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study. *The American Journal of Physiology*, Bethesda. v. 272, n. 5, s. 2, p. h2233 - h2240, 1997.

SILVA, D. C. N. ; JOVINO, C. N. ; SILVA, Carlos A. L. ; FERNANDES, H. P. ; FILHO, M. M. ; LUCENA, S. C. ; COSTA, A. M. D. N. ; CESAR, C. L. ; BARJAS-CASTRO, M. L. ; Santos, BEATE S. ; FONTES, A. ; UVERSKY, V. N. . Optical Tweezers as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells. *Plos One*, v. 7, p. e31778, 2012.

SILVA, D. C. N.; FERNANDES, H. P.; JOVINO, C. N. FILHO, M. M.; FILHO, A. F. M.; OLIVEIRA, A. D. P. R.; FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; CESAR, C. L.; BARJAS-CASTRO, M. L. e FONTES, A. Uso de pinças ópticas para avaliação do potencial zeta de hemácias em EDTA, CPD-SAGM e estocadas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. v. 42, p. 237-240, 2010.

SONI, G. V. Development of an optical tweezer combined with micromanipulation for DNA and protein nanobioscience. *Current Science*. v. 83, p.1464, 2002.

STIENE-MARTIN, E. A. Clinical Hematology - Principles, Procedures, Correlations; New York, Lippincott Williams & Wilkins, p. 817, 1998. *The Journal of Cell Biology*, New York. v. 73, p. 638 - 646, 1977.

TENJARLA, S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug*.v.16, n.5, p.461-521, 1999.

TESDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; JACOMINO, G. ; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FARULO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The journal of Nutritional Biochemistry*. V. 11, p.114-119, 2000.

TRABER, M. G. Vitamin E. In: Shills ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Modern nutrition in health and disease. *New York: Lea & Febiger*,. p.326-41, 1994.

VALTIS, D. J. Defective gas-transport function of stored red blood cells. *Lancet*. v.266, p.119-124, 1954.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, E L. T. K. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. *Química Nova*. v.30, p. 1323-1338, 2007.

WANG, S. K.; CHIU, J. J.; CHEN, L. J.; LI, M. R.; CHOU, S. C. & HWANG, N. H. C. Optical tweezers measurements of leukocyte-endothelium adhesion force. *Asaio Journal*. v. 50 (2): 166, 2004.

WIBACK, S. J.; PALSSON, B. O. Extreme Pathway Analysis of Human Red Blood Cell Metabolism. *Biophysical Journal*. v.83, p. 808-818, 2002.

WOLFE, L. C. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion*, v.25, p.185-203, 1985.

YOSHIHITO YAWATA. Cell Membrane: The red Blood Cell as a model. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliar o papel antioxidante da vitamina E sobre os eritrócitos em bolsas de concentrados de hemácias de CPD/SAG-M.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- (1) Formular e caracterizar soluções aditivas para concentrados de hemácias de CPD/SAG-M utilizando vitamina E em forma de emulsão;
- (2) Avaliar a ação das emulsões de vitamina E utilizando os métodos de controle de qualidade utilizados nos bancos de sangue (determinados pela Resolução RDC 153);
- (3) Avaliar a ação da emulsão de vitamina E na produção de espécies reativas de oxigênio nas hemácias durante a estocagem;
- (4) Avaliar a ação da emulsão de vitamina E na deformabilidade de hemácias estocadas através de pinças ópticas.

**4. ARTIGO CIENTÍFICO:** (a ser submetido para a revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis - JPBA*):

1                                   **ANTIOXIDANT ACTIVITY STUDIES OF VITAMIN E**  
2                                   **EMULSIONS IN STORED RED BLOOD CELLS**

3  
4 C. A. L. Silva<sup>1</sup>, C. A. Azevedo Filho<sup>2</sup> D. C. N. Silva<sup>1</sup>, A. C. S. R. Nunes<sup>1</sup>, M. C. A. B. Castro<sup>3</sup>,  
5 A. F. Almeida<sup>3</sup>, S. C. A. Lucena<sup>4</sup>, M. L. Barjas Castro<sup>5</sup>, B. S. Santos<sup>2</sup>, A. Fontes<sup>1,\*</sup>  
6

7 <sup>1</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,  
8 Pernambuco, Brazil.

9 <sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,  
10 Pernambuco, Brazil.

11 <sup>3</sup> Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM, FIOCRUZ, Recife, Brazil.

12 <sup>4</sup> Fundação Hemope, Recife, Pernambuco, Brazil.

13 <sup>5</sup> Hematology and Transfusion Center, Universidade Estadual de Campinas, INCTS -  
14 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil.

