



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

CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA

**Antioxidantes como Aditivos para Concentrados de Hemácias – Propriedades
Bioquímicas e Avaliação Biomecânica por Pinças Ópticas**

Recife

2017

CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA

Antioxidantes como Aditivos para Concentrados de Hemácias – Propriedades Bioquímicas e Avaliação Biomecânica por Pinças Ópticas

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Carlos Antônio Lima da
Antioxidantes como aditivos para concentrados de hemácias: propriedades bioquímicas e avaliação biomecânica por pinças ópticas. / Recife: O Autor, 2017.

104 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes

Coorientadora: Beate Saegesser Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexo

- 1. Eritrócitos 2. Antioxidantes 3. Vitaminas I. Fontes, Adriana (orient.) II. Santos, Beate Saegesser (coorient.) III. Título**

573.1536

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 457

CARLOS ANTÔNIO LIMA DA SILVA

**Antioxidantes como Aditivos para Concentrados de Hemácias – Propriedades
Bioquímicas e Avaliação Biomecânica por Pinças Ópticas**

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Aprovada em 06 de fevereiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Pro^a Dr^a Adriana Fontes (Orientadora)
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CB-UFPE

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CB-UFPE

Pro^a Dr^a Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CB-UFPE

Pro^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – CB-UFPE

Pro^a Dr^a Giovannia Araújo de Lima Pereira
Departamento de Química Fundamental- CCEN-UFPE

**Feliz o homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento, porque a sabedoria vale mais que a prata, e dá mais lucro que o ouro.
Provérbios 3: 13-14**

RESUMO

Os eritrócitos sofrem alterações bioquímicas e biomecânicas ao longo do período de armazenamento para fins transfusionais, que têm sido associadas ao estresse oxidativo. As soluções preservantes atuais suprem em geral as necessidades energéticas, mas ainda precisam de aditivos antioxidantes mais eficazes. Neste sentido, a fim de prevenir, ou atenuar, o estresse oxidativo ao longo do armazenamento de concentrados de hemácias (CHs), na tentativa de diminuir tais alterações celulares, nesse trabalho foi avaliada a ação dos antioxidantes: vitamina E e polifosfato de sódio. A vitamina E, encontrada nas membranas biológicas, atua prevenindo a lipoperoxidação. Já os polifosfatos são polímeros hidrofílicos associados à resistência ao estresse oxidativo nos seres vivos, e a propriedades tamponantes e bioenergéticas. Primeiramente, os CHs foram divididos em duas partes e, posteriormente, uma delas foi pré-tratada de forma asséptica, com vitamina E ou polifosfato de sódio e a outra foi usada como controle. A vitamina E foi emulsionada com os *Tweens* 20 e 80, em SAG-Manitol (SAG-M) de forma a atingir uma concentração final de 0,2 mg/mL por CH. As caracterizações das emulsões mostraram a existência de partículas na escala nanométrica e confirmaram a presença de vitamina E estruturalmente intacta na formulação preparada. Os resultados de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), avaliada por DCFH-DA indicaram uma diminuição relativa na produção de ROS de pelo menos 35% durante o armazenamento. A elasticidade dos eritrócitos foi em seguida avaliada usando pinças ópticas e os resultados mostraram que a capacidade de deformação dessas hemácias não diferiu significativamente do controle durante todo o armazenamento, possivelmente pela atuação da vitamina E ser mais localizada nos fosfolipídeos, uma vez que a oxidação das proteínas do citoesqueleto eritrocitário vem mostrando ser um fator mais crítico para a deformabilidade. Enquanto isso, eritrócitos estocados tratados com polifosfato de sódio (n = 9), na concentração de 0,4 mg/mL apresentaram uma deformabilidade ca. 25% maior quando comparados com o controle, na 5ª semana de armazenamento. A literatura também indica que polifosfatos podem acelerar a coagulação sanguínea. No entanto, as análises dos tempos de tromboplastina parcialmente ativada e de protrombina demonstraram que ao aumentar a concentração de polifosfato de sódio, o tempo de coagulação cálcio dependente também tende a aumentar e não o contrário. Os resultados do controle de qualidade dos CHs contendo polifosfato de sódio, ou as formulações de vitamina E, também não demonstraram alterações significativas quando comparados ao controle. Espera-se que a presente pesquisa possa fornecer suporte para uma compreensão mais profunda e fomentar discussões sobre os mecanismos e consequências da atividade de antioxidantes sobre CHs armazenados para transfusão. Além disso, um capítulo de revisão sobre a avaliação de propriedades biofísicas eritrocitárias utilizando pinças ópticas, aplicadas na hematologia e na hemoterapia, foi produzido.

Palavras-chaves: Eritrócitos. Estresse oxidativo. Lesões de estocagem. Elasticidade. Vitaminas antioxidantes. Polifosfato de sódio.

ABSTRACT

Erythrocytes undergo biochemical and biomechanical changes throughout the storage period for transfusion purposes, which have been associated with oxidative stress. Current preservative solutions supply energy needs but still need effective antioxidant additives. In this sense, in order to prevent, or attenuate, the oxidative stress during the storage of packed red blood cells (pRBC), in an attempt to reduce such cellular alterations, the antioxidant actions of vitamin E and sodium polyphosphate was evaluated. Vitamin E, lipophilic, is found in biological membranes and acts to prevent lipoperoxidation. Polyphosphates, however, are hydrophilic polymers associated with resistance to oxidative stress in living organisms, and to buffering and bioenergetic properties. Firstly, pRBCs were divided into two parts, one of them was pre-treated aseptically with vitamin E or sodium polyphosphate and the other one was used as a control. Vitamin E was emulsified with Tweens 20 and 80 in SAG-Mannitol (SAG-M) to reach a final concentration of 0.2 mg/mL per pRBC. The characterizations of the emulsions showed the existence of particles on the nanometric scale and confirmed the presence of vitamin E structurally intact in the prepared formulation. The results of production of reactive oxygen species (ROS), evaluated by DCFH-DA, showed a relative decrease in the production of ROS of at least 35% during storage. The elasticity of the erythrocytes was then evaluated by optical tweezers and the results showed that the deformation capacity of these red blood cells did not differ significantly from the control throughout the storage, possibly because the action of vitamin E is more localized in the phospholipids, and the oxidation of erythrocyte cytoskeletal proteins has shown to be a major critical factor for deformability. Meanwhile, stored erythrocytes treated with sodium polyphosphate ($n = 9$) at a concentration of 0.4 mg/mL showed a deformability *ca.* 25% higher when compared to the control, in the 5th week of storage. The literature also indicates that polyphosphates can accelerate blood clotting. However, analyses of the activated partial thromboplastin and prothrombin times demonstrated that with the increasing of the sodium polyphosphate concentration, the calcium-dependent coagulation time also tends to increase, not decrease. The quality control results of pRBCs containing sodium polyphosphate, or vitamin E formulations, also did not show significant changes when compared to control. It is expected that the present research may provide support and encourage discussion for a deeper understanding of the mechanisms and consequences of antioxidant activity on stored RBCs for transfusion purposes. In addition, a review chapter on the evaluation of erythrocyte biophysical properties using optical tweezers, applied in hematology and hemotherapy, was also produced.

Keywords: Erythrocytes, Oxidative Stress, Storage Injuries, Elasticity, Antioxidants, Vitamins, Sodium polyphosphate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1 – Representação esquemática da eritropoiese. São mostrados os estágios de diferenciação eritrocíticos, inclusive as principais citocinas envolvidas nesse processo.....18
- FIGURA 2 – Ilustração de um eritrócito e sua molécula de hemoglobina, proteína que pode transportar até quatro moléculas de oxigênio.....19
- FIGURA 3 – Representação estrutural da membrana plasmática eritrocitária, constituída por uma bicamada lipídica, proteínas integrais e periféricas e carboidratos.....20
- FIGURA 4 – Representação das formas que o eritrócito pode assumir: (A) discócitos, (B) equinócitos, forma característica devido à precipitação de espectrina em hemácias envelhecidas e (C) esferócitos.....23
- FIGURA 5 – Representação esquemática da via das pentoses fosfato.....26
- FIGURA 6 – Representação esquemática da via glicolítica principal do metabolismo energético eritrocitário (via de *Embden-Meyerhof*) e do desvio de *Rapoport-Luebering*, redutor de 2,3-BPG.....27
- FIGURA 7 – Representação esquemática da sequência de estágios da oxigenação da hemoglobina. (A) Hb desoxigenada; (B) e (C) fixação de O₂ por globinas alfa; (D) e (E) fixação de O₂ por globinas e deslocamento de 2,3-BPG, representado pela seta cinza.....28
- FIGURA 8 – Estrutura molecular de uma cadeia de polifosfato [PO₃⁻]_n, com n = 9.....33
- FIGURA 9 – Ilustração do processo convencional de obtenção de concentrados de hemácias (CH) a partir do sangue total (ST). (A) O ST é coletado. (B) Após uma centrifugação, é possível separar as fases de hemocomponentes. (C) Extração do sobrenadante, o plasma rico em plaquetas e obtenção de concentrado de hemácias.....36
- FIGURA 10 – Representação esquemática do aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois raios de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la.....45
- FIGURA 11 – Diferenças entre as deformações eritrocitárias resultantes das velocidades aplicadas no 8º e no 36º dias de estocagem.....47

FIGURA 12 – Gráfico representativo da elongação da hemácia em função da velocidade de arraste.....48

CAPÍTULO

FIGURE 1 – (A) Collision between a photon and a particle. (B) Forces and trajectories for two rays of a single, highly focused laser beam, for $n_2 > n_1$73

FIGURE 2 – Schematic representation of a single-beam optical tweezer system.....74

FIGURE 3 – (A) Bead displacement after being dragged at a constant velocity for optical tweezers calibration, in the horizontal plane. (B) Measuring erythrocyte adhesion by using dual-beam optical tweezers.....75

FIGURE 4 – (A) Scheme demonstrating a pair rouleau being disaggregating by the dual-beam optical tweezers, the greater the force, the higher the Δx . (B) Scheme representing the dependence of the minimal RBC overlapping (dX) according to the rouleau formation time t_a . In this case the trapping force was fixed at ca. 29 pN.....75

FIGURE 5 – Elasticity evaluated for RBCs from subjects control, HbSS, HbAS, and HbSS/HU. Image adapted with permission from John Wiley and Sons: [EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY] [36], copyright (2003).....76

FIGURE 6 – RBC elongation according to dragging velocities of 200 $\mu\text{m/s}$ and 260 $\mu\text{m/s}$, on day 8 (A) and day 36 (B) of storage in CPD-SAGM bags. Image adapted with permission from PLoS ONE [19].77

FIGURE 7 – Scheme of a methodology used to study the deformability of RBCs affected by *Plasmodium falciparum*, the etiological agent of malaria, using optical tweezers78

FIGURE 8 – *In vivo* optical tweezers: trapping a RBC within subdermal capillaries in living mouse. Image adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: [NATURE COMMUNICATIONS] [47], copyright (2013).....79

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “TRANSFUSION MEDICINE”

FIGURE 1 – (A) Absorption spectra of vitamin E in different media: reference standard in methanol (solid line) and in nanoemulsion (dashed line). (B) HPLC chromatogram of vitamin E reference and sample.....86

FIGURE 2 – ROS production (%) per day of storage, control units in black and vitamin E treated ones in gray. Inset: ROS relative reduction (%) with respect to controls per day of storage (*p = 0.03).....86

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA “INTEGRATIVE BIOLOGY”

FIGURE 1 – Representative microscopy images from different fields showing: (a) control RBCs after 24 h; (b) RBCs with NaPolyP (4X) after 24 h; (c) control RBCs after two weeks and (d) RBCs with NaPolyP (4X) after two weeks. Scale bar = 10 μm91

FIGURE 2 – Evolution of (a) Prothrombin Time ($p > 0.4$) and (b) Activated Partial Thromboplastin Time ($p < 0.01$) as a function of NaPolyP concentration ($n = 9$).....92

FIGURE 3 – RBC elasticity of control and NaPolyP treated samples as a function of storage time. The asterisk indicates that the result was statically significant on day 35 ($p < 0.04$), when treated and not-treated groups were compared.....92

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 – Especificações para a garantia da qualidade das unidades de concentrados de eritrócitos do ministério da saúde de acordo com a RDC nº 57 de 2010.....38

TABELA 2 – Alterações observadas em CHs antes e após a estocagem prolongada por 42 dias.....39

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “TRANSFUSION MEDICINE”

Table 1 – RBCs elasticity of control and vitamin E-treated samples in function of storage time.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-DPG	1,3-difosfoglicerato
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
(IL-3) e (IL-9)	Interleucinas 3 e 9
3-PG	3-fosfoglicerato
6PG	6-fosfogluconato
ATP-Mg	ATP ligado a um íon magnésio
BPG	Bifosfoglicerato
BFU-E	Unidades Formadoras de Células em Expansão
CFU-E	/ Unidades Formadoras de Colônias Eritrocíticas
CHs	Concentrado de hemácias
CO ₂	Dióxido de carbono
CPDA ₁	Citrato Fosfato Dextrose Adenina
CPD-SAGM	Citrato Fosfato Dextrose – Salina Adenina Guanina e Manitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPO	Eritropoietina
fL	Fentolitros
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase
Glicose 6P	Glicose-6-fosfato
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidativa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HO [•]	Radical hidroxila
HX	Hexoquinase
MDA	Malonaldeído
MeSH	Enzima meta-hemoglobina redutase

MetHb	Meta-hemoglobina
NADPH	Nicotinamida-adeninucleotídeo-fosfato reduzido
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio Molecular
O ₂ ⁻	Ânion radical superóxido
PFK	Fosfofrutoquinase
PO ₄ ⁻³	Íons ortofosfatos
RDC	Resolução de diretoria colegiada
RO ₂ [•]	Radicais peroxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
SPT	Sobrevida pós-transfusional
ST	Sangue total
TRALI	Injúria pulmonar aguda relacionada à transfusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ERITRÓCITOS HUMANOS	17
3.2 MEMBRANA E CITOESQUELETO DOS ERITRÓCITOS HUMANOS	19
3.3 A DEFORMABILIDADE DOS ERITRÓCITOS HUMANOS	21
3.4 A MORFOLOGIA DOS ERITRÓCITOS HUMANOS	22
3.5 O METABOLISMO ENERGÉTICO E OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS HUMANOS	23
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS HUMANOS	28
3.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NATURAL DO SANGUE	30
3.8 VITAMINAS E e C	31
3.9 POLIFOSFATO	33
3.10 O CONCENTRADO DE HEMÁCIAS	35
3.11 SOLUÇÕES PRESERVANTES	37
3.12 METABOLISMO ERITROCITÁRIO E LESÕES DE ESTOQUE	39
3.13 NANOEMULSÕES	41
3.14 PINÇAS ÓPTICAS COMO FERRAMENTA DE MEDIDA DE MEDIDA DE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE CÉLULAS	44
REFERÊNCIAS	50
4. CAPÍTULO	71
5. ARTIGO	82
6. MANUSCRITO	88
7. CONCLUSÕES	94
APÊNDICE	97
ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

Os eritrócitos são importantes para a manutenção do organismo humano, principalmente porque são responsáveis por carrear oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os pulmões. A eficácia desse transporte depende não só da hemoglobina, proteína com a qual o O_2 se associa, mas também do conteúdo energético, da integridade dos componentes da membrana plasmática, como ainda das propriedades biofísicas e biomecânicas eritrocitárias (SHONAT & JOHNSON, 1997; SILVA et al., 2012).

O envelhecimento dos eritrócitos, conhecido como senescência eritrocitária, é caracterizado pelo acúmulo de alterações estruturais, metabólicas e funcionais. Esse envelhecimento leva também à hemólise, que pode ser provocada por vários fatores, incluindo choque osmótico, esgotamento de recursos energéticos, além de estar relacionado ao estresse oxidativo (FOLLER et al., 2008; RIFKIND & NAGABABU, 2013). Sob condições de armazenamento em concentrados de hemácias (CHs), o envelhecimento fisiológico normal dos eritrócitos é acelerado (BOSMAN et al., 2008). Como as hemácias são ricas em oxigênio, elas são alvos da ação de espécies reativas que se originam a partir desse gás. Quando estão presentes na circulação sanguínea normal, os eritrócitos dispõem de um sistema antioxidante natural que minimiza ou elimina os radicais (TEDESCO et al., 2000). Entretanto, para a obtenção de CHs utilizados para fins transfusionais é necessário remover aproximadamente 80% do plasma de uma unidade de sangue total e, com isso, perde-se grande parte da capacidade antioxidante nativa associada a esse fluido biológico. As soluções preservantes de CHs atuais, tais como CPDA₁ (Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina) e CPD/SAG-M (Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina-Glicose-Manitol) suprem em geral necessidades energéticas, mas ainda precisam de aditivos antioxidantes mais eficazes. Assim, ao longo do período de armazenamento os eritrócitos ficam susceptíveis aos danos oxidativos que levam às chamadas “lesões de estoque”. Dentre elas, podemos destacar: a perda da deformabilidade eritrocitária, uma propriedade mecânica fundamental para os eritrócitos que representa a sua capacidade de variar de forma sempre que uma força incide sobre eles. Os eritrócitos precisam conservar sua deformabilidade para que possam atravessar capilares e sinusóides esplênicos com diâmetros bem menores que seu tamanho (WOLFE, 1985; FONTES et al. 2011; SILVA, et al.,

2012). Essa injúria oxidativa pode levar a um menor rendimento transfusional (BOSMAN et al., 2008).

Poucos trabalhos têm estudado os danos biomecânicos eritrocitários relacionados ao armazenamento de CHs para fins transfusionais (SILVA et al., 2012). Um conhecimento mais aprofundado nesta área poderá ajudar no desenvolvimento de novas soluções aditivas para CHs que minimizem mais o estresse oxidativo e atenuem as lesões de estoque. Abordagens desse tipo poderão proporcionar uma melhor manutenção da viabilidade celular, isto é, a integridade física e funcional eritrocitária, e uma melhor sobrevida celular pós-transfusional, além de ter a perspectiva de poder estocar CHs por mais tempo nos bancos de sangue.

As vitaminas E e C têm se mostrado promissoras nas aplicações em hematologia e hemoterapia. Estudos com: (1) suplementação de vitaminas E e C a pacientes e doadores (KNIGHT et al., 1993; RACKEL et al., 1997; PFEIFER et al., 2008; SUN et al., 2012; EROGLU et al., 2013; MADHIKARMI & MURTHY, 2014), (2) análises *in vitro* com eritrócitos tratados com essas vitaminas após a ação de agentes oxidantes (DURAK, et al., 2008; ABDALLAH, et al., 2009; EROGLU et al., 2013) e, (3) a adição de solução de vitamina C a CHs de CPD/AS-5 com diminuição da hemólise ao final do armazenamento (RAVAL, 2013), têm demonstrado resultados promissores dessas vitaminas na redução do estresse oxidativo sendo apontadas como alternativas à otimização dos procedimentos na hemoterapia. A vitamina E interage com as membranas e atua para minimizar a peroxidação lipídica em vários sistemas biológicos (ALDANA et al., 2001; GIRAY et al., 2001; KALENDER et al., 2004, 2005a; ERASLAN et al., 2007). Sendo esta vitamina lipofílica, é desafiador dispersá-la em meio aquoso, podendo ser possível por meio do desenvolvimento de nanoemulsões. Já a vitamina C, hidrofílica, é um antioxidante natural presente no plasma sanguíneo (SIES et al., 1992). Ela também pode atuar diretamente contra o estresse oxidativo nas membranas celulares, e indiretamente, por regenerar a vitamina E (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Por outro lado, os polifosfatos são polímeros inorgânicos lineares de íons ortofosfatos pertencentes ao grupo dos fosfatos condensados (RAO et al., 2009). Os polifosfatos são encontrados em todas as células de mamíferos e em outros seres vivos nos lisossomos, grânulos densos, mitocôndrias e núcleo (SMITH, et al, 2006).

As funções dos polifosfatos no metabolismo celular estão começando a serem compreendidas e incluem mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, fonte de fósforo e energia, propriedade tamponante e bactericida e ação quelante sobre íons bivalentes (HOURANT, 2004; KIM, 2004; GRAY & JACOB, 2015).

Nesse contexto, este trabalho teve o objetivo de formular, e avaliar ações bioquímicas e biofísicas, de soluções aditivas antioxidantes (baseadas na vitamina E, vitamina C ou polifosfato de sódio) em hemácias armazenadas em CHs de CPD/SAG-M. Além de avaliar a deformabilidade eritrocitária por meio de medições da elasticidade celular por pinças ópticas, uma importante ferramenta no estudo da biologia dos eritrócitos assim como demonstra o *review* apresentado nesse trabalho. Dessa forma, espera-se que este trabalho possa assim fomentar discussões relacionadas aos desafios que ainda persistem no armazenamento de CHs para fins transfusionais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar soluções aditivas antioxidantes para aplicação em concentrados de hemácias armazenados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar nanoemulsões de vitamina E e soluções de vitamina C;
- Avaliar a ação das nanoemulsões de vitamina E e soluções de vitamina C, por meio do controle de qualidade em CHs;
- Avaliar a ação das nanoemulsões de vitamina E e soluções de vitamina C na produção de espécies reativas de oxigênio em CHs;
- Avaliar a fragilidade osmótica dos eritrócitos provenientes de CHs contendo ou não nanoemulsão de vitamina E ou solução de vitamina C;
- Avaliar a ação das nanoemulsões de vitamina E na deformabilidade dos eritrócitos de CHs utilizando pinças ópticas;
- Determinar a composição lipídica dos eritrócitos provenientes de CHs contendo ou não nanoemulsão de vitamina E;
- Preparar e caracterizar soluções de polifosfato de sódio (n = 9);
- Avaliar a ação do polifosfato de sódio por meio do controle de qualidade de CHs;
- Avaliar a ação do polifosfato de sódio no tempo de coagulação sanguínea;
- Avaliar a ação do polifosfato de sódio na deformabilidade dos eritrócitos de CHs utilizando pinças ópticas;
- Elaborar um trabalho de revisão da atuação das pinças ópticas na determinação de propriedades biofísicas eritrocitárias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ERITRÓCITOS HUMANOS

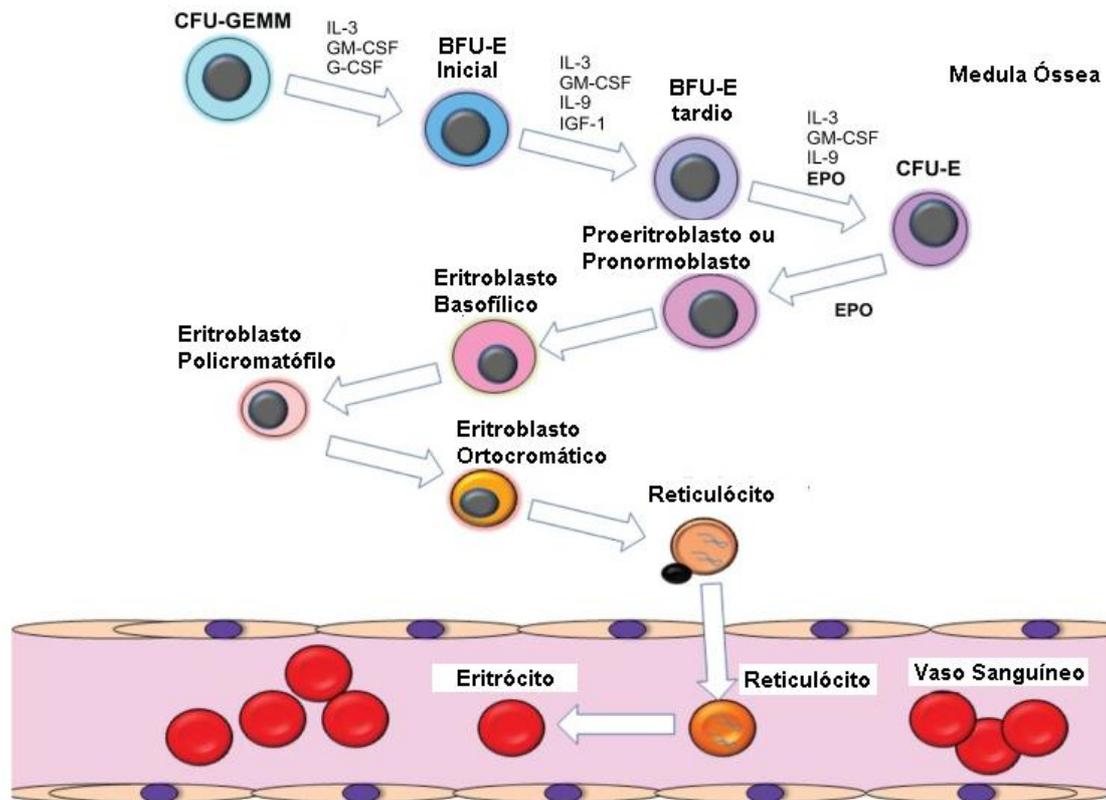
O sangue é um tecido líquido vermelho contendo células em suspensão. A parte líquida do sangue é o plasma, constituído de água, proteínas, lipídeos, glicídios e sais minerais. Dentre as células em suspensão, destacam-se as da linhagem eritrocítica, conhecidas como eritrócitos, hemácias ou glóbulos vermelhos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

Os eritrócitos são produzidos na medula óssea vermelha por meio de um processo conhecido como eritropoiese. Resultantes de uma primeira diferenciação de células-tronco pluripotentes, as células progenitoras mistas (CFU-GEMM) dão início a uma série de estágios, nos quais as “Unidades Formadoras de Células em Expansão (BFU-E)” são as primeiras a serem comprometidas com a linhagem eritróide identificada *in vivo*. Estas, por sua vez, dão origem às “Unidades Formadoras de Colônias Eritrocíticas (CFU-E)”. A partir daí, essas células passam pelos estágios que caracterizam o Pronormoblasto ou Proeritroblasto, o Eritroblasto Basofílico, o Eritroblasto Policromatófilo, o Eritroblasto Ortocromático, o Reticulócito e, por fim, a forma madura, o Eritrócito (Figura 1). Os eritrócitos maduros são células anucleadas com forma de disco bicôncavo, diâmetro entre 7 e 9 μm , espessura entre 1,5 e 2,5 μm e volume de aproximadamente 90 femtolitros (fL) ($1\text{fL} = 10^{-15}\text{L}$) (SCHWABBAUER, 1998; DACIE & LEWIS, 1995; DIEZ-SILVA et al., 2010). Toda a eritropoiese é regulada pela ação de fatores biológicos e nutricionais. Os fatores reguladores biológicos envolvidos são a eritropoietina (EPO), as interleucinas 3 (IL-3) e a 9 (IL-9), o fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas (GM-CSF), a testosterona, os hormônios tireoidianos e hipofisários. Já os fatores nutricionais são a vitamina B12 (cobalamina), a vitamina B6 (piridoxina), o ácido fólico (folato) e o ferro (STEPHEN et al., 1989; FRIED, 2009).

Dos fatores biológicos, o principal 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 ácido desoxirribonucleico (DNA). O ferro é necessário

para a síntese da hemoglobina, enquanto que a vitamina B6 é utilizada na síntese do grupo heme hemoglobínico (STEPHEN et al., 1989; FRIED, 2009).

Figura 1. Representação esquemática da eritropoiese. São mostrados os estágios de diferenciação eritrocíticos, inclusive as principais citocinas envolvidas nesse processo.



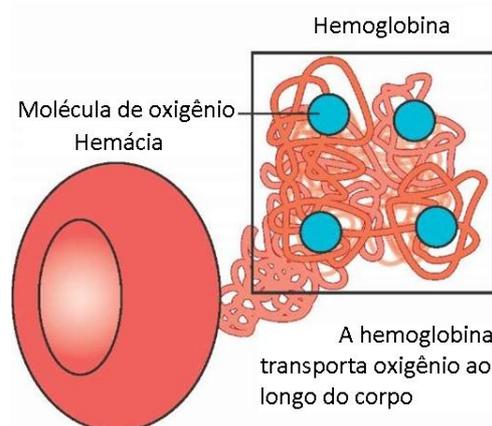
Fonte: Adaptado de SINCLAIR, 2013.

Os eritrócitos são as células mais abundantes do organismo humano. Sua principal função é transportar e manter a integridade de um pigmento respiratório de cor vermelha, a hemoglobina (Hb), responsável por carrear oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos e, dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os pulmões (Figura 2). A eficácia desse transporte depende não só da hemoglobina, mas também da deformabilidade celular, bem como 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 Fe^{2+} , o que permite a ligação reversível do O_2 ao grupo heme, além de facilitar a troca do CO_2 produzido pelos tecidos com os pulmões (ÇIMEN, 2008).

Naturalmente, por transportar oxigênio, os eritrócitos maduros estão particularmente expostos ao estresse oxidativo, podendo acumular lesões oxidativas

(PAIVA-MARTINS et al., 2015). Inclusive, a própria senescência eritrocitária está relacionada com as mudanças no equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua remoção por antioxidantes (RIFKIND & NAGABABU, 2013). Os eritrócitos maduros possuem ainda outras peculiaridades como, por exemplo, a precariedade de mecanismos biossintéticos, sendo incapazes de se dividir, sintetizar proteínas e promover reações oxidativas mitocondriais pelo fato de serem desprovidos de núcleo, ribossomos e mitocôndrias. A normalidade de sobrevivência eritrocitária é cerca de 90 a 120 dias na circulação sanguínea humana, havendo a necessidade de que essas células sejam constantemente renovadas no organismo (ÇIMEN, 2008). Estima-se que num adulto normal sejam produzidos diariamente aproximadamente 2,5 bilhões de eritrócitos (YOSHIHI, 2003).

Figura 2. Ilustração de um eritrócito e uma molécula de hemoglobina, proteína que pode transportar até quatro moléculas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de <http://what-when-how.com/>.

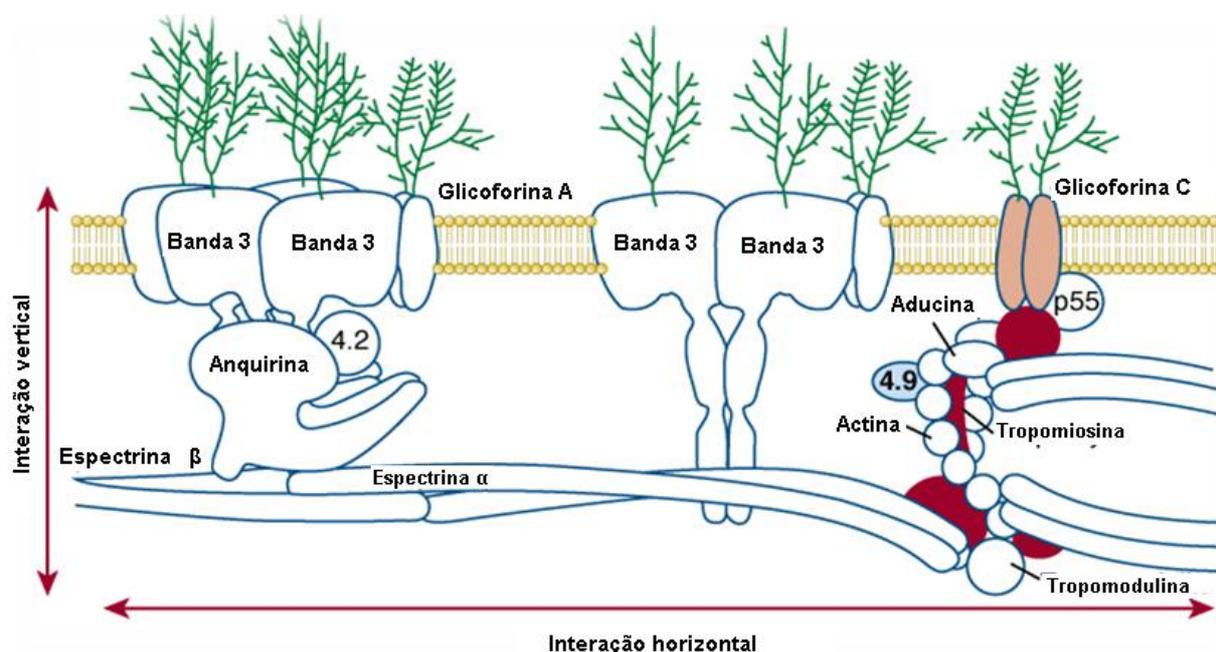
3.2 MEMBRANA DOS ERITRÓCITOS HUMANOS

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

porque pode fornecer informações relevantes, como por exemplo, sobre a sobrevivência eritrocitária, pois se sabe que a externalização da fosfatidilserina é um indicativo de senescência celular e também está associada com várias hemoglobinopatias (YOSHIHI, 2003; LUTZ & BOGDANOVA, 2013).