15  
16 **\*corresponding author:** Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e  
17 Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil, e-mail:  
18 adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br, (55) 81 21267818.  
19  
20  
21

22 **Abstract:** During the storage in blood banks, erythrocytes suffer progressive deterioration,  
23 which can compromise the post-transfusion red blood cells (RBCs) integrity in blood  
24 circulation. Many of these storage lesions can be caused by oxidative damages on the RBCs  
25 membranes. Some studies have reported that vitamin E is one of the most important  
26 antioxidant acting on lipids of cellular membranes. Thus, the present study aimed to evaluate  
27 if the vitamin E antioxidant properties are able to improve the storage conditions of RBCs  
28 units. Due to their hydrophobic nature, we prepared vitamin E emulsions in different solvents  
29 (Phosphate Buffer Saline 1X - PBS, 0.9% saline or Sagmanitol – SAG-M). The emulsion  
30 characterizations showed the presence of particles in nanometer range and confirmed the  
31 presence of vitamin E in the formulations prepared. After, RBCs units from healthy donors

32 were divided into two units. One of them received the emulsions and the other was used as  
33 control. Freshly prepared formulations were added to blood components aseptically and then  
34 the RBCs units were stored at 4°C. Quality control analyses performed at 35<sup>th</sup> day of storage  
35 showed that vitamin E emulsions in PBS leads to hemolysis. Results for the saline vitamin E  
36 formulation showed no difference in reactive oxygen species (ROS) production when  
37 compared to the control. However, the system with SAG-M vitamin E presented an average  
38 relative ROS production decay of at least 35% during storage. RBCs elasticity for SAG-M  
39 systems was then measured by using an optical tweezers. Results showed that the  
40 deformability for samples with SAG-M vitamin E emulsion did not differ from control during  
41 the storage. We believe that we did not observe changes in RBCs deformability because the  
42  $\alpha$ -Tocopherol acts against lipids oxidation and, for preserving the RBCs elasticity, the protein  
43 oxidation can be more important. Thus, we can conclude that although vitamin E has  
44 decreased the ROS production, studies with antioxidants acting on RBCs membrane  
45 proteins deserve attention since the gradual loss of elasticity is a relevant storage lesion.

46

47 **Highlights:**

- 48 - We prepared  $\alpha$ -Tocopherol emulsions and incubated them in CPD/SAG-M bags.
- 49 - The role of vitamin E was evaluated by quality control tests, analysis of ROS production  
50 and measurements of RBCs elasticity.
- 51 - Vitamin E emulsions in PBS lyse RBCs units and in saline did not produce ROS decay with  
52 the storage.
- 53 - Vitamin E SAG-M emulsions produced a ROS decrease of at least 35% during the storage,  
54 but did not improve the RBC deformability.

55

56 **Keywords:** Red Blood Cells Bags, Vitamin E, Emulsion, Antioxidant, Reactive Oxygen  
57 Species, Storage, Elasticity.

58

## 59 **1. Introduction**

60

61 Red blood cells (RBCs) are essential to the maintenance of the human body by  
62 transporting oxygen to the organs and tissues. As these cells are rich in oxygen, they also  
63 become targets of reactive oxygen species (such as singlet oxygen,  $H_2O_2$  and  $OH\cdot$ )  
64 originated from the molecular oxygen (ROS). When these species are present in blood flow,  
65 the RBCs are supported by a natural antioxidant system that minimizes or eliminates these  
66 reactive radicals [1]. However, in order to obtain RBCs units for transfusion, it is necessary to  
67 remove approximately 80% of the plasma from the whole blood and, with this, RBCs lose  
68 much of the energy supply and the native antioxidant capacity that are associated to this  
69 biological fluid.

70 RBCs units preservative solutions such as CPDA<sub>1</sub> (Citrate Phosphate Dextrose  
71 Adenine) and CPD/SAG-M (Citrate Phosphate Dextrose supplemented with Saline Adenine  
72 Glucose Mannitol) only supply the energy needs to ensure the ATP production. Thus, as the  
73 RBCs are storage (for 35 to 42 days) at different conditions of the bloodstream and with the  
74 antioxidant capacity decreased, they are susceptible to oxidative damage. These kinds of  
75 injuries are called storage lesions and comprise a set of changes that occur with RBCs  
76 during the storage in blood banks that can lead to irreversible damages and reduce post-  
77 transfusion integrity of the erythrocytes in the human body [2].

78 Among the most common already observed storage injuries is the loss of the cell  
79 elasticity ( $\mu$ ) [3, 4]. The deformability is a fundamental mechanical property of RBCs, which  
80 allows them to pass through capillaries and spleen sinusoids with diameters smaller than  
81 50% of the RBCs sizes (the average size of erythrocytes is from 7 to 9  $\mu m$ ). Recently, some  
82 of us also reported that storage can lead not only to decrease of RBCs elasticities, but also  
83 to the decay of the zeta potential ( $\zeta$ ) due to loss of sialic acids presented in glycoproteins as  
84 consequence of oxidative damages [5]. The  $\zeta$  potential reflects the membrane electrical  
85 charge and it is an important property responsible to stabilize the RBCs colloidal suspension

86 preventing these cells to agglutinate among each other and/or with other cells as well as to  
87 the capillary walls [5-9]. These and others storage injuries are directly related to the gradual  
88 oxidation and loss of cellular components (lipid peroxidation and/or protein oxidation) [9-12].  
89 A better knowledge in this area can help the development of new preservative solutions for  
90 RBCs units, supplemented by antioxidant substances, which can improve RBCs biophysical  
91 and functional integrity in the blood circulation, after larger periods of storage, yielding to a  
92 better post-transfusion survival.