Essa bicamada é toda atravessada por proteínas integrais inseridas através dos domínios hidrofóbicos de suas sequências de aminoácidos (Figura 3). Exemplos típicos desse grupo são as proteínas banda 3 e as glicoforinas, sendo a mais abundante a glicoforina A, principal proteína que confere carga negativa à membrana da hemácia por meio do ácido siálico. As proteínas de membrana dos eritrócitos são também encontradas na sua periferia interna ajudando a formar o citoesqueleto, dentre as quais estão as espectrinas (cadeias α e β), as proteínas banda 4.1 e a actina. Estas proteínas associam-se especificamente entre si para formar um citoesqueleto localizado diretamente abaixo da bicamada lipídica, ou seja, voltado para o citosol (GOV, 2007). As proteínas ancoradas se conectam com as proteínas integrais e com o citoesqueleto, e são exemplos mais representativos deste grupo a anquirina e a banda 4.2 (YOSHIHI, 2003; ÇIMEN, 2008). A interação entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto afeta o comportamento reológico do eritrócito (BOSS et al., 2012), e dessa forma, a capacidade dos eritrócitos se deformarem depende também dessa relação (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015).

Figura 3. Representação estrutural da membrana plasmática eritrocitária, constituída por uma bicamada lipídica, proteínas integrais e periféricas e carboidratos.



Fonte: Adaptado de BEUTLER et al. 2010.

3.3 A DEFORMABILIDADE DOS ERITRÓCITOS HUMANOS

As propriedades mecânicas dos eritrócitos dependem de suas características morfológicas e são importantes para a compreensão dos processos que afetam a sobrevivência eritrocitária. As funções eritrocitárias estão associadas à capacidade dessa célula se deformar (BOSS et al. 2012; PENG & ZHU, 2013). Isso porque ao longo do sistema circulatório, os eritrócitos precisam atravessar vasos e capilares estreitos, muitas vezes menores que seu próprio diâmetro, mantendo sua integridade estrutural (podendo se alongar até 230% da sua dimensão original) (CLUITMANS et al., 2014; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015). É o que acontece na passagem dessas células pelos capilares e orifícios sinusoidais do baço (3 a 5 μm de diâmetro), órgão responsável pela captação e posterior destruição de células senescentes, danificadas e pouco deformáveis (SHOHET & MOHANDAS, 1988; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015).

Três aspectos importantes estão relacionados com a deformabilidade intrínseca dos eritrócitos: a viscosidade do conteúdo globular; a geometria eritrocitária e as propriedades reológicas da membrana eritrocitária (que incluem bicamada lipídica e citoesqueleto). A viscosidade interna está, por exemplo, relacionada à concentração da proteína hemoglobina (Hb). É sabido, por exemplo, que a presença de hemoglobinas anormais pode aumentar a viscosidade interna, diminuindo a deformabilidade eritrocitária (MCMILLAN & GION, 1981; BRANDÃO et al., 2009). Todavia, o aspecto geométrico está associado à 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 (MOKKEN et al., 1992; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015). E é claro, a composição estrutural e o comportamento funcional da bicamada lipídica e citoesqueleto dos eritrócitos estão diretamente relacionados com a capacidade de deformação. Assim, a distribuição regular dos lipídeos, a manutenção da integridade de proteínas periféricas e dos componentes do citoesqueleto influenciam efetivamente na deformabilidade eritrocitária (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015). Mudanças na organização do citoesqueleto podem levar a alterações na forma dos eritrócitos, interferindo na deformabilidade.

3.4 A MORFOLOGIA DOS ERITRÓCITOS HUMANOS

Os eritrócitos saudáveis durante seus ciclos de vida, 90 a 120 dias, passam por uma série de modificações morfológicas decorrentes do envelhecimento. As formas mais comuns que os eritrócitos podem assumir dependendo da situação são: discócito (forma esperada e desejável para essas células), equinócito e esferócito. O controle da forma eritrocitária é dependente de energia, da integridade da hemoglobina e das proteínas da membrana 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 boa deformabilidade, essencial para a passagem por pequenos capilares (Figura 4 A).

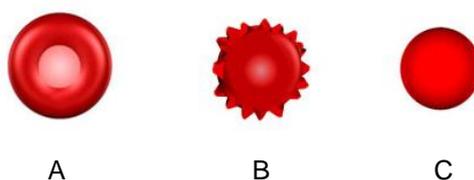
No entanto, alterações bioquímicas podem afetar a forma eritrocitária de discócito. O equinócito (Figura 4 B), por exemplo, se forma a partir da diminuição de ATP no meio, num processo conhecido como depleção metabólica, ou a partir do excesso de íons cálcio (Ca^{2+}), ou ainda por agentes químicos (EDGREEN et al., 2010; LACROIX & TUCCI, 2011; RINALDUCCI et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). Este tipo de morfologia também pode ser resultado da expansão da porção externa ou da porção interna da bicamada e até de mudanças na osmolaridade. Esta forma pode se reverter à forma de discócito, desde que não haja perda de fragmentos da membrana através da adição de concentrações adequadas de ATP ou da fosforilação dos fosfolípidos (CHAILLEY et al., 1973; FERRELL & HUESTIS, 1982; EDGREEN et al., 2010; LACROIX & TUCCI, 2011; RINALDUCCI et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012).

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 rigidez de membrana e dá-se origem à outra forma eritrocitária, o esferócito, (Figura 4 C). Esta forma é irreversível e susceptível à degradação por hemólise.

A depleção metabólica resulta em algumas consequências importantes como: (i) a polimerização do complexo espectrina na face interna da membrana celular

(SHEETZ & SINGER, 1977; LACROIX & TUCCI, 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012) e (ii) a falta de manutenção da fosforilação pelas quinases, devido à contínua ação das fosfatases (GRATZER, 1984; EDGREEN et al., 2010; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). A bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+), uma ATPase, dependente de ATP, perde sua eficiência na depleção metabólica. Assim, a membrana celular não consegue realizar trocas destes íons entre o eritrócito e o meio extracelular, comprometendo também a expulsão de moléculas de água (H_2O), 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 (forma reversível) e (C) esferócitos (forma irreversível).



Fonte: Adaptado de: Hematology Outlines.com.

3.5 O METABOLISMO ENERGÉTICO E OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS HUMANOS

Como mencionado anteriormente, 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 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 Na^+/K^+ ATPase (NAKAO, 1960; EDGREEN et al., 2010; LACROIX & TUCCI, 2011; RINALDUCCI et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012).

Como a glicose pode atravessar com facilidade a membrana plasmática é, portanto, 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: (1) a via **Fosfogluconato** (ou via das **pentoses**) do tipo oxidativa, (2) a via de **Meta-**

hemoglobina Redutase e (3) a via de **Rapoport-Luebering** (RAPOPORT, et al., 1976; MULQUINEY, 1999; WIBACK, 2002). 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 o 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 célula por fosforilação da espectrina, além de modular a quantidade gerada de 2,3-BPG (STIENE-MARTIN et al., 1998; HAMASAKI & YAMAMOTO, 2000). O NADH atua como cofator enzimático em algumas etapas da glicólise, e na reação de conversão da meta-hemoglobina (MetHb) à hemoglobina (Hb), sendo útil na prevenção da oxidação do ferro dos grupamentos heme, num processo mediado pela enzima meta-hemoglobina redutase (MeSH) (RAPOPORT et al., 1976; KLINKEN, 2002). A MetHb é a forma na qual a hemoglobina se encontra oxidada, cujo Fe^{2+} do grupamento heme está oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}) e, por isso, não consegue se ligar ao oxigênio (O_2). Além disso, neste caso, o Fe^{3+} provoca uma mudança alostérica no grupamento heme da Hb parcialmente oxidada, aumentando sua afinidade pelo O_2 ligado e, dessa forma, a MetHb, prejudica a liberação de O_2 para os tecidos (KERN & LANGEVIN, 2000; BARAKA et al., 2001; HAYMOND et al., 2005). De um modo geral, qualquer agente oxidante pode provocar a formação de MetHb e os sistemas redutores naturais mantêm os níveis de MetHb abaixo de 2% (JOHNSON, 2005; CHUI et al., 2005).

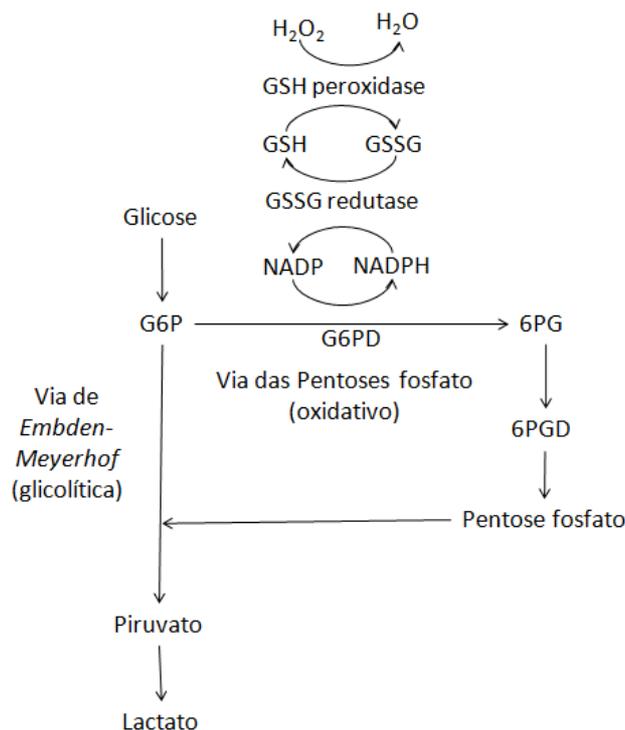
O sistema enzimático que regula a glicólise parece ser constituído por três enzimas principais: a hexoquinase (HX), a fosfofrutoquinase (PFK) e a piruvato quinase (PK). A regulação da HX é realizada por seu produto, a glicose-6-fosfato (G6P), que inibe a ação da enzima, e pelo substrato, o ATP ligado a um íon magnésio (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). Já a PFK pode ser 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. E 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. Entretanto 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 et al., 1976).

Pela via do **Fosfogluconato**, ou via das pentoses fosfato (Figura 5), a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), converte glicose-6-fosfato (glicose 6P) a 6-fosfogluconato (6PG), com produção de nicotinamida-adeninucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) e glutathiona reduzida (GSH). A GSH é conhecida como sendo um importante agente protetor de processos oxidativos. O NADPH é gerado como processo final da transformação do glutathiona peroxidase (GPx) em GSH (Figura 5) (RAPOPORT et al., 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).

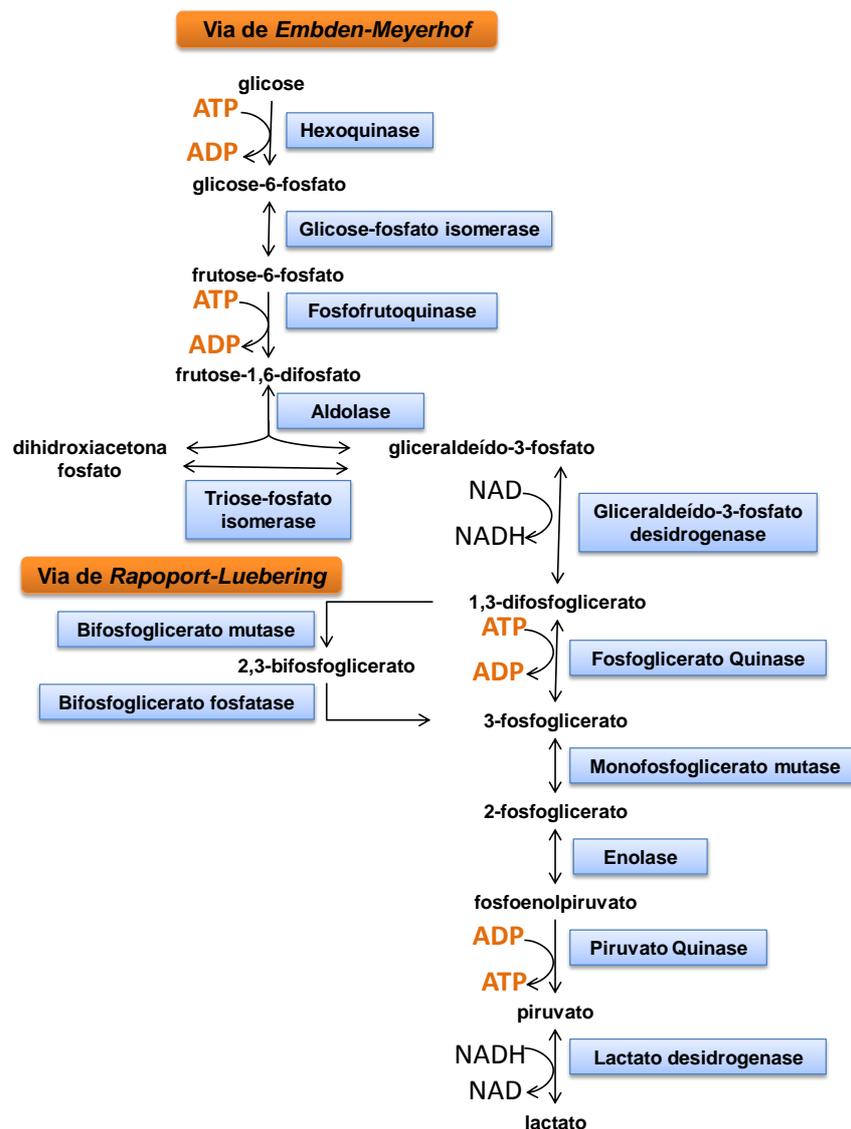
Figura 5. Representação esquemática da via das pentoses fosfato.



Fonte: Adaptado de MCMULLIN, 1999.

A via de **Rapoport-Luebering** é uma via alternativa entre o 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) e o 3-fosfoglicerato (3-PG), que apesar de diminuir o rendimento de produção de ATP, gera o 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), um metabólito essencial ao mecanismo de liberação de oxigênio que está fixado à 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 de **Embden-Meyerhof** (Figura 6). Estima-se que em condições de estresse oxidativo até cerca de 90% da glicose consumida é metabolizada pela via de oxidação das pentoses, em resposta ao estresse (RAPOPORT et al., 1976; LEE, 1999).

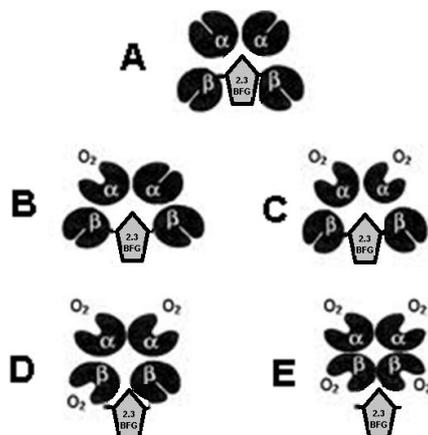
Figura 6. Representação esquemática da via glicolítica principal do metabolismo energético eritrocitário (via de *Embden-Meyerhof*) e do desvio de *Rapoport-Luebering*, redutor de 2,3-BPG.



Fonte: Adaptado de WIJI, et al. 2012.

O 2,3-BPG, proveniente da via de ***Rapoport-Luebering***, 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 7) (MULQUINEY, 1999; WIBACK, 2002).

Figura 7. Representação esquemática da sequência de estágios da oxigenação da hemoglobina. (A) Hb desoxigenada; (B) e (C) fixação de O₂ por globinas alfa; (D) e (E) fixação de O₂ por globinas e deslocamento de 2,3-BPG, representado pela seta cinza.



Fonte: Adaptado de <http://hemoglobinopatias.com.br/fisiologia-da-oxigenacao/>.

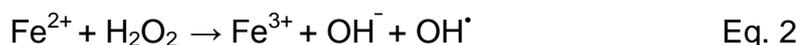
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO NOS ERITRÓCITOS HUMANOS

De um modo geral, 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 (H₂O₂), o ânion radical superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (HO[•]), os radicais peroxila (RO₂[•]), além do óxido nítrico (NO) e o oxigênio singlete (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

As ROS são formadas principalmente a partir da redução do oxigênio à água (Eq.1). Nesta via, há a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promovendo o aparecimento do O₂^{•-}, H₂O₂ e HO[•], intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular, conforme o esquema apresentado na equação abaixo (HEBBEL et al., 1982; LUTZ & BOGDANOVA, 2013):



A dismutação do O₂ gera quantidades excessivas de H₂O₂. O principal problema é que, enquanto o O₂^{•-} precisa passar pelos canais iônicos, o H₂O₂ pode atravessar a membrana com a mesma facilidade da água e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro da Hb, origina o HO[•], como descrito pela reação de Fenton (Eq. 2) (HEBBEL et al., 1982; NAOUM, 1996; LIMA & ABDALLA, 2001):



E o OH^\bullet , 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 outra molécula (exemplos: lipídeos e proteínas) (NEPOMUCENO et al., 1997; TEDESCO et al., 2000; LIMA & ABDALLA, 2001).

Normalmente, o estresse oxidativo acontece principalmente devido ao desequilíbrio entre a produção desses radicais livres e sua remoção por agentes antioxidantes. O sangue humano está permanentemente exposto ao estresse oxidativo e, este é um fator importante no envelhecimento eritrocitário (LEWIN & POPOV, 1994; RIFKIND & NAGABABU, 2013). A susceptibilidade à formação de ROS dos eritrócitos é grande, uma vez que, eles são células aeróbicas transportadoras de oxigênio. A principal fonte de radicais livres nestas células está associada à proteína carreadora de O_2 , a hemoglobina, que ao se auto-oxidar, pode produzir o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (CLEMENS & WALER, 1987; ÇIMEN et al., 2008). Esta reação é acompanhada da oxidação da Hb para MetHb (ÇIMEN et al., 2008). A acumulação gradual de hemoglobinas oxidadas ocorre com o envelhecimento eritrocitário (RIFKIND & NAGABABU, 2013). De um modo geral, o estresse oxidativo afeta a membrana plasmática eritrocitária com o desenvolvimento da peroxidação lipídica, oxidação e inativação de proteínas [ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) e/ou as pontes dissulfeto (-SS-)] (TEDESCO et al., 2000; ÇIMEN et al., 2008).

Se sob as condições normais os eritrócitos já são susceptíveis à formação de ROS, sob as condições de armazenamento (estocagem na presença de soluções preservantes, refrigerados a $1 - 6^\circ\text{C}$ de 35 a 42 dias), ocorre o aumento dos fatores que contribuem para o estresse oxidativo. Dentre outros aspectos, ao longo da estocagem, os eritrócitos enfrentam uma rápida queda da taxa glicolítica e passam por um acúmulo de produtos finais da glicólise. Estudos demonstram que em condições normais ao longo do armazenamento, há um acúmulo de ROS e de produtos da peroxidação, aumento dos níveis de malonaldeído (MDA), produtos inflamatórios e carboxilação de proteínas (GEVI et al., 2012; D'ALESSANDRO et al., 2012). Estes processos oxidativos aumentados estão relacionados às lesões de estoque verificadas nos eritrócitos armazenados (NIKI et al., 1988; BOSMAN et al.,

2008), havendo indícios de que eles aceleraram o envelhecimento celular (BOSMAN et al., 2008).

3.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NATURAL DO SANGUE

A exposição permanente do sangue ao estresse oxidativo requer uma capacidade antioxidante eficaz (MOHANTY et al., 2014). Em condições de equilíbrio nos eritrócitos, quando o nível de oxidação ultrapassa o limite aceitável, lança-se mão de moléculas antioxidantes que limitam esse estresse oxidativo. Essas moléculas antioxidantes atuando minimizam os danos causados a macromoléculas, pois combatem os radicais livres presentes no microambiente, antes mesmo que estes possam causar uma lesão, ou até mesmo inibindo a produção dos mesmos (MOHANTY et al., 2014). 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).

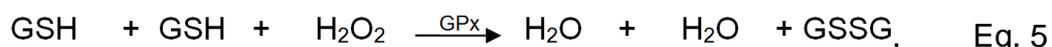
No sangue há dois sistemas antioxidantes classificados em: enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio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



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



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



sendo, a GSSG a glutaciona oxidada (DURAK, et al., 2001).

O sistema antioxidante não enzimático consiste dentre outros, na GSH, principal antioxidante intracelular, na vitamina E, a qual atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica principalmente dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas, e na vitamina C, a qual atua diretamente como antioxidante sobre ROS no ambiente aquoso, impedindo a iniciação da peroxidação

lipídica e oxidação proteica, 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 β -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 glutathione agem predominantemente no meio intracelular, enquanto que o sistema não enzimático predomina no meio extracelular, no plasma, evidenciando o importante papel desse meio na prevenção do estresse oxidativo dos eritrócitos (VASCONCELOS et al., 2007).

3.8 VITAMINAS E e C

A atividade antioxidante da vitamina E é eficaz para inibir a formação de radicais livres, minimizando a peroxidação lipídica em vários sistemas biológicos diferentes (ALDANA et al., 2001; GIRAY et al., 2001; KALENDER et al., 2005; ERASLAN et al., 2007). Sendo esta vitamina lipofílica, normalmente interage com as membranas biológicas, nas quais atuam bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica. Ela intercepta na formação do radical peroxila, resultando na formação do radical tocoferila (BUETTNER, 1993; GAETKE & CHOW, 2003).

Por outro lado, a vitamina C, hidrofílica, cuja forma ativa é o ascorbato, é um antioxidante natural presente no plasma sanguíneo, que evita o aumento da produção de radicais livres, a fim de minimizar os danos oxidativos nos vários componentes celulares e teciduais (SIES et al., 1992). Ela pode atuar nas membranas celulares diretamente, impedindo o início da oxidação, e indiretamente na peroxidação lipídica, por regenerar a vitamina E (HALLIWELL, 2014).

As vitaminas E e C têm recebido atenção na hematologia e na hemoterapia. Estudos com suplementação de vitaminas C e E a pacientes e doadores, estudos *in vitro* com eritrócitos submetidos a agentes oxidantes e tratados com essas vitaminas, e a adição de vitamina C a concentrados de hemácias têm demonstrado potencial para a redução do estresse oxidativo e apontam essas vitaminas como alternativas ao aprimoramento de procedimentos nessas áreas (KNIGHT et al., 1993; RACKEL et al., 1997; PFEIFER et al., 2008; SUN et al., 2012; EROGLU et al., 2013; MADHIKARMI & MURTHY, 2014).

A literatura demonstra que, pacientes com β -talassemia intermediária, geralmente apresentam níveis plasmáticos de ROS e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estatisticamente diferentes em comparação com pessoas saudáveis, no entanto quando suplementados com vitamina E, apresentam uma redução significativa desses níveis. Já os níveis de GSH elevam-se significativamente, ou seja, a vitamina E reduz o estresse oxidativo nesses pacientes (PFEIFER et al., 2008). Também foi demonstrado que pessoas de meia idade e idosos (ca. 40 – 65 anos), que naturalmente estão mais sujeitos a níveis elevados de estresse oxidativo, quando suplementados com vitamina E reduziram os níveis plasmáticos de ROS, hemólise, bem como melhoraram a fluidez da bicamada lipídica (SUN et al., 2012).

Quando a suplementação com vitamina E é associada à vitamina C é possível observar ações antioxidantes. Pacientes anêmicos por deficiência de ferro, submetidos a uma suplementação com vitamina E e C, apresentaram redução do estresse oxidativo, além de um aumento nos níveis de vitaminas antioxidantes, sugerindo que a suplementação com essas vitaminas poderiam prevenir os danos oxidativos nesses pacientes (MADHIKARMI & MURTHY, 2014).

Na área da hemoterapia, a suplementação oral com as vitaminas E e C, para doadores de sangue, diminuiu significativamente a peroxidação lipídica tanto em CHs irradiados, quanto nos CHs não irradiados (KNIGHT et. al., 1993), supondo-se que isso pode melhorar parâmetros eritrocitários importantes relacionados aos danos promovidos pelos radicais livres durante o armazenamento. Sugere-se, portanto, que a suplementação oral com essas vitaminas antioxidantes pode expandir a longevidade e melhorar a viabilidade dos glóbulos vermelhos armazenados (KNIGHT et. al., 1993).

Estudos com vitamina C sozinha, com o objetivo de encontrar alternativas para aprimorar o armazenamento de CHs CPD/AS-5, demonstraram que a adição desta pode melhorar a fragilidade mecânica da membrana e diminuir a hemólise no final do período de armazenamento (RAVAL, 2013). Ademais, a adição desta vitamina juntamente com a N-acetil cisteína (que atua indiretamente como antioxidante, por promover a biossíntese de glutatona no organismo) em CHs estocados, caracterizados pelo acúmulo de malonaldeído e pela hemólise, foi eficaz também na diminuição do estresse oxidativo (PALLOTA et al., 2014).

Outros estudos ainda evidenciam que os polifosfatos protegem contra a reação de Fenton, na qual o H_2O_2 interage com íons metálicos como Fe^{2+} e gera o radical hidroxila (HO^\cdot), considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos. A reação de Fenton é um dos principais processos oxidativos eritrocitários devido ao ferro da hemoglobina (RICHTER & FISCHER, 2006; RACHMILOVICH-CALIS, et al., 2011).

Fazendo uma analogia dos íons fosfatos dos polifosfatos com os dos ATP e ADP, pode-se também evidenciar mecanismos antioxidantes. Isto é demonstrado nos estudos com sangue total sob condições de estresse oxidativo, nos quais os íons fosfatos dos nucleotídeos, ATP e ADP, são os responsáveis por atividade antioxidante, inibindo a formação do radical 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO-OH) (SWENNEN et al., 2006; RICHTER & FISCHER, 2003). Os polifosfatos também possuem uma atividade tamponante, sendo capaz de neutralizar álcalis no interior das células (KORNBERG et al., 1999), outra característica que poderia beneficiar os CHs que em geral sofrem redução do pH ao longo do período de seu armazenamento.

Os grânulos densos de plaquetas ativadas liberam polifosfato (RUIZ, et al., 2004). Estudos demonstraram que o polifosfato liberado pelas plaquetas tem atividade pró-trombótica e pró-inflamatória (SMITH, et al, 2006). Contudo, o efeito do polifosfato sobre a coagulação é dependente da concentração e do tamanho da cadeia, ocorrendo em cadeias a partir de 25 fosfatos monoméricos condensados, e sendo mais significativo em cadeias maiores que 75 fosfatos. Os de tamanho entre 60 e 100 unidades aceleram a ativação mediada pela trombina e pelo Fator V, enquanto que os de maior tamanho medeiam a coagulação por meio da ativação de contato com o Fator XII e aumenta a polimerização da fibrina (SMITH et al, 2006).

Os polifosfatos são também utilizados como conservantes pela indústria farmacêutica e alimentícia, e atuam retardando a oxidação de gorduras insaturadas, inibindo o crescimento microbiano e promovendo a maturação de alimentos cárneos (DALMAS, 2004). Além disso, foram sugeridos como fonte alternativa de fósforo em formulações para nutrição parenteral (PEREIRA, 2004). Destacam-se, portanto, por seu potencial antioxidante sobre proteínas, bactericida, propriedade tamponante, fonte de fósforo, ação quelante sobre íons bivalentes, e estabilizante de um modo geral (HOURANT, 2004; KIM, 2004; GRAY & JACOB, 2015).

Estudos sobre administração parenteral demonstram que o polifosfato sofre hidrólise na circulação sanguínea e sua excreção ocorre principalmente por via urinária. Obedecendo-se os limites de concentração corpórea indicados (70 mg/Kg), o uso de polifosfatos em alimentos e produtos farmacêuticos não oferece riscos significativos à saúde (OMS, 1974; WEINER et al., 2001).

3.10 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 retirada, perde-se não somente grande parte do fornecimento energético, como também das substâncias atuantes nos mecanismos antioxidativos presentes neste. O CPD-SAGM (Citrato Fosfato Dextrose – Salina Adenina Guanina e Manitol) é a solução preservante mais utilizada nos bancos de sangue atualmente. Esta solução permite o armazenamento de CH por até 42 dias (GRIMES, 1980; CERELLI et al., 2015).

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 (como mostra a Figura 9 A) em função da diferença de tamanho e densidade dos seus elementos. O concentrado de hemácias por ser a porção mais densa, deposita-se no fundo da bolsa de sangue centrifugada (Figura 9 B). Na técnica convencional, a mais utilizada nos bancos de sangue, o plasma rico em plaquetas é extraído e novamente centrifugado numa rotação mais elevada para a obtenção do concentrado de plaquetas e plasma pobre em plaquetas, ou plasma fresco (Figura 9 C). 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 (CAIRUTAS, 1985; CERELLI et al., 2015). Obtidos os CHs, estes são armazenados em câmara fria a cerca de 4 °C por um tempo variável (35 – 42 dias), de acordo com a solução empregada (SHI & NESS, 1999; CERELLI, et al., 2015).

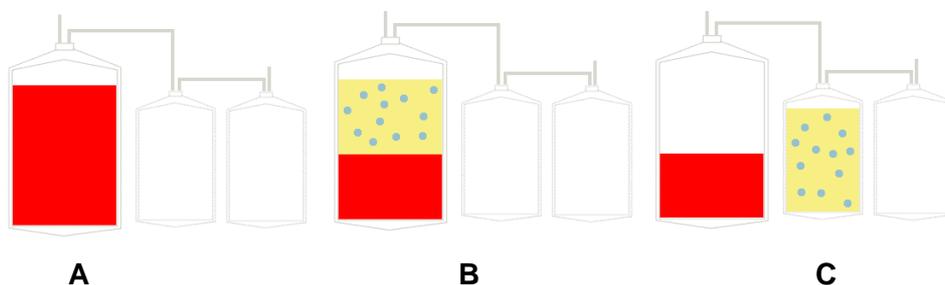
A decisão de transfundir eritrócitos deve ser baseada em uma avaliação dos riscos da anemia contra os riscos da transfusão (POLK et al., 1995). A transfusão de CHs é indicada no tratamento de casos de hipovolemia e anemia. Como na maioria

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).

A divisão do sangue em hemocomponentes tem limitado o uso de sangue total para 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, que possam repor a volemia (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 para minimizar a possibilidade de ocorrência de reações pós transfusionais. As reações clínicas adversas do uso do CH são: reações febris, urticária e outras reações cutâneas, aloimunização, reações hemolíticas, injúria pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI), contaminação por agentes biológicos, entre outras (KLEIN et al., 2007).

Figura 9. Ilustração do processo convencional de obtenção de concentrados de hemácias (CH) a partir do sangue total (ST). (A) O ST é coletado. (B) Após uma centrifugação, é possível separar as fases de hemocomponentes. (C) Extração do sobrenadante, o plasma rico em plaquetas e obtenção de concentrado de hemácias.



Fonte: o autor.

As bolsas utilizadas na coleta e obtenção dos hemocomponentes são confeccionadas em policloreto de vinil (PVC) e plastificantes que permitem troca

gasosa entre o interior da bolsa e o meio externo (PIERRE, 1981; CERELLI, et al., 2015).