93         Among the non-enzymatic substances, vitamins E or  $\alpha$ -Tocopherol is the most  
94 popular and major lipid-soluble antioxidant. Over the years, many studies have demonstrated  
95 the antioxidant activity of vitamin E on the lipids, acting by blocking principally the  
96 peroxidation of poly-unsaturated fatty acids in biological membranes [11-13]. Vitamin E  
97 intercepts the hydroxyl and peroxy radicals, resulting in the formation of tocopheryl radical  
98 that can even be regenerated by vitamin C [14,15]. Some studies, for example, presented  
99 that vitamin E supplementation can improve clinical symptoms in individuals with hereditary  
100 anemia, which have increased oxidative stress, such as sickle cell anemia and thalassemia  
101 [16]. Other research showed that vitamin E present in the cell membranes can protect RBCs  
102 from hemolysis [17].

103         In this way, considering that many of the injuries can be related to the lipid  
104 peroxidation of erythrocyte membranes during storage, this study aimed to evaluate the  
105 effect of vitamin E as a possible antioxidant of RBCs units. For this, we prepared  $\alpha$ -  
106 Tocopherol emulsions in different solvents and incubated them in CPD/SAG-M bags. The  
107 role of vitamin E was evaluated by quality control tests as well as by analysis of ROS  
108 production and measurements of RBCs elasticity performed by an optical tweezers system,  
109 in function of storage. To our knowledge, this kind of study was not yet reported in literature.  
110 We believe that this kind of work can provide subsidies on the mechanisms and the

111 consequences of the antioxidants activity and help to improve the conditions of RBCs used  
112 for transfusion.

113

114

## 115 **2. Material and Methods**

### 116 **2.1 Vitamin E Emulsions – Preparation and Characterization**

117 As the  $\alpha$ -Tocopherol is lipophilic, firstly it was necessary to solubilize the vitamin E in  
118 aqueous media, in form of emulsion, in order to improve the interactions of this compound  
119 with the erythrocytes. The formulations were prepared in three different media by mixing 160  
120 mg of  $\alpha$ -Tocopherol (Fluka), 265 mg of Tween 20 (VETEC), 265 mg of Tween 80 (VETEC)  
121 and 50 mL (at approximately 50°C) of PBS 1X (Phosphate Saline Buffer) or saline solution at  
122 0.9% or SAG-M (Fresenius Kabi ®), followed by 5 minutes of sonication (frequency of 25 kHz  
123 – ultrasound bath). Once prepared, the emulsions were characterized by dynamic light  
124 scattering (DLS – Zetasizer Nano ZS 90), electronic UV-Vis absorption spectroscopy (600  
125 Evolution – Thermo Scientific) and by High Performance Liquid Chromatography (HPLC –  
126 Shimadzu – Prominence).

127 The HPLC analysis was done only for the SAG-M sample, because this medium  
128 absorbs in the same region than vitamin E and the electronic UV-Vis spectroscopy was not  
129 capable to distinguish the components. The HPLC system was consisted of a diode array  
130 detector (DAD) model SPD-20AV, quaternary pump model LC-20 AT, column oven model  
131 CTO-20AC, auto sampler model SIL-20AC. The system was commanded by a controller  
132 model CBM-20A and operated with LC Solution™ software (version 1.25). Elution of samples  
133 was performed on a Spherisorb C18 150 mm × 3.2 mm 5.0  $\mu$ m column (Varian) and the  
134 samples were detected between  $\lambda$  = 190 and 400 nm. The mobile phase used to vitamin E  
135 separation was methanol (Merck – in HPLC grade), performed in isocratic mode. The  
136 analysis was performed at a flow rate of 1 mL/min and at a temperature of 35°C. The total  
137 run time was 5 min. For that, the amount of 1 mL of the admixture of SAG-M and vitamin E

138 was transferred to a centrifuge tube and 4 mL of ultrapure water and 2 mL of extraction  
139 solution (hexane-ethyl acetate 80:20 v/v) were added. The mixture was vortexed for 30 s and  
140 sonicated for 5 min. Soon after, the sample was centrifuged at 3400 rpm for 20 min. The  
141 upper layer was transferred to a glass tube, evaporated under nitrogen, reconstituted with  
142 methanol and filtered in Teflon filter of 0.22 µm (Millipore). An aliquot of 20 µL of the solution  
143 was then injected into the chromatographic column.

144

## 145 **2.2 RBCs Samples**

146 RBC units were obtained from health blood donors at Foundation of Hematology and  
147 Hemotherapy of Pernambuco (Fundação Hemope – the Ethical Committee of this Institution  
148 approved this study). All RBC bags were collected in CPD/SAG-M (Fresenius Kabi®) and  
149 stored at 4°C (± 2°C). Each bag was split in two portions of 160 mL. One of them received 10  
150 mL of the vitamin E emulsions freshly prepared (formulated in PBS, saline or SAG-M). The  
151 other unit received the same amount of the respective solvent (without emulsion) and was  
152 considered as the control. All manipulations performed with the RBCs units were done via  
153 sterile connecting devices. The amount of 10 mL was chose in order to achieve a  
154 concentration of 0.2 mg/mL, which was based on the LIPIDEM 20% (a pharmaceutical lipid  
155 complex produced by B Braun AG applied for parenteral nutrition).

156

## 157 **2.3 RBCs Analyses**

### 158 **2.3.1 Quality Control**

159 All the samples (with or without vitamin E emulsions) were evaluated by the same  
160 quality control performed at the Hematology and Hemotherapy Centers. Analyses of  
161 hemoglobin, hematocrit, hemolysis and microbiological tests were done on the 35<sup>th</sup> day of  
162 storage.

163

### 164 **2.3.2 ROS Evaluation**

165 The reactive oxygen species (ROS) generation for the RBCs units was monitored on  
166 the 8<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> days of storage by using the DCFH-DA fluorescent label (2',7'-  
167 dichlorofluorescein-diacetylated – Invitrogen) [15]. For this, 500  $\mu\text{L}$  of each unit (with or  
168 without vitamin E emulsion) was washed three times by centrifugation (3500 rpm for 5  
169 minutes) and resuspended in order to obtain approximately  $10^6$  cells/mL. Subsequently, the  
170 cells were incubated with 0.5  $\mu\text{L}$  (at 10 mM) of the DCFH-DA for 30 minutes. After that, the  
171 samples were again washed two times by centrifugation (3500 rpm for 5 minutes) and were  
172 readily evaluated by flow cytometry (Becton Dickinson – FACSCalibur System). It was  
173 analyzed 20,000 events for each test. The green fluorescence of DCFH-DA was measured  
174 by the channel FL1 and was excited with a 488 nm laser.

175 Positive control evaluation was also done by using 1  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide (30%,  
176 VETEC) diluted in 100  $\mu\text{L}$  and 50  $\mu\text{L}$  of saline. The amount of 10  $\mu\text{L}$  of these solutions was  
177 added to the RBCs samples (also at  $10^6$  cells/mL) and ROS species were analyzed by the  
178 same protocol described above.

179

### 180 **2.3.3 Elasticity Measurements**

181 In order to evaluate the elasticity, RBCs (obtained from bags with and without vitamin  
182 E emulsion) were analyzed by an optical tweezers system consisted of a laser beam in the  
183 near infrared ( $\lambda = 1064$  nm – IPG Photonics) focused on the microscope (Axiolab, Carl Zeiss)  
184 through an objective of 100X (NA = 1.25). For the measurements, RBCs samples (diluted in  
185 serum AB – 1:1000  $\mu\text{L}$ ) were added to a Neubauer chamber, captured by the optical  
186 tweezers and dragged against the blood serum with six constant velocities ranging from 140  
187  $\mu\text{m/s}$  to 315  $\mu\text{m/s}$  by using the motorized stage (Prior Scientific – ProScan) coupled to the  
188 microscope [4]. When RBCs are dragged in the blood serum, they are deformed and two  
189 forces act upon the cells, a hydrodynamic force and an elastic force. Equilibrium occurs  
190 when elastic force cancels the drag force. At equilibrium,

191 
$$L = L_0 + \left( \frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right) v \quad (\text{Equation 1}),$$

192 where  $\mu$  is the overall apparent elasticity,  $\Delta L = L - L_0$  is the cell length deformation (adopting  
193  $L_0$  as the cell length in the absence of any force),  $\eta$  is the blood serum viscosity and  $v$  is the  
194 velocity. The cell is located at a distance  $Z_1$  from the bottom of a Neubauer chamber and  $Z_2$   
195 from the cover slip,  $1/Z_{eq} = 1/Z_1 + 1/Z_2$ . Therefore, once the blood serum viscosity  $\eta$ , the initial  
196 length  $L_0$  and  $Z_{eq}$  are known, the measurement of the cell length as a function of the drag  
197 velocity can be used to extract a value for  $\mu$ .

198 The cell movement at different velocities was registered with a real time image  
199 capture system integrated to a computer. The  $L$  value was measured from video snapshots  
200 with Image Pro-Plus software (Media Cybernetics). The snapshots were obtained by using  
201 the softwares Virtual Dub (by Avery Lee) and Paint Shop Pro (Corel Corporation). The depth  
202  $Z_1$  was set by focusing the bottom of the Neubauer and then lowering the chamber by the  
203 desired amount (in this case 50  $\mu\text{m}$ ) while keeping the cell fixed with the optical tweezers. As  
204 well as the ROS evaluation, the elasticity measurements were done on 8<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> days  
205 of storage. At each analysis at least 20 cells were measured by each unit (with or without  
206 vitamin E emulsion). To examine statistical differences or similarities presented between the  
207 groups, we use the Wilcoxon on rank sums test. Groups were considered significant different  
208 for  $p$  values lower than 0.05 (for a two-tail hypothesis).