3.11 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, com 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 et al., 1943). A primeira solução preservante padrão continha ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose e era conhecida por ACD, permitindo a preservação dos eritrócitos até 21 dias (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. Assim, hemácias estocadas em CPD (solução citrato de sódio-fosfato-dextrose) são viáveis por até 28 dias (MOORE et al., 1987). Estas soluções eram utilizadas para a obtenção e preservação do Sangue Total (ST), entretanto, mais tarde, com a separação do ST em hemocomponentes, passou-se a armazenar os eritrócitos em CHs, com hematócrito entre 50 e 80% e, dessa forma, outras exigências foram estabelecidas (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

Adicionou-se então a adenina à composição da solução, que se mostrou benéfico à manutenção dos níveis de ATP. Assim, as soluções do tipo CPDA₁ (solução citrato de sódio-fosfato-dextrose-adenina) aumentaram em até 7 dias a durabilidade celular, se comparadas com CPD. Dessa forma, foi possível armazenar

CH ao longo de 35 dias com essa solução e, por isso, é muito utilizada nos serviços de hemoterapia (GIBSON, 1957; GREENWALT, 1990; NAKAO, 1960).

A solução preservante mais utilizada, o CPD-SAGM, (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 de sódio 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. Neste trabalho foram avaliados CHs até o 35º dia de estocagem, quando se constata maior evidência da perda de propriedades eritrocitárias.

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 1 e inclui volume, hematócrito, teor de hemoglobina, grau de hemólise e teste microbiológico (RESOLUÇÃO RDC nº 57, 2010).

Tabela 1. Especificações para a garantia da qualidade das unidades de concentrados de eritrócitos do ministério da saúde de acordo com a RDC nº 57 de 2010.

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

3.12 METABOLISMO ERITROCITÁRIO E LESÕES DE ESTOQUE

Ao longo do armazenamento, os eritrócitos sofrem algumas alterações, que podem eventualmente gerar danos irreversíveis e reduzir a sobrevivência pós-transfusional (SPT), mesmo a 4 °C (ALMIZRAQ et al., 2013). Essas células quando estocadas se encontram em condições bastante diferentes da circulação sanguínea normal. Sendo assim, o metabolismo 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; ALMIZRAQ et al., 2013).

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).

Tabela 2. Alterações observadas em CHs antes e após a estocagem prolongada por 42 dias.

Constituintes	Pré	Pós
pH	6,8	6,4
ATP (mmol/g Hb)	4,1	2,9
2,3-BPG (mmol/g Hb)	9,0	0,3
K ⁺ (mEq/L)	2,4	63,0
Hb livre (mg/dL)	9,0	372,0
Hemólise (%)	0,0	0,61

Fonte: Adaptado de ZUBAIR, 2010.

Para manter a forma discoide e a integridade da membrana, o eritrócito precisa de energia. E, por isso, a redução de ATP nas soluções preservantes ao final do período de estocagem contribui para a perda da morfologia desejável dos eritrócitos, os quais passam a apresentar diferentes formas, inclusive as de esferócitos. O esferócito tende a romper a membrana liberando o seu conteúdo no

meio e elevando a concentração de hemoglobina extracelular, num processo conhecido como hemólise (LEONART, 1994; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). 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 Na^+/K^+ , 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 (Ca^{2+}), tendo como consequência a desestabilização da estrutura fosfolipídica da membrana celular (WOLFE, 1985; GRAZZINI & VAGLIO, 2012).

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 et al., 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 se fixa preferencialmente à hemoglobina não ligada do que ao 2,3-BPG. Com isso há uma diminuição na quantidade de ATP disponível para as bombas de membrana e se mantém a via energética principal (VALTIS, 1954; DERN, 1967; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). 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 et al., 2010; GRAZZINI & VAGLIO, 2012).

Essas lesões de estocagem causam a redução do rendimento transfusional. E, por isso, a transfusão de eritrócitos armazenados por um longo período de estocagem está associada a um aumento da morbidade e mortalidade de pacientes transfundidos e em pós-operatório (KOCH et al., 2008; AUBRON et al., 2012; WANG et al., 2012; RELUBRE & VINCENT, 2013; SOLOMON et al., 2013).

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, pois grande parte desse sistema é perdida com a extração do plasma, deixando os eritrócitos mais vulneráveis aos ataques das ROS. Alguns autores afirmam que o estresse oxidativo é acompanhado de desestabilização da membrana celular resultando numa redução da deformabilidade da hemácia, aumento da fragilidade osmótica e predisposição para mudanças de forma e fragmentação celular (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: (i) a diminuição da deformabilidade celular, (ii) o aumento do volume celular, (iii) a perda da morfologia bicôncava, (iv) a hemólise e até mesmo (v) a diminuição do potencial zeta (SILVA et al., 2012). A redução da capacidade das hemácias se deformarem e as tendências a uma maior agregação celular são consequências da perda dessas propriedades eritrocitárias citadas anteriormente (SILVA et al., 2012, LACROIX & TUCCI, 2011; EDGREEN et al., 2010; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). A diminuição da deformabilidade ao longo do período de estocagem pode reduzir o rendimento transfusional e estudos prévios demonstraram que essa propriedade nos eritrócitos estocados independe do sexo do doador (DALY et al., 2014). Já a diminuição do potencial zeta está relacionada a uma maior agregabilidade intercelular (SILVA et al., 2012). Estudos desse tipo mantém ativa a discussão sobre o impacto clínico das lesões de armazenamento nos procedimentos transfusionais (ZUBAIR, 2010; LEE & GLADWIN, 2010; RINALDUCCI et al., 2011; KIM-SHAPIRO; LEE; GRAZZINI & VAGLIO, 2012). Por isso, trabalhos que contribuam para a diminuição das lesões de estocagem são importantes na hemoterapia, buscando estabelecer alternativas para melhorar a conservação das propriedades fundamentais eritrocitárias ao longo do armazenamento.

3.13 NANOEMULSÕES

Devido à natureza lipossolúvel da vitamina E, a mistura deste composto em CHs se dará através do processo de emulsificação, por causa da grande quantidade de água presente no meio. Para isso, faz-se necessário o emprego de tensoativos biocompatíveis como, por exemplo, fosfolipídeos e polisorbatos em quantidades adequadas para promover a emulsificação sem sua desestabilização após a mistura

no CH. Como consequência da adição de tensoativos em quantidades significativas, o sistema poderá formar emulsões de dimensões nanométricas (YILMAZ & BORCHERT, 2006; MCCLEMENTS, 2012).

As nanoemulsões, como são chamadas, são sistemas constituídos de glóbulos de tamanho reduzido, com raio que varia entre 50 e 200 nm, aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas das emulsões, que é em torno de 1 – 10 μm (LANGEVIN, 1988; KAWAKAMI et al., 2002; FORMARIZ et al., 2006; SILVA et al., 2010). Devido à capacidade de incorporar grande quantidade de substâncias lipofílicas, para nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A), tornam-se importantes veículos de compostos apolares na sua face interna quando aplicada a organismos vivos (HO et al., 1996; KAWAKAMI et al., 2002; FORMARIZ et al., 2006; SILVA et al., 2010). Esses sistemas atuam na solubilização e modificam a biodisponibilidade das moléculas de interesse, por permitir a liberação por tempo relativamente prolongado, além de viabilizar a aplicação de compostos por vias de administração que seriam inviáveis caso não houvesse a nanoemulsificação, dentre essas, as vias parenterais (BAKER et al., 1984; CONSTANTINIDES et al., 1995; TENJARLA et al., 1999; KAWAKAMI et al., 2002; FORMARIZ et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Descoberta por Hoar e Shulman, nanoemulsão é um sistema termodinamicamente estável composto por 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., 2008). Assim, a formulação de nanoemulsões envolve a combinação de pelo menos três componentes: óleo, água e tensoativo, que diminui a tensão superficial (ABOOFAZELI et al., 1993; CONSTANTINIDES et al., 2008). As nanoemulsões podem ser estabilizadas tanto por um único tensoativo, como por uma mistura de tensoativos, além de coadjuvantes. Mas, apesar dos tensoativos serem úteis na formulação de nanoemulsões, deve-se sempre levar em consideração alguns riscos que eles podem causar às células. Por isso, alguns experimentos têm utilizado hemácias como modelo celular para mensurar a toxicidade de alguns tensoativos empregados nas formulações. Estes estudos apontam os polisorbatos (também chamados de *Tweens*) por serem tensoativos de baixa toxicidade, não provocarem

hemólise e, por estes motivos, tornam-se ideais para aplicações em eritrócitos (APARICIO, et al., 2005).

Diferentes métodos de preparo são empregados no desenvolvimento de nanoemulsões. Para administração parenteral, apenas um número restrito de adjuvantes é aceito. Isso é importante devido aos rigorosos requisitos desta via, em especial, relacionados à biocompatibilidade e à baixa toxicidade (VANDAMME & ANTON, 2010). Uma formulação adequada deve sempre considerar a integridade dos componentes, além de incorporar bem os componentes da mistura e permanecer estável em função do tempo (CONSTANTINIDES et al., 2008).

A formação de sistemas nanoemulsionados baseia-se 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 (BAGWE et al., 2001).

A caracterização das nanoemulsões pode ser realizada por diversas técnicas. Dentre as técnicas mais difundidas destaca-se o espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) que é uma técnica para a medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas, com tamanho menor que 1 μm . Após essas gotículas serem iluminadas por um feixe de 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 é baseada no seu tamanho (ROSSETI, 2006). Assim, obtêm-se informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas, permitindo o cálculo do tamanho destas através de relações empíricas adequadas.

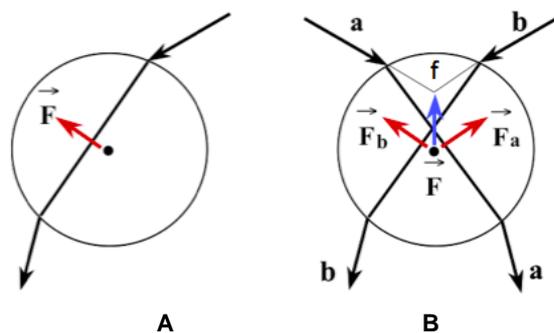
Para aplicações intravenosas são necessárias nanoemulsões do tipo óleo em água, pois as gotículas podem ser facilmente diluídas e difundidas pelos fluidos fisiológicos, tais como o sangue. Além disso, esses sistemas devem ser estéreis e apirogênicos, ou seja, livres de pirogênios (substâncias que causam febre, oriundas de bactérias, fungos e vírus), sejam isotônicos e atóxicos que correspondem a cuidados imprescindíveis quando se deseja a aplicação de qualquer sistema terapêutico através dessa via de administração (MCCLEMENTS, 2012; YILMAZ E BORCHERT, 2006).

3.14 PINÇAS ÓPTICAS COMO FERRAMENTA DE MEDIDA DE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE CÉLULAS

A manipulação de células individuais é muito importante para estudos que investigam propriedades biofísicas de eritrócitos humanos, podendo revelar relações entre processos biológicos e aspectos mecânicos e elétricos das células. A pinça óptica é capaz de manipular partículas com dimensões entre 50 nm a 50 μ m aproximadamente e, tem sido amplamente utilizada para estudos com células individuais e biomoléculas. Ela consiste em um laser no infravermelho próximo, fortemente focado através de uma objetiva de imersão com magnificação de 100 x ($NA = 1.25$) de um microscópio equipado com uma câmera e uma platina motorizada, controlada por um computador (ASHKIN et al., 1986; FONTES, 2011). Por ser no infravermelho próximo, essa ferramenta consegue capturar uma célula sem causar danos (SYLVIE, 1999; FONTES, 2011) e essa captura acontece devido à transferência de momento de fóton para a célula.

Para explicar a dinâmica de captura da célula, é necessário conceber 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} como ilustra a Figura 10 A. Os raios a e b (Figura 10 B) se encontrariam no foco f se não houvesse o objeto. O desvio desses raios produz os recuos na direção \mathbf{F}_a e \mathbf{F}_b , e a combinação de ambos leva ao recuo na direção \mathbf{F} , como mostra a Figura 10 B. Desta forma, o que se observa é que o recuo \mathbf{F} tende a obrigar o centro do objeto a coincidir com o foco do laser \mathbf{F} , o que faz com que o centro do objeto se mantenha não só no foco do laser, como também acompanhando o laser. Dessa forma, quando se movimenta o laser, o objeto acompanha o seu movimento tridimensionalmente (FONTES, 1999; BRANDÃO et al., 2003; FONTES, 2005).

Figura 10. Representação esquemática do aprisionamento através da pinça óptica, considerando apenas dois raios de luz, mostrando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la.



Fonte: FONTES,1999.

A deformabilidade é uma propriedade mecânica fundamental para as hemácias cumprirem bem sua função ao atravessar capilares e sinusóides esplênicos com diâmetros menores que até 50% de seu tamanho (o tamanho médio das hemácias é de 6 a 8 μm). A deformabilidade eritrocitária é resultado da combinação da razão da área e volume celular, viscosidade interna, propriedades reológicas da membrana (bicamada lipídica e citoesqueleto), tais como suas propriedades elásticas e viscosas (FONTES, 2011). O potencial zeta é outra característica que merece destaque, porque mantém as hemácias afastadas não só uma das outras, impedindo assim a agregação celular, como também evita a adesão dessas células às superfícies endoteliais. Esse potencial repulsivo é causado por cargas elétricas na membrana das hemácias devido à presença do ácido siálico das glicoproteínas, principalmente a glicoforina A (SILVA et al., 2012).

A pinça óptica é uma ferramenta de medida capaz de determinar propriedades biofísicas das hemácias apresentando algumas vantagens, como, por exemplo: (1) analisa a célula como um todo, considerando a contribuição de todos os constituintes celulares; (2) possibilita uma análise individual, não fornecendo somente valores médios, isso permite, por exemplo, que a assinatura de uma doença seja observada; e, (3) 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; DIMITRAKOPOULOS, 2012).

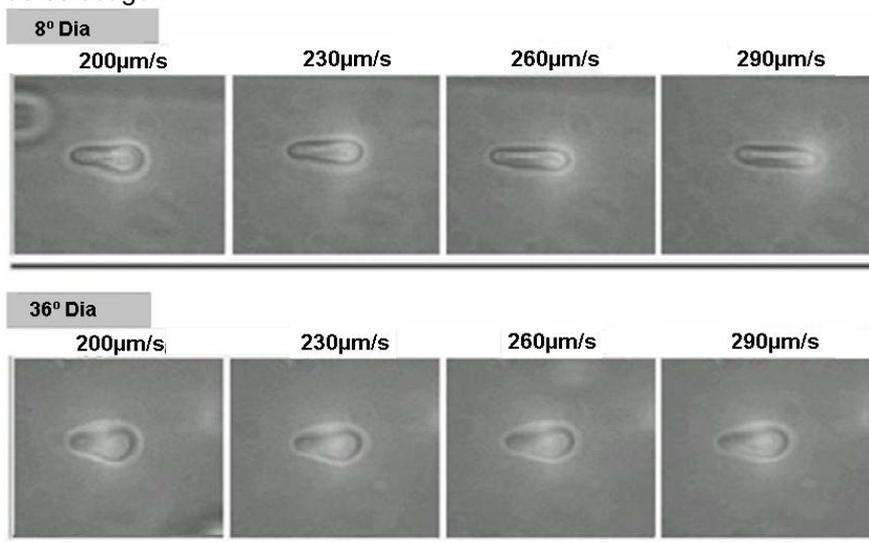
A avaliação das propriedades mecânicas e elétricas eritrocitárias utilizando pinças ópticas tem sido alvo de estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e por outros (FONTES et al., 2008; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2017). As

metodologias de avaliação dessas propriedades com essa ferramenta já foram estabelecidas pelo nosso grupo (BARJAS-CASTRO et al., 2002; BRANDÃO et al., 2003; SILVA et al., 2012). Em alguns destes estudos, por exemplo, observou-se que hemácias de pacientes com anemia falciforme são mais rígidas que hemácias de indivíduos normais. Além disso, foi identificado que há uma melhora da deformabilidade nas hemácias desses pacientes à medida que são medicados com a hidroxiuréia (BRANDÃO et al., 2003). Em outro estudo, foram realizadas mensurações da elasticidade de eritrócitos provenientes de CHs coletados em CPDA₁, irradiados com uma dose de 25 Gray e de CHs não irradiados (controle). Neste estudo, verificou-se que os CHs irradiados apresentaram valores médios de elasticidade (*dina/cm*) maiores a partir do 21º dia de estocagem (14º, 21º, 28º dias, $4,3 \times 10^{-4}$; $35,4 \times 10^{-4}$; $140,0 \times 10^{-4}$, respectivamente) quando comparados aos valores de CHs não irradiados (controle) (14º, 21º, 28º dias, $3,4 \times 10^{-4}$; $3,7 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-3}$, respectivamente), sugerindo que os eritrócitos de CHs irradiados diminuem significativamente a sua deformabilidade em relação aos controles (BARJAS-CASTRO et al., 2002). Notar que a grandeza mensurada é a constante elástica denominada por nós por “elasticidade”. A constante elástica reflete a capacidade da célula resistir à deformação. Assim, a determinação de valores para a elasticidade é uma forma de se inferir sobre a deformabilidade das hemácias. Quanto maior o valor da constante elástica mais difícil é deformar a célula para uma dada força aplicada e menos deformável ela é portanto.