209  
210  
211

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1 Quality Control**

213 The quality control initial analyses showed that the formulations containing PBS  
214 caused a high degree of hemolysis in RBCs units and for this reason, we did not performed  
215 more tests with this sample. On the other hand, the results of quality control, done on 35<sup>th</sup> of  
216 storage and presented in Table 1, show that practically there was no difference between the

217 units with and without vitamin E for the formulations with saline and SAG-M (for two RBC  
 218 units analyzed). Interestingly, all samples showed values in agreement with the benchmarks  
 219 set by the RDC 57 (50 to 80% of hematocrit, hemoglobin > 45 g; degree of hemolysis < 0.8%  
 220 [19]. Microbiological tests were negative, indicating that there was no contamination in the  
 221 RBCs units by bacteria (aerobic or anaerobic) during whole process.

222  
 223

**Table 1** – Quality control results at 35<sup>th</sup> day of storage for formulations in saline and SAG-M.

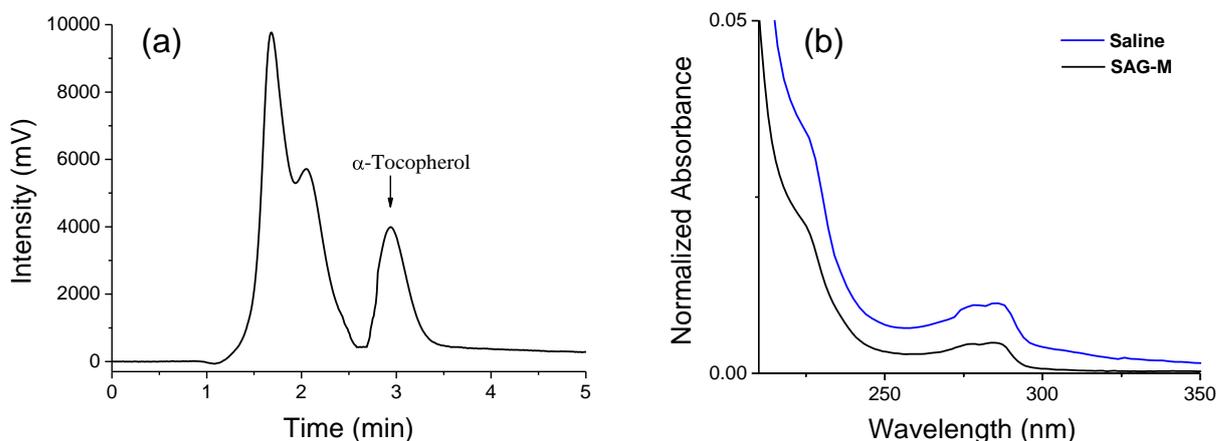
	Media	Unit	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	Hemolysis (%)	Microbiological Test
Sample 1	Saline	Control	62.4	17.3	0.7	Neg
		Vitamin E	58.0	16.0	0.7	Neg
Sample 2	Saline	Control	51.3	16.7	0.6	Neg
		Vitamin E	51.2	16.8	0.6	Neg
Sample 1	SAGM	Control	58.2	17.8	0.6	Neg
		Vitamin E	56.3	17.8	0.6	Neg
Sample 2	SAGM	Control	55.2	15.9	0.6	Neg
		Vitamin E	54.5	16.3	0.6	Neg

224

225

### 226 **3.2 Vitamin E Emulsions Characterizations**

227 As the formulation in PBS caused considerable lyses of RBCs, we performed the  
 228 characterizations only for emulsions using NaCl and SAG-M. The chromatogram of Figure 1  
 229 (a) shows the vitamin E separated from the other components of the emulsion (retention time  
 230 of 2.9 min). Figure 1 (b) presents the absorption spectra for vitamin E emulsion in saline  
 231 (blue) and in SAG-M (black) respectively obtained by UV-Vis and HPLC analyses, where we  
 232 can identify the typical band of the tocopheryl acetate (for both formulations) around 286 nm  
 233 (99.9% of similarity with the vitamin E standard) confirming the presence of vitamin E in the  
 234 emulsions, as expected. The data presented are an indication that the  $\alpha$ -Tocopherol  
 235 remained active after being solubilized by surfactants in aqueous media.



**Figure 1** – (a) HPLC chromatogram for SAG-M with vitamin E emulsion and (b) Saline (in blue) and SAG-M (in black) vitamin E emulsions absorption spectra.

The dynamic light scattering analyses were done one day per week during one month (days 8, 15, 22 and 29). The average sizes for the emulsion of vitamin E in saline and SAG-M are presented in Table 2. The droplets for saline formulation increased 6% during this period, indicating that the formulation was stable presenting particles in nanometer scale. The emulsion in SAG-M was also stable and nanometric sized particles as we can also observe in Table 2 (size increase by 3.7%). Both saline and SAG-M emulsions did not present visible phase separation in this period. Despite the purpose of this study was only to use emulsions for improve the RBCs-vitamin E interactions, smaller size dispersions can be obtained an ultrasound rod shaped.