Pode-se também citar um trabalho do nosso grupo como um exemplo de aplicação da pinça óptica na mensuração do potencial zeta e da elasticidade para hemácias armazenadas (SILVA et al., 2012). Neste estudo, essas propriedades foram avaliadas em eritrócitos de CHs leucorreduzidos e não leucorreduzidos coletados em CPD-SAGM. O trabalho mostrou que o potencial zeta dos eritrócitos diminuiu cerca de 42% até cerca de 35 dias de armazenamento, não havendo diferenças significativas entre os eritrócitos provindos de CHs não leucorreduzidos e os de CHs leucorreduzidos. Já os resultados para a elasticidade mostraram que os eritrócitos eram cerca de 134% menos deformáveis ao final do período de armazenamento de CHs não leucorreduzidos (Figura 11). A associação das medidas de potencial zeta e elasticidade indicaram que há uma inter-relação entre esses processos e esta relação fica mais evidente quando se confronta estes

resultados com os estudos realizados por Godin e Caprani, os quais demonstraram que eritrócitos tratados com uma enzima que remove o ácido siálico da membrana, a neuraminidase, reduz a elasticidade eritrocitária (GODIM & CAPRANI, 1997). Estes estudos sugerem que isso ocorre por conta de uma conexão física entre as proteínas: banda 3, que está associada ao comportamento elástico, e a glicoforina A, que comporta a grande maioria do ácido siálico, o qual é responsável pelo potencial zeta. Além da elasticidade e do potencial zeta, nesse mesmo trabalho foi quantificada a produção de ROS ao longo do armazenamento desses CHs através do DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato), um marcador capaz de verificar a liberação de ROS em células (SILVA et al., 2012). A marcação com o DCFH-DA baseia-se na capacidade deste composto atravessar a membrana celular, e quando já presente no citoplasma sofrer hidrólise por esterases celulares formando o composto DCFH, o qual é oxidado na presença de ROS, gerando o composto fluorescente, diclorofluoresceína (DCF) (WANG e JOSEPH, 1999; GRASSO et al. 2003). Com isso, foi possível observar uma conexão entre o decaimento do potencial zeta e a produção de ROS, sendo o decaimento do potencial zeta mais significativo durante a primeira semana de estocagem (30%), com um respectivo aumento de cerca de 60% na produção de ROS.

Figura 11. Diferenças entre as deformações eritrocitárias resultantes das velocidades aplicadas no 8º e no 36º dias de estocagem.



Fonte: Silva et al. 2012.

Na técnica utilizando a pinça óptica para mensuração da elasticidade, os eritrócitos do CH são diluídos em soro sanguíneo em uma câmara de Neubauer. Os eritrócitos são então capturados pelo laser e arrastados contra o líquido com velocidades progressivas constantes, assim como pode se observar na Figura 11. Quando os eritrócitos são arrastados no plasma, eles 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 constante elástica, ou simplesmente elasticidade (BRANDÃO et al., 2003). Como essas forças estão em equilíbrio, têm-se:

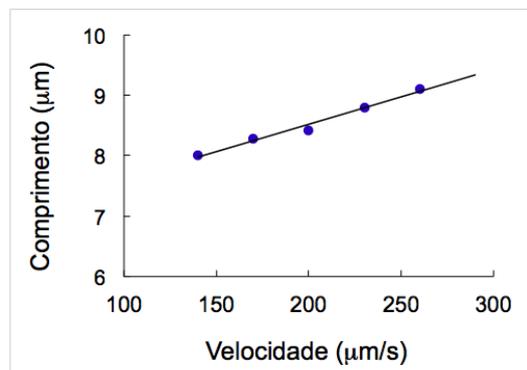
$$L = L_0 + \left(\frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right) v \quad \text{Eq. 6}$$

Assim, é possível medir o comprimento L do eritrócito em função da velocidade. E como a deformação (L) é proporcional à velocidade, α é o coeficiente angular da reta:

$$\alpha = \left(\frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

Determinando-se o coeficiente angular e conhecendo L_0 (tamanho de repouso), Z_{eq} (distância do eritrócito até o fundo da lâmina e lamínula), e η (viscosidade do fluido), determina-se a elasticidade μ , um exemplo pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12. Gráfico representativo da elongação da hemácia em função da velocidade de arraste.



Fonte: o autor.

Dessa forma, sendo a deformabilidade, e de certa forma também o potencial zeta, propriedades importantes para o desempenho eficaz da função dos eritrócitos, já que a sua perda ou diminuição pode interferir no rendimento transfusional, a avaliação da elasticidade e/ou da carga da membrana eritrocitária são formas de se monitorar as lesões nas hemácias, sendo então a pinça óptica é uma ferramenta útil para esse fim.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. *et al.* Dimethoate-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes and the Protective Effect of Vitamins C and E In Vitro. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

ABOOFAZELI, R.; LAWRENCE, M. J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsion. **Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate**. v.93, n.1-3, p.161-175, 1993.

ALDANA, L. *et al.* -Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin Lourdes. **Toxicology Letters**, v. 125, n. 1–3, p. 107–116, 2001.

ALMIZRAQ, R. *et al.* Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. **Transfusion**, v. 53, n. 10, p. 2258–2267, 2013.

ANTONELOU, M. H. *et al.* Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. **Transfusion**, v. 50, n. 2, p. 376–389, 2010.

APARICIO, R. M. *et al.* In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 1063–1067, 2005.

ASHKIN, A. *et al.* Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. **Optics Letters**, v. 11, n. 5, p. 288-290, 1986.

ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M. Internal cell manipulation using infrared laser traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 20, p. 7914–8, 1989.

ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. **Science**, v. 235, n. 4795, p. 1517-1520, 1987.

ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 375–391, 2000.

AUBRON, C. *et al.* Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2013.

BAGWE, R. P. *et al.* Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v.18, n.1, p. 77-140, 2001.

BAKER, R. C. *et al.* Investigations into the formation and characterization of microemulsions. II. Light scattering conductivity and viscosity studies of microemulsions. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 100, n. 2, p. 332–349, 1984.

BARJAS-CASTRO, M. L. *et al.* Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. **Transfusion**, v. 42, n. 9, p. 1196–1199, 2002.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, p. 23–164, 2003.

BOSMAN, G. J. C. G. M. *et al.* Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: Structural aspects and implications for transfusion. **Transfusion Medicine**, v. 18, n. 6, p. 335–347, 2008.

BOSS, D. *et al.* Spatially-resolved eigenmode decomposition of red blood cells membrane fluctuations questions the role of ATP in flickering. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 40667, 2012.

BRANDAO, M. M. *et al.* 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, p. 207–211, 2003.

BRANDAO, M. M. *et al.* Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 43, n. 3, p. 217-221, 2009.

BRIGELIUS-FLOHE, R. *et al.* The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 703–716, 2002.

BROWN, M. R. W.; KORNBERG, A. The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 6, p. 284–290, 2008.

BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of Dietary Vitamin-E on the Oxidative Stability and Quality of Pig Meat. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3122–3130, 1995.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

BURTON, G. W. *et al.* Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 669–684, 1998.

BUSTAMANTE, C.; BRYANT, Z.; SMITH, S. B. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. **Nature**, v. 421, p. 423–427, 2003.

CAIRUTAS, C. M. **Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico**. Ed. Universitária UFPE, p. 177-232, 1985.

CERELLI, E. *et al.* Effect of adhesive properties of buffy coat on the quality of blood components produced with Top & Top and Top & Bottom bags. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 2, p. 265–273, 2015.

PEREIRA, C. B. J. Estudo físico-químico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral. 2007.

CHAN, A C.; CHOW, C. K.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine** (New York, N.Y.), v. 222, n. 3, p. 274–282, 1999.

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

CHUI, J. S. W. *et al.* Diagnosis and Treatment - aetiology, diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v. 60, p. 496–500, 2005.

ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1–2, p. 1–11, 2008.

CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 45, n. 2–4, p. 251–268, 1987.

CLUITMANS, J. C. A. *et al.* Alterations in red blood cell deformability during storage: a microfluidic approach. **BioMed Research International**, v. 2014, 764268, 2014.

CONSTANTINIDES, P. P. *et al.* Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharm Res**, v. 11, n. 10, p. 1385–1390, 1994.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 757–767, 2008.

CONSTANTINIDES, P. P.; YIV, S. H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 2, p. 225–234, 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. *et al.* Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: From metabolism to proteomics. **Haematologica**, v. 97, n. 1, p. 107–115, 2012.

DALY, A. *et al.* Effect of blood bank storage on the rheological properties of male and female donor red blood cells. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 56, n. 4, p. 337-345, 2014.

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**, v. 69, n. 6, p. 968-978, 1967.

DHOLAKIA, K.; SPALDING, G.; MACDONALD, M. Optical tweezers: The next generation. **Physics World**, v. 15, n. 10, p. 31–35, 2002.

DIEZ-SILVA, M. *et al.* Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. **MRS bulletin**, v. 35, n. 05, p. 382-388, 2010.

DINU, C. Z. *et al.* Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly. **Soft Matter**, v. 5, n. 20, p. 3818–3822, 2009.

DURAK, I. *et al.* Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. **International Journal of Cardiology**, v. 77, n. 2–3, p. 293–297, 2001.

EDGREN, G. *et al.* Duration of red blood cell storage and survival of transfused patients (CME). **Transfusion**, v. 50, n. 6, p. 1185-1195, 2010.

ELGSAETER, A.; MIKKELSEN, A. Shapes and shape changes invitro in normal red blood cells. **Bio**, v. 1071, p. 273–290, 1991.

EMERSON, S. G. *et al.* Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver. **Blood**, v. 74, n. 1, p. 49-55, 1989.

ERASLAN, G. *et al.* Studies on antioxidant enzymes in mice exposed to pulsed electromagnetic fields. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 287–289, 2007.

EROĞLU, S. *et al.* Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 33–38, 2013.

FEO, C.; MOHANDAS, N. Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function. **Nature**, v. 265, n. 5590, p. 166–168, 1977.

FERRELL, J. E. Calcium does not mediate the shape change that follows atp depletion in human erythrocytes Introduction When human erythrocytes are depleted of their ATP , a dramatic shape change ensues whereby biconcave discocytes are transformed into iso- **Volumic Spicu**. v. 687, p. 321–328, 1982.

FÖLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F.. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB life**, v. 60, n. 10, p. 661-668, 2008.

FONTES, A. *et al.* Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. **Journal of Optics**, v. 13, n. 4, 044012, 2011.

FONTES, A. *et al.* Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. **Journal of biomedical optics**, v. 13, n. 1, p. 014001-014001-6, 2008.

FONTES, A. *et al.* Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers. **Optical Trapping And Optical Micromanipulation**, Vol. 5930, p.2975-2977, 2005.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 54–61, 2006.

FRIED, W.. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 9, p. 1007-1015, 2009.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 147–163, 2003.

GERBACIA, W.; ROSANO, H. L. Microemulsions: formation and stabilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 44, n. 2, p. 242-248, 1973.

GIBSON, J. G.; GREGORY, C. B.; BUTTON, L. N. Citrate-Phosphate-Dextrose Solution for Preservation of Human Blood: A Further Report. **Transfusion**, v.1, n.5, p. 280–287, 1961.

GIRAY, B.; GURBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. **Toxicol Lett**, v. 118, n. 3, p. 139–146, 2001.

GODIN, C.; CAPRANI, A.. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. **European Biophysics Journal**, v. 26, n. 2, p. 175-182, 1997.

GOV, N. S. Active elastic network: cytoskeleton of the red blood cell. **Physical Review E**, v. 75, n. 1, p. 011921, 2007.

GRATZER, Walter. Cell biology: more red than dead. **Nature**, 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, n. SUPPL. 2, p. 10–12, 2012.

GREENWALT, T. J.; SOSTOK, C. Zehner; DUMASWALA, U. J. Studies in Red Blood Cell Preservation 2. Comparison of Vesicle Formation, Morphology, and Membrane Lipids during Storage in AS-1 and CPDA-1. **Vox Sanguinis**, v. 58, n. 2, p. 90-93, 1990.

GRAY, M. J.; JAKOB, U.. Oxidative stress protection by polyphosphate—new roles for an old player. **Current opinion in microbiology**, v. 24, p. 1-6, 2015.

GRILLO-PUERTAS, M. *et al.* Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 72, 2014.

GRIMES, A. J. Human red cell metabolism. **Muscle & Nerve**. v. 4, n. 3, p.265-265, 1980.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. 1 Iron toxicity and oxygen radicals. **Bailliere's Clinical Haematology**, v. 2, n. 2, p. 195–256, 1989.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

HALLIWELL, B. Cell Culture, Oxidative Stress, and Antioxidants: Avoiding Pitfalls. **Biomedical Journal**, v. 37, p. 99–105, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HAMASAKI, N.; YAMAMOTO, M. Red blood cell function and blood storage. **Vox Sanguinis**, v. 79, n. 4, p. 191–197, 2000.

HAROLD, F. M. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. **Bacteriological Reviews**, v. 30, n. 4, p. 772–794, 1966.

HAYMOND, S. *et al.* Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 434–444, 2005.

HEBBEL, R. P. *et al.* Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, n. 6, p. 1253–1259, 1982.

HELLER, L. B.; CHANEY, M. A. Paraplegia immediately following removal of a cerebrospinal fluid drainage catheter in a patient after thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. **Anesthesiology**, v. 95, n. 5, p. 1296–1297, 2001.

HESS, J. R. Red cell changes during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 43, n. 1, p. 51–59, 2010.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red blood cells: New approaches. **Transfusion Medicine Reviews**, 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. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138–143, 1996.

HOGMAN, C. F. *et al.* Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in. **Transfusion**, v. 31, n. 1, p. 26–29, 1991.

HÖGMAN, C. F. *et al.* Studies on the Mechanism of Human Red Cell Loss of Viability during Storage at +4 °C in vitro. **Vox Sanguinis**, v. 53, n. 2, p. 84–88, 1987.

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

HOPPE, P. P.; KRENNRICH, G. Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic α -tocopherol in the human: a dispute. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 5, p. 183-193, 2000.

HOURANT, P. General Properties of the Alkaline Phosphates: Major Food and Technical Applications. **Water**, v. 15, p. 85–94, 2004.

JIANG, L. *et al.* NIH **Public Access**. v. 499, n. 7457, p. 223–227, 2014.

JOHNSON, R. M. *et al.* Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 11, p. 1407–1417, 2005.

KALENDER, S. *et al.* Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. **Toxicology**, v. 211, n. 3, p. 197–206, 2005.

KALENDER, S. *et al.* Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 227–235, 2004.

KALENDER, Y.; YEL, M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: The effects of vitamin E and catechin. **Toxicology**, v. 209, n. 1, p. 39–45, 2005.