**Table 2** – Sizes in function of time for saline and SAG-M vitamin E emulsions.

Days	Saline Emulsion – Sizes (nm)	SAG-M Emulsion – Sizes (nm)
8	27.6 ± 6.5	21.5 ± 5.4
15	28.7 ± 6.7	22.1 ± 5.5
22	29.8 ± 7.0	21.1 ± 4.5
29	29.4 ± 6.9	22.3 ± 5.6

### 3.3 ROS Evaluation

255 DCFH-DA fluoresces only after oxidation and the number of labeled and fluorescent  
 256 cells is proportional to the amount of ROS produced. The positive control evaluation with  
 257 hydrogen peroxide showed that 92.3% and 96.4% of cells were labeled for the  
 258 concentrations de 1:100 and 1:50, respectively, demonstrating the effectiveness of this  
 259 fluorescent ROS probe.

260 RBCs units (three for each kind of sample - only SAG-M, only saline, SAG-M vitamin  
 261 E emulsion and saline vitamin E emulsion) were evaluated by DCFH-DA. For each unit and  
 262 for each day (8<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup>), the analyses were done in duplicate. For all the samples, we  
 263 observed a ROS increase production with the time of storage as expected. After each  
 264 analysis we compared, for the samples with and without  $\alpha$ -Tocopherol, the relative  
 265 increase/decrease of ROS production (where negative values represent the percentage of  
 266 ROS decrease, while positive percentage values represent ROS increase). Table 3 shows  
 267 the percentages (with the respective standard errors) for the ROS relative reduction/increase  
 268 obtained after saline and SAG-M vitamin E emulsion administration in function of the day of  
 269 storage.

270  
 271 **Table 3** – ROS relative reduction/increase in function of the storage for saline and SAG-M  
 272 vitamin E emulsions.

Days	Saline Emulsion – ROS (%)	SAG-M Emulsion –ROS (%)
8	4.0 ± 10	-35.5 ± 4
21	-4.6 ± 11	-52.7 ± 10
35	6.5 ± 12	-36.0 ± 9

273  
 274 As one can observe by the data of Table 3, the emulsion of saline did not produce  
 275 either significant ROS reduction or ROS increase for any day of measurements. On the other  
 276 hand, interestingly, samples incubated with the emulsions prepared with the preservative  
 277 solution already used in RBC bags, the SAG-M, present an effective ROS reduction of at  
 278 least 35% for all the days of storage analyzed. These studies are in agreement with other

279 works (performed *in vivo* or *in vitro*) that showed an antioxidant activity of vitamin E upon  
 280 RBCs in other conditions [11-12]. For example, Chung and collaborators showed that  
 281 lipophilic  $\alpha$ -Tocopherol was the most effective antioxidant for membrane RBCs peroxidation  
 282 after *in vitro* treatment with Cumene Hydroperoxide. While, Racek and co-authors showed,  
 283 by measuring the malondialdehyde, that vitamin E supplementation for blood donors, can  
 284 improve red cell storage parameters by reducing cell damage caused by free radicals.

285  
 286

### 3.4 Elasticity Measurements

287 Since the emulsion with Vitamin E formulated in SAG-M was effective as an  
 288 antioxidant, we proceed with studies by measuring the elasticity of RBCs using an optical  
 289 tweezers only with units with this medium. The results of elasticity and their respective  
 290 standard errors for control (only with SAG-M) and for SAG-M vitamin E emulsion incubated  
 291 units are shown in Table 4 (for the days 8, 21 and 35). This analysis was done also for two  
 292 RBCs units. There were no significant differences between the control and test samples for  
 293 the three days of measurements. These results indicate that although the formulations with  
 294 Vitamin E in SAG-M were able to decrease the production of ROS in the samples, they were  
 295 not able to improve the elasticity of the cells. Curiously, the cells for the two cases are less  
 296 rigid with storage when compared to other works [20], probably because we have added an  
 297 extra amount of 10 mL of SAG-M in the satellite bags for both samples providing extra supply  
 298 of ATPs for these cells.

299  
 300  
 301

**Table 4** – RBCs average elasticities for control (only with SAG-M) and test (with SAG-M vitamin E emulsion) in function of storage.

Days	Control Elasticity (x 10 <sup>-4</sup> dyne/cm)	Test (x 10 <sup>-4</sup> dyne/cm)
8	5.0 ± 0.5	4.6 ± 0.3
21	5.2 ± 0.4	4.9 ± 0.4
35	6.2 ± 0.4	5.8 ± 0.4

302

303            These findings are in agreement to some other studies on the literature that have  
304 suggested that the loss of elasticity can be more related to the oxidation of proteins and that  
305 these biomolecules suffer oxidation with very low levels of free radicals [21-22]. Synder and  
306 collaborators compared the deformability after treatment with carbon monoxide and BHT  
307 (Butylated Hydroxytoluene) and showed that changes in deformability are more related to  
308 membrane protein oxidation. The work of Kriebardis and collaborators corroborates this  
309 study. They showed the evidence for the occurrence of oxidative damage in membrane  
310 proteins of RBCs stored in CPDA with emphasis to the cytoskeleton components, which are  
311 an important structure for the cell deformability. Recently some of us reported that  $\zeta$  potential  
312 decays can be related to the loss of RBCs elasticity during storage and indicates that the  
313 preservation of the glycoporphins integrity can be important to maintain RBCs deformability. In  
314 this way, as the antioxidant capacity of the  $\alpha$ -Tocopherol is more focused on membrane  
315 phospholipids [23] and as some works showed a direct relationship between erythrocyte  
316 rigidity and the protein oxidation, may be it would be relevant studies on antioxidant activity  
317 of substances acting on membrane proteins in order to better preserve RBCs deformability.

318

#### 319 **4. Conclusion**

320            In conclusion, our results showed that vitamin E emulsions in PBS lyse RBCs units  
321 and the vitamin E formulations in saline did not produce ROS decay with the storage. On the  
322 other hand, vitamin E SAG-M emulsions produced a ROS decrease of at least 35% during  
323 the storage, but did not improve the RBC deformability. Supported by other works, we  
324 suggested that as vitamin E acts rather in membrane lipids and membrane protein oxidation  
325 seems to be more relevant for the RBC deformability. More studies on protein antioxidants  
326 are need since the gradual loss of elasticity is a relevant storage lesion.

327

#### 328 **Acknowledgments**

329 The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
330 (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
331 Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), and  
332 Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). This work is also  
333 linked to National Institute of Photonics and National Institute of Science and Blood  
334 Technology.

335

### 336 **References**

- 337 [1] I. Tedesco, M. Russo, P. Russo, G. Jacomino, G.L. Russo, A. Carraturo, C. Farulo, L.  
338 Moio, R. Palumbo, Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells, J Nutr  
339 Biochem11 (2000) 114-119.
- 340 [2] I. Chin-Yee, N. Arya, S. M. D'almeida, The red cell storage lesion and its implication for  
341 transfusion, Transfus Sci 18 (1997) 447-458.
- 342 [3] L.C. Wolfe, The membrane and the lesions of store in preserved red cells, Transfusion 25  
343 (1985) 185-203.
- 344 [4] A. Fontes, M.L. Barjas-Castro, M.M. Brandao, H.P. Fernandes, A.A. Thomaz, R.R.  
345 Huruta, L. Y. Pozzo, L.C. Barbosa, F.F. Costa, S.T.O. Saad, C.L. Cesar, Mechanical and  
346 electrical properties of red blood cells using optical tweezers, J Opt 13 (2011) 8.
- 347 [5] D.C.N. Silva, C.N. Jovino, C.A.L. Silva, H.P. Fernandes, M.M. Filho, S.C. Lucena,  
348 A.M.D.N. Costa, C.L. César, M.L. Barjas-Castro, B.S. Santos, A. Fontes, Optical Tweezers  
349 as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells, PloS One 7  
350 (2012) e31778.
- 351 [6] A. Fontes, H.P. Fernandes, A.A. Thomaz, L.C. Barbosa, M.L. Barjas-Castro, C.L. César,  
352 Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells With a Double optical  
353 Tweezers, J Biomed Opt 13 (2008) 014001-1 -014001-6.
- 354 [7] W. Pollack, R.P. Reckel, A reappraisal on the force involved in hemagglutination, Int  
355 Arch Allergy Appl Immunol 54 (1977) 29-42.

- 356 [8] S. Jovtchev, I. Djenev, S. Stoeff, S. Stoylov, Role of electrical and Mechanical properties  
357 of red blood cells for their aggregation, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 164 (2000) 95-  
358 104.
- 359 [9] C. Godin, A. Caprani, Effect of blood storage on erythrocyte/ wall interactions: implications  
360 for surface charge and rigidity, *Eur Biophys J* 26 (1997) 175-182.
- 361 [10] R.M. Johnson, Y. Ravindranath, M. El-Alfy, G. Goyette Jr, Oxidant damage to  
362 erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with in  
363 vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation, *Blood* 83 (1994)  
364 1117.
- 365 [11] W.Y. Chung, I.F. Benzie, Probe-assisted flow cytometric analysis of erythrocytes  
366 membrane response to side-specific oxidant stress, *Cytometry* 1;40 (2000) 182-8.
- 367 [12] J. Racek, R. Herynová, V. Holecek, Z. Jerálek, V. Sláma, Influence of antioxidants on  
368 the quality of stored blood, *Vox Sang.* 72 (1997) 16-9.
- 369 [13] M.M.B. Kay, G.J.C.G.M. Bosman, S.S. Shapiro, A. Bendich, P.S. Bassel, Oxidation as  
370 a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and  
371 IgG binding to erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci* 83 (1986) 2463- 2467.
- 372 [14] W.P. Pfeifer, G.R. Degasperi, M.T. Almeida, A.E. Vercesi, F.F. Costa, S.T.O. Saad.  
373 Vitamin E Supplementation Reduces Oxidative Stress in Beta Thalassaemia Intermedia,  
374 *Acta Haematol.* 120;4 (2008) 225-31.
- 375 [15] R.B. Rucker, J.W. Suttie, D.B. Mccemick, L.J. Machlin, *Handbook of vitamins*, third ed.,  
376 Marcel Dekker, New York, 2001.
- 377 [16] A. Chan, C. Chow, D. Chiu, Interaction of antioxidants and their implication in genetic  
378 anemia, *Proc Soc Exp Biol Med* 222 (1999) 274-282.
- 379 [17] J.M. May, Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte, *Front Biosci* 2  
380 (1998) 1-10.