KAMAL-ELDIN, A.; MIN, D. B. **Lipid oxidation pathways**. Vol. 2. p. 304-306, 2008.

KANG, M. J. *et al.* Vitamin E status and its dietary determinants in Taiwanese: Results of the Nutrition and Health Survey in Taiwan 1993-1996. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 86–92, 2004.

KAWAKAMI, K. *et al.* Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 1–2, p. 75–82, 2002.

KAY, M. M. *et al.* Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 8, p. 2463–2467, 1986.

KERN, K.; LANGEVIN, P. B.; DUNN, B. M. Methemoglobinemia after topical anesthesia with lidocaine and benzocaine for a difficult intubation. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 12, n. 2, p. 167–172, 2000.

KIM-SHAPIRO, D. B.; LEE, J.; GLADWIN, M. T. Storage lesion: Role of red blood cell breakdown. **Transfusion**, v. 51, n. 4, p. 844–851, 2011.

KLEIN, H. G.; SPAHN, D. R.; CARSON, J. L. Red blood cell transfusion in clinical practice. **Lancet** (London, England), v. 370, n. 9585, p. 415–26, 2007.

KLINKEN, S. P. Cells in focus Red blood cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1513–1518, 2002.

KOCH, C. G. *et al.* Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 12, p. 1229–1239, 2008.

KORNBERG, A.. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. In: **Inorganic polyphosphates. Springer Berlin Heidelberg**, 1999. p. 1-18.

KRIEBARDIS, A. G. *et al.* Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 148–155, 2007.

KULAEV, I.; KULAKOVSKAYA, T. P Olyphosphate and P Hosphate P Ump. **Energy Source**, p. 709–734, 2000.

KULAEV, I. S.; VAGABOV, V.; KULAKOVSKAYA, T.. The biochemistry of inorganic polyphosphates. **John Wiley & Sons**, 2005.

KURACH, J. D. R. *et al.* Segments from red blood cell units should not be used for quality testing. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 451-455, 2014.

LACROIX, J.; TUCCI, M. Impact clinique de la durée de conservation des globules rouges avant transfusion. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, n. 2, p. 97–105, 2011.

LALIBERTÉ, M. *et al.* Antigen detection at atomolar concentration using optical tweezers. In: **Photonics North**. p. 1-7, 2009.

LANGEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**, v. 21, n. 7, p. 255-260, 1988.

LEE, R. *et al.* 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. 1994. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Análises Clínicas)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

LEWIN, G.; POPOV, I. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences. **Medical Hypotheses**, v. 42, n. 4, p. 269–275, 1994.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Lipid peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIUMBRUNO, G. M.; AUBUCHON, J. P. Old blood, new blood or better stored blood? **Blood Transfusion**, v. 8, n. 4, p. 217–219, 2010.

LOUTIT, J. F. *et al.* CITRIC ACID-SODIUM CITRATE-GLUCOSE MIXTURES FOR BLOOD STORAGE. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 183-202, 1943.

LUTZ, H. U.; BOGDANOVA, A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1–15, 2013.

MADHIKARMI, N. L.; MURTHY, K. R. S. Antioxidant enzymes and oxidative stress in the erythrocytes of iron deficiency anemic patients supplemented with vitamins. **Iranian biomedical journal**, v. 18, n. 2, p. 82–7, 2014.

MAY, J. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 3, p. d1-10, 1998.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 235–245, 2012.

MCMILLAN, D. E.; GION, K. M. Glucosylated hemoglobin and reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Hormone and metabolic research. Supplement series*, v. 11, p. 108-112, 1980.

MCMULLIN, M. F. The molecular basis of disorders of red cell enzymes. **Journal of clinical pathology**, v. 52, n. 4, p. 241–244, 1999.

MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 1–6, 2014.

MOKKEN, F. C. *et al.* The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. **Annals of Hematology**, v. 64, n. 3, p. 113–122, 1992.

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. *et al.* Post-Thaw Storage at 4° C of Previously Frozen Red Cells with Retention of 2, 3-DPG1. **Vox sanguinis**, v. 53, n. 1, p. 15-18, 1987.

MULQUINEY, P. J.; KUCHEL, P. W. Equations and Parameter Refinement. **Society**, v. 596, n. 1999, p. 581–596, 2006.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

MURPHY, S. P. Dietary reference intakes for the U.S. and Canada: Update on implications for nutrient databases. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 4, p. 411–417, 2002.

NAKAO, B. M.; NAKAO, T. A New Preservative Medium Maintaining the Level of Adenosine Triphosphate and the Osmotic Resistance of Erythrocyte. n. 1, p. 43–47, 1960.

NASCIMENTO, J. M. *et al.* The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, 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, n. 5-6, p. 397-407, 1992.

NEPOMUCENO, M. F. *et al.* Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 7, p. 1046-1054, 1997.

NIKI, E. *et al.* Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 36, p. 19809-19814, 1988.

PAIVA-MARTINS, F. *et al.* Effects of the olive oil phenol metabolite 3, 4-DHPEA-EDAH 2 on human erythrocyte oxidative damage. **Food & function**, v. 6, n. 7, p. 2350-2356, 2015.

PALLOTTA, V. *et al.* Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. **Blood Transfus**, v. 12, n. 3, p. 376-387, 2014.

PEREIRA, J. C. B. *et al.* Polifosfato de sódio como fonte alternativa de fosfato em formulações para nutrição parenteral: estudo físico-químico de estabilidade, In: XXVI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA / **27a reunião anual da sociedade brasileira de química**, 2004, salvador. livro de resumos, v. único, 2004.

PERKINS, T. T. Optical traps for single molecule biophysics: a primer. **Laser & Photonics Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 203-220, 2009.

PFEIFER, W. P. *et al.* Vitamin E supplementation reduces oxidative stress in beta thalassaemia intermedia. **Acta haematologica**, v. 120, n. 4, p. 225-231, 2009.

POLK, Hiram C.; GARRISON, James R. Blood management practice guidelines: Conference highlights. **The American Journal of Surgery**, v. 170, n. 6, p. S1-S2, 1995.

POZZO, L. Y. *et al.* Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for *Leishmania amazonensis* parasites. **Micron**, v. 40, n. 5, p. 617-620, 2009.

RAPOPORT, T. A.; HEINRICH, Reinhart; 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. **Biochemical Journal**, v. 154, n. 2, p. 449-469, 1976.

RACHMILOVICH-CALIS, S. *et al.* The effect of pyrophosphate, tripolyphosphate and ATP on the rate of the Fenton reaction. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 669-674, 2011.

RAO, N. N.; GÓMEZ-GARCÍA, María R.; KORNBERG, Arthur. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 605-647, 2009.

RAVAL, J. S. *et al.* Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. **Transfusion Medicine**, v. 23, n. 2, p. 87-93, 2013.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. MV. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, n. 2, p. 126-34, 2004.

REDDI, A. R. *et al.* **NIH Public Access. NIH Public Access**, 46(2), 154–162, 2010.

RENDÓN-RAMIREZ, A. *et al.* Vitamin-E reduces the oxidative damage on δ -aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 6, p. 1121-1126, 2007.

REMONSELLEZ, F.; ORELL, A.; JEREZ, C. A. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 59-66, 2006.

RESOLUÇÃO RDC n° 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>.

RICHTER, Y.; FISCHER, B.. Nucleotides and inorganic phosphates as potential antioxidants. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1063-1074, 2006.

RIFKIND, J. M.; NAGABABU, E.. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 17, p. 2274-2283, 2013.

RINALDUCCI, S. *et al.* Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. **Transfusion**, v. 51, n. 7, p. 1439-1449, 2011.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, R. *et al.* Direct cytoskeleton forces cause membrane softening in red blood cells. **Biophysical journal**, v. 108, n. 12, p. 2794-2806, 2015.

ROSSETI, F. C. Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele. 2006. 104p. 2006. Tese de Doutorado.

RUIZ, F. A. *et al.* Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44250-44257, 2004

SAKATA-SOGAWA, K. *et al.* Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. **European Biophysics Journal**, v. 27, n. 1, p. 55-61, 1998.

SÉRGIO DALMÁS, Paulo. Utilização de tripolifosfato de sódio na elaboração de embutido fermentado à base de carne caprina. 2005.

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**, v. 73, n. 3, p. 638-646, 1977.

SHI, P. A.; NESS, P. M. Two-unit red cell apheresis and its potential advantages over traditional whole-blood donation. **Transfusion**, v. 39, n. 2, p. 218-225, 1999.

SHINDE, Sarita A. *et al.* Effect of antioxidant vitamin supplementation on erythrocyte membrane composition in Type I diabetes mellitus in context of oxidative stress. **Biomedical Research**, v. 21, n. 2, p. 156-160, 2010.

SHONAT, ROSS D.; JOHNSON, PAUL C. Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 5 Pt 2, p. H2233-40, 1997.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, n. 1, p. 7-20, 1992.

SILVA, C. L. S, *et al.* **Biophysical Properties of Red Blood cells Using Optical Tweezers – Applications in biomedicine.** In: VILAS, A. M. Microscopy and Imaging Science: practical approaches to applied research and education. Ed. 7. Microscopy Book Series, 2017 .

SINCLAIR, A. M. Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. **Biologics**, v. 7, p. 161-174, 2013.

SMITH, S. A. *et al.* Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 4, p. 903-908, 2006.

SOLOMON, C.; COLLIS, R. E.; COLLINS, P. W. Erythrocytes, haemostasis, and coagulation monitoring in postpartum haemorrhage (PPH). **British Journal of Anaesthesia**, v. 110, n. 6, p. 1054-1055, 2013.

SOLOMONS, N. W. **Discovery os Vitamins**. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. Modern nutrition in health and disease. Vol. 2, p.30-65, Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.

SONI, G. V. *et al.* Development of an optical tweezer combined with micromanipulation for DNA and protein nanobioscience. **Current Science**, v. 83, p. 1464-1470, 2002.

STIENE-MARTIN, E. A.; LOTSPEICH-STEININGER, Cheryl A.; KOEPKE, John A. **Clinical Hematology: Principles, procedures, correlations**, 1998.

SUN, Y. *et al.* Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. **Nutrition Research**, v. 32, n. 5, p. 328-334, 2012.

TANPHAICHITR, V. *et al.* Thiamine. In: RUCKER, R. B.; SUTTIE, W.; MCCORMICK, D. B. **Handbook of Vitamins**. Ed. 3, p. 275-316, 2001.

TEDESCO, I. *et al.* Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 114-119, 2000.

TENJARLA, S. Microemulsions: An Overview and Pharmaceutical Applications. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, n. 5, p.1-62, 1999.

VALTIS, D. J.; KENNEDY, A. C. Defective gas-transport function of stored red blood-cells. **The Lancet**, v. 263, n. 6803, p. 119-125, 1954.

VAN WIJI, R.; VAN S., WOUTER W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4034-4042, 2005.

VANDAMME, T. F.; ANTON, N. Low-energy nanoemulsification to design veterinary controlled drug delivery devices. **International journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 867-873, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WANG, S. K. *et al.* OPTICAL TWEEZERS MEASUREMENTS OF LEUKOCYTE-ENDOTHELIUM ADHESION FORCE. **Asaio Journal**, v. 50, n. 2, p. 166, 2004.

WEINER, M. *et al.* Toxicological review of inorganic phosphates. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 759-786, 2001.

WIBACK, S. J.; PALSSON, B. O. Extreme pathway analysis of human red blood cell metabolism. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 2, p. 808-818, 2002.

WINTROBE, M. M. **Wintrobe's clinical hematology**. Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

WOLFE, L. C. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. **Transfusion**, v. 25, n. 3, p. 185-203, 1985.

YAWATA, Y.. Cell membrane: the red blood cell as a model. John Wiley & Sons, 2006.

YILMAZ, E.; BORCHERT, Hans-Hubert. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 91-98, 2005.

ZUBAIR, A. C. Clinical impact of blood storage lesions. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 2, p. 117-122, 2010.

4 CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO “MICROSCOPY AND IMAGING SCIENCE: PRACTICAL APPROACHES TO APPLIED RESEARCH AND EDUCATION (A. MÉNDEZ-VILAS, ED.)”: BIOPHYSICAL PROPERTIES OF RED BLOOD CELLS USING OPTICAL TWEEZERS – APPLICATIONS IN BIOMEDICINE.

Biophysical Properties of Red Blood Cells Using Optical Tweezers – Applications in Biomedicine

Carlos A. L. Silva¹, Carinna N. Lima^{1,2}, Yandilla S. S. Silva¹, Diego C. N. Silva³, Patricia Moura², Beate S. Santos¹, Goreti Pereira¹ and Adriana Fontes¹

¹ Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Arquitetura, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50740-530, Brazil.

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Advances in biophotonics have encouraged the development of novel tools applied to help understand a variety of biological events. Among these tools is the optical tweezer, a valuable microscopy technique, based on light momentum transfer, which allows not only capturing and manipulating cells and biomolecules, but also evaluating their mechanical properties. The optical tweezer is a highly sensitive tool with the following capabilities: (i) measuring cellular and molecular biophysical parameters without mechanical contact; (ii) detecting slight variations in biological properties and (iii) analyzing, one by one, biological systems, providing individual measurements, rather than only average values, which can help identify the signatures of several biological conditions. In particular, optical tweezers have allowed for the study of the aggregation and deformability of red blood cells (RBCs). Changes in these biophysical characteristics can lead to decreased, or even lost, RBC functionality and, consequently, reduced survival of erythrocytes in the blood circulation. In this context, this mini-review presents the fundamentals of the optical tweezer as a tool for biological manipulation, focusing mainly on the evaluation of the elastic constant, membrane viscosity, zeta potential and adhesion of RBCs. Applications of optical tweezers in the biomedical field will also be highlighted, including elucidative studies related to normal RBCs, as well as those affected by some intrinsic or extrinsic conditions such as diseases or storage for transfusion purposes.

Keywords: Optical trapping; hemotherapy; hematology; erythrocytes.

1. Introduction

In recent decades, with advances in the area of biophotonics, several techniques have been developed for the manipulation and characterization of individual cells, which have allowed for the study and comprehension of a variety of biological events. One of these tools is the optical tweezer, which is a versatile and valuable microscopy technique, well suitable for measuring forces and movement of microparticles. This technique is based on light momentum transfer, which allows for the capture and manipulation of cells, as well as biomolecules, and the evaluation of their mechanical properties [1-3]. This tool has been used for the study, at the cellular and molecular levels, of a variety of biochemical and biophysical processes without mechanical contact. Moreover, the optical tweezer is a highly sensitive tool capable not only of distinguishing small variations in biological properties, allowing for comparisons between different systems, but also of analyzing each biological system individually, providing single measurements rather than only average values, which can help identify the fingerprint of many biological conditions [3-6].

At the molecular level, optical tweezers have been used for studying the mechanics of DNA and RNA [7, 8], the forces associated with the folding/unfolding of proteins [9, 10], interactions between proteins and DNA [11, 12], among others. At the cellular level, we can highlight for instance the use of optical tweezers in studies of cell motility [13, 14], mitosis [15] and mechanical characteristics of red blood cells (RBCs) [4, 5].

The biophysical properties of RBCs are essential for the maintenance of homeostasis. Under normal conditions, mature RBCs have a biconcave shape and maintain unchanged their area/volume ratio, ionic composition, pH, as well as the structure and integrity of their membrane (lipid bilayer and cytoskeleton) [16, 17]. However, certain conditions can induce changes in the biophysical, biochemical and/or structural properties of erythrocytes. Patients with hematological diseases can present alterations in their erythrocyte rheological properties, which could result from modifications in the composition and organization of components of the lipid bilayer, cytoskeleton and/or hemoglobin [18]. Another condition that can change the biophysical and biochemical properties of erythrocytes is its storage in blood banks [19]. The modifications that occur as a result are known as the RBC storage lesion and include increased hemolysis, changes in shape [20], membrane blistering [21], tendency to cell aggregation [22], decrease in deformability [23, 24], and others.