- 381 [18] U-C. Hipler, U. Wollina, D. Denning, B. HIPLER, Fluorescence Analysis of Reactive  
382 Oxygen Species (ROS) Generated by Six Isolates of Aspegillus Fumigatus, BMG  
383 Labstechnologis, Offen burg. 781 (2002) 96968-0.
- 384 [19] Resolução RDC nº 57. Diário Oficial da União, 2010., ANVISA Agência Nacional de  
385 Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde.
- 386 [20] M.L. Barjas-Castro, M.M. Brandão, A, Fontes, F.F. Costa, C.L. César, S.T.O. Saad,  
387 Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers, Transfusion  
388 42 (200) 1196-1199.
- 389 [21] L.M. Snyder, N. L. Fortier, j. Trainor, J. Jacobis, L. Leb, B. Lubin, D. Chiu S. Sholet, N.  
390 Mohandas, Effect on normal human Erythrocyte deformability, morphology, surface  
391 characteristics, an spectrin-hemoglobin Cross-linking, J Clin Invest 76 (1985) 1971-1985.
- 392 [22] G. Kriebardis, M.H. Antonelou, K.E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L.H. Margaritis,  
393 I.S. Papassideri, Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of  
394 denatured hemoglobin in stored red cells, J Cell Mol Med 11 (2007) 148-155.
- 395 [23] D.J. Buckley, P.A. Morrissey, J.I. Gray, Influence of dietary vitamin E on the oxidative  
396 stability and quality of pig meat, J Anim Sci 73 (1995) 3122-30.

## **5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

### **5.1 CONCLUSÕES**

Este estudo demonstrou que a vitamina E foi solubilizada eficazmente em meio aquoso (PBS, salina 0,9%, e SAG-M) com utilização de tensoativos (Tweens 20 e 80). As avaliações do tamanho de partícula demonstraram que tanto em salina quanto em SAG-M as gotículas se encontram em tamanho manométrico e são estáveis ao longo de um mês. Os resultados das análises espectroscópicas e cromatográficas indicam que a vitamina E se mantém íntegra e ativa após a formação das emulsões.

Os resultados de controle de qualidade e marcação de ROS demonstraram que as formulações realizadas em PBS 1x promoveram hemólise acentuada e em salina não diminuíram a produção de ROS, e por isso foram descartadas do estudo.

Seguindo-se a pesquisa com a solução contendo vitamina E emulsionada em SAG-M, observou-se que esta apresenta atividade antioxidante em CHs, reduzindo em pelo menos 35% a produção de ROS ao longo do período de estocagem. Entretanto as avaliações de elasticidade dos eritrócitos não apresentaram diferença significativa quando se comparam as amostras controle.

### **5.2 PERSPECTIVAS**

Como primeira perspectiva pretendemos aumentar o número de bolsas estudadas para ter pelo menos cinco unidades analisadas para ROS e elasticidade. Após essa etapa, como estudos indicam que a oxidação em proteínas é a maior responsável pela redução da elasticidade dos eritrócitos e que essa acontece muito antes da lipoperoxidação, e como os processos oxidativos estão interligados, estudos futuros deverão ser realizados a fim de potencializar a redução do processo oxidativo nas proteínas. Para isso, a ação antioxidante da vitamina E (variando ou não sua concentração) será associada à vitamina C e/ou a outros antioxidantes afim de avaliar a capacidade dessas formulações diminuírem (ou não) a produção de

ROS e manterem (ou não) a deformabilidade preservada dos eritrócitos de CHs beneficiados com esses antioxidantes. Além disso, pretendemos investigar o papel do SAG-M (que foi adicionado de forma extra nas bolsas de sangue) na deformabilidade das hemácias. Outros métodos de detecção da oxidação também devem ser adicionados na metodologia de avaliação do estresse oxidativo em CHs, a fim de se elucidar mais as informações obtidas. Outros danos eritrocitários, como a redução do potencial zeta, que impactam na redução do rendimento transfusional, devem também ser estudados. Por fim, também pretendemos quantificar a vitamina E (e eventualmente outras vitaminas e substâncias) nas emulsões através do HPLC.

***ANEXO – NORMAS DO JBPA***