Among the important biophysical properties of RBCs we can highlight: (1) their deformability, or high flexibility, which allows RBCs to pass through microcapillaries much smaller than the size of the RBC (*ca.* 8 μm), thereby guaranteeing oxygen and carbon dioxide transport throughout the entire body [25] and (2) their ability to aggregate, which is closely related to the Zeta potential (ζ) of erythrocytes, a repulsive potential that arises as a consequence of the negatively charged surface of RBCs (conferred by the presence of sialylated glycoproteins). The ζ promotes repulsive

forces among RBCs, preventing their aggregation [26, 27]. Alterations in cellular biophysical properties may lead to the loss or decrease of the cells' functionality and, consequently, lower survival of erythrocytes in circulation.

Technical advances have been revolutionizing studies in erythrocyte biology, helping to elucidate the mechanisms related not only to the individual functions of RBCs, but also to those associated with cell-cell interactions. In this context, this mini-review presents the fundamentals of the optical tweezer as a microscopy tool for biological manipulation, focusing on studies related to RBCs in the biomedical area. Here, the potential of applying optical tweezers to investigating the biophysical properties of RBCs will be demonstrated through reports involving normal erythrocytes, as well as those affected by different conditions, such as storage or diseases.

2. Principles of Optical Tweezers

In 1609, Johannes Kepler observed that the tails of comets always point to the side opposite the sun, suggesting that the sun was producing a type of radiation pressure on comet tails. In 1873, James Clerk Maxwell formalized the idea that light could exert radiation pressure on matter and determined that the light reflected, refracted or absorbed by objects could generate optical forces. In 1901, Ernest Fox Nichols and Gordon Ferrie Hull, and independently Pyotr Lebedev, proved the existence of radiation pressure, confirming these predictions. Almost one hundred years after the Maxwell theory, in the early 1970s, Arthur Ashkin conducted experiments manipulating and trapping dielectric particles by using the radiation pressure of light [28]. The first works by Ashkin began with the use of counter-propagating laser beams, but by the mid-1980s, he proposed that only a highly focused laser beam would be sufficient to capture dielectric particles in three-dimension, thereby introducing the technique known as optical tweezers [29].

The optical tweezer technique has been consolidated as an optical tool capable not only of capturing and moving dielectric particles, but also of studying their mechanical properties [30]. The simplest way to understand how an optical tweezer works is by using the geometrical optical model, applied when $r \gg \lambda$, where r is the particle radius and λ is the light wavelength. The trajectory of a light ray can be associated with a photon that carries a momentum \mathbf{p} . When an object, with a refractive index larger than the surrounding medium index ($n_2 > n_1$), changes the direction of the photon trajectory, it receives an impulse toward the bisectrix of the angle between the incident and the refracted photon, as a collision between particles, as shown in Figure 1A. It is like a pair of action and reaction forces. The object changes the light direction and the light pushes the object to the opposite side of the deviation. This is an intuitive way to understand the principles behind the operation of an optical tweezer.

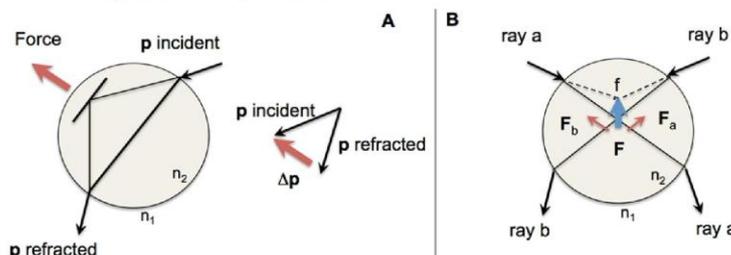


Figure 1 – (A) Collision between a photon and a particle. (B) Forces and trajectories for two rays of a single, highly focused laser beam, for $n_2 > n_1$.

Subsequently, if we consider two light rays of a highly focused laser beam, one on each side, as shown in Figure 1B, the rays a and b would meet at the focus (f), if there is no object. The refraction of these rays causes the forces \mathbf{F}_a and \mathbf{F}_b , and their sum leads to a resulting force \mathbf{F} that tends to move the center of the particle towards the laser focus f . In this way, a highly focused laser beam creates a trap that keeps the center of dielectric particles in the laser focus. It is like a spring (\mathbf{F} is a restoring force) connecting the center of the particle to the laser focus, when it moves, the particle follows this movement in three dimensions. Actually, the rays are not only refracted, but they are also reflected and then two resulting forces will act on the object, one named “the gradient force” that pulls the particle toward the laser focus, and the other called “the scattering force” that pushes the object away from the laser. When “the gradient force” is higher than “the scattering force”, we have an optical tweezer. Typically, since the optical tweezer works only in liquids, reflection is usually much smaller than refraction, but as the difference between the refractive indexes of the surrounding medium and the particle increases, the role of reflection becomes more significant, and may even prevent the capture of particles by the optical tweezer.

It is not only reflection which can make the capture of particles by an optical tweezer difficult, but also absorption. From the point of view of optical force efficiency, thermal effects need to be avoided, even if they are small, since one of the main features of an optical tweezer is capturing and studying living biological systems. Most of the organic

substances that compose biological systems, such as the pigments melanin and hemoglobin, tend to present high absorption in the visible region. On the other hand, water (the most abundant component of living systems), absorbs mostly above 1300 – 1500 nm, leaving a window in the near-infrared region (NIR) with smaller absorptions, around 700 to 1300 nm. In the first demonstrations of the optical tweezer, when Arthur Ashkin used a visible laser to capture inorganic particles in water, he observed that bacteria were also captured and damaged by this system. Therefore, the visible-light laser was changed to one operating in the near-infrared region (1064 nm) and, then it was possible to trap and manipulate living cells, without considerable thermal injury [1]. The applications of optical tweezers in the biomedical sciences grew exponentially after the demonstration that it was possible to keep cells alive, for an extended time, if thermal effects were avoided with near-infrared lasers [30].

An upper estimate of the force magnitude of an optical tweezer can be made by assuming that a laser beam, with a power (P) of *ca.* 100 mW, can cause a maximum force in an object of *ca.* 400 pN, as described by Eq. 1 (where n_i is considered the water refractive index):

$$F = \frac{n_i P}{c} = 1.33 \frac{0.1}{3 \times 10^8} \sim 400 \text{ pN} \quad (\text{Eq. 1})$$

Although very small, these forces are considerable on the microscopic level. Assuming that the captured object is a cubic particle of 1- μm sides with density equal to water, the acceleration caused by an optical force of 400 pN would be *ca.* $10^4 \times g$, where g is gravitational acceleration. Considering a particle 10-fold larger, the acceleration decreases by a factor 10^3 , however, the acceleration caused by the optical force would still be in the range of $10 \times g$. However, for particles of 100- μm sides, the acceleration would be of *ca.* $10^{-2} \times g$, already negligible compared to other microscopic interactions. Thus, the optical tweezer can only capture and effectively manipulate particles smaller than approximately 50 μm .

A typical optical tweezer system basically comprises one or two near-infrared laser beams, which pass by sets of lenses, and is/are tightly focused on a particle (presenting a refractive index larger than the surrounding medium) through of a microscope objective of high numerical aperture ($N.A. > 1$), as shown in Figure 2. The main set of lenses, indicated as telescope, has the function of capturing the particles in the microscope plane of view. Additional sets of lenses can also be used to bend the laser beams in order to approach and bring away captured particles in a dual-beam optical tweezer system. In a single-beam optical tweezer system, optical manipulation is usually performed by a motorized stage coupled to the microscope.

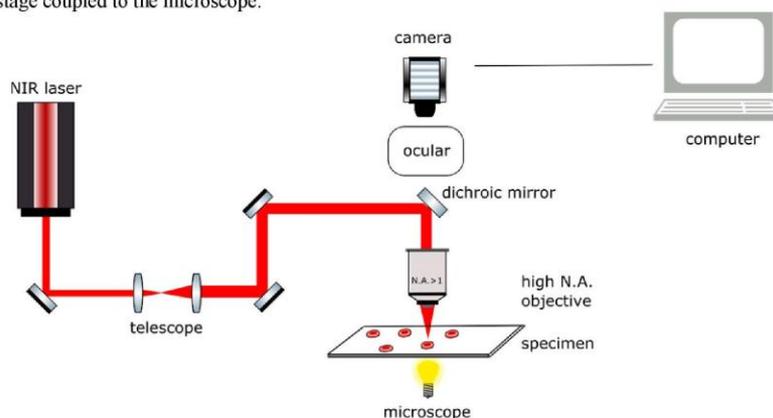


Figure 2 – Schematic representation of a single-beam optical tweezer system.

If the aim of the study is using the optical tweezer to perform force measurements of non-spherical biological systems, first of all it is necessary to calibrate the tool by using a silica or polystyrene bead, in order to find the trap stiffness. This calibration can be done, for example, by analyzing the viscous force when dragging beads at constant velocities using the optical tweezer system. In this case, $F_{\text{viscous}} = k d$, where k is the stiffness and d is the bead displacement from the equilibrium position (it is the distance between the bead center to the laser focus), as shown in Figure 3A. The bead will then be used as a calibrator; by coupling the microsphere to the biological system, it will be possible to evaluate the biological force of interest (in the horizontal plane) by using k and by measuring the displacement d caused by the target force, as shown in Figure 3B [30].

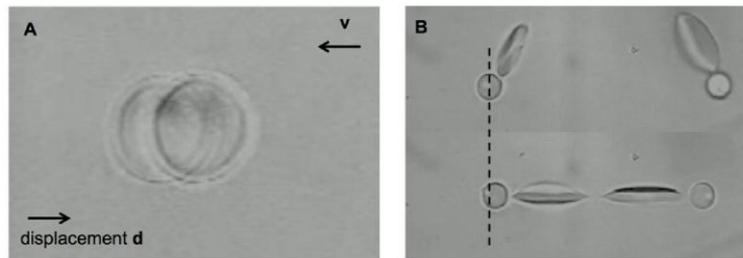


Figure 3 – (A) Bead displacement after being dragged at a constant velocity for optical tweezers calibration, in the horizontal plane. (B) Measuring erythrocyte adhesion by using dual-beam optical tweezers.

The optical tweezer has proven to be a versatile tool in biomedical sciences, allowing not only for the capture and manipulation of cells and biomolecules, but also for the evaluation of biophysical properties related to biological systems [30]. In this context, this chapter will demonstrate the potential of applying optical tweezers to investigate the biophysical properties of red blood cells.

3. Biomedical Optical Tweezer Applications in Red Blood Cells

3.1. Agglutination/aggregation studies

Agglutination reactions are consequences of the mutual attraction of cell membranes that can occur among RBCs and between RBCs and other cells. In the blood stream, RBCs can aggregate and disaggregate spontaneously, and this phenomenon can affect transfusion procedures and the development of some diseases [31, 32]. These reactions depend on several factors, such as interactive forces and the environment. The interactive forces can be the intermolecular attractive (Van der Waals, hydrogen and electrostatic interactions) or repulsive (electrostatic interactions) forces. The electrostatic forces are a consequence of the Zeta potential (ζ), which can be used as a measure of the RBC surface charge. The presence of sialylated glycoproteins in the RBC membrane is responsible for the negative charges of the erythrocyte surface [32, 33].

Optical tweezers have been used in studies aiming to elucidate the mechanisms of RBC aggregation and coagulation. Khokhlova *et al.* [32] studied the aggregation speed and behavior of normal and pathological (systemic lupus erythematosus) RBCs. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that enhances RBC agglutination forces. The authors observed that the aggregation force and speed of normal RBCs was lower than for SLE cells. The aggregation force ratio measured for SLE cells and normal RBCs, F_{SLE}/F_{normal} , was equal to 2.1, which indicates that this force is higher for SLE cells than for normal ones. Meanwhile, the aggregation speed value determined for normal RBCs was $0.30 \pm 0.08 \mu\text{m}/\text{sec}$ and for SLE cells $0.53 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{sec}$, which was almost twice the speed of normal RBCs. These evaluations were performed using a dual-beam optical tweezer. The traps were turned on and the aggregation was studied by moving individual RBCs, in a pair rouleau, at a constant velocity of $0.3 \mu\text{m}/\text{s}$ with calibrated forces and measuring the maximum distance between the RBCs centers (Δx), as represented in Figure 4. The aggregation speed was evaluated by correlating the minimal RBC overlapping (dX , Figure 4) with the aggregate formation time. In this case, the trapping force value was *ca.* 29 pN.

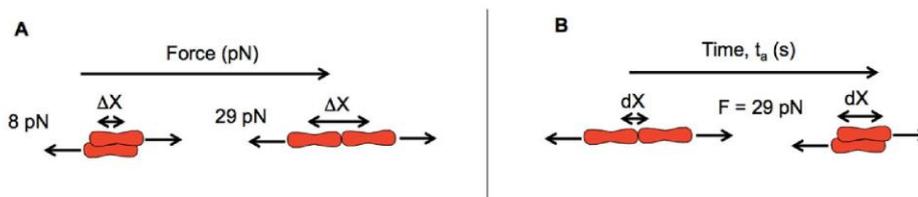


Figure 4 - (A) Scheme demonstrating a pair rouleau being disaggregating by the dual-beam optical tweezers, the greater the force, the higher the Δx . (B) Scheme representing the dependence of the minimal RBC overlapping (dX) according to the rouleau formation time t_a . In this case the trapping force was fixed at *ca.* 29 pN.

Fernandes *et al.* [33] compared the forces involved in RBC aggregation in normal serum, serum with anti-D antibodies and samples with potentiator solutions [Dextran, Bromelain, Papain and low ionic strength solution (LISS)]. Using a dual-beam optical tweezer, these authors measured a parameter called apparent membrane viscosity that is related to the type and the number of proteins involved in RBC aggregation. The measurement of apparent membrane viscosity was obtained using an RBC pair rouleau, by evaluating the optical force measured through the displacement of a silica bead attached to one RBC, while a second RBC was dragged as a function of constant velocities (0.2, 0.5, 0.7, 1.2, 1.8, 3.2 $\mu\text{m/s}$) [34]. They found values of 1×10^{-3} and 2×10^{-3} poise.cm, for normal serum and serum with anti-D antibodies, respectively. And, when using the agglutination potentiator solutions (Dextran, LISS and Bromelain), no agglutination was observed. Only Papain promotes high, non-specific agglutination, which was not possible to evaluate using optical tweezers. These results agree with immunohematological routine.

Another research group [35] used optical tweezers to study the RBC coagulation process, and by observing the intensity of the interactions among the cells over time, they established three distinct phases in coagulation. At the beginning, RBC distribution is random and the erythrocytes begin to vibrate around their equilibrium positions. Then, with the formation of the coagulation region, RBCs are attracted and start to move slowly towards the coagulated group. In the third phase, RBC migration increases rapidly and proceeds until completing the process. These authors also demonstrated that the incorporation of additives in the RBC samples can alter the time of the coagulation process. The use of heparin extended the first phase of the coagulation, by attenuating intercellular interactions, and increased the overall coagulation time. On the other hand, the use of tranexamic acid reduced the coagulation time, making the RBCs enter directly into the third phase of the process.

3.2. Applications in hemoglobinopathies

Several studies have demonstrated that many biophysical changes can be evaluated in order to characterize hematologic diseases, such as sickle cell anemia, thalassemia, iron deficiency, and others. As many of these changes occur at the micrometric scale, or even at the nanoscale, optical tweezers have also been used for these analyses.

Brandão *et al.* [36] used sickle cell disease as a clinical model to present and validate a new method for evaluating RBC deformability, using an optical tweezer operating at 1064 nm. These authors analyzed the deformability of erythrocytes obtained from patients with sickle cell disease (HbSS) or sickle cell trait (HbAS) and compared the results to normal controls. The optical tweezer system was capable of quantifying the global erythrocyte elastic constant, by capturing the RBCs and analyzing their elongations after being arrested using six different velocities (from 150 to 250 $\mu\text{m/s}$). The data showed that RBCs from HbSS patients are less deformable than the control group, but no significant difference was found between HbSS and HbAS patients. However, HbSS patients in treatment with hydroxyurea (HbSS/HU), for at least six months, presented RBC deformability similar to the control group (Figure 5).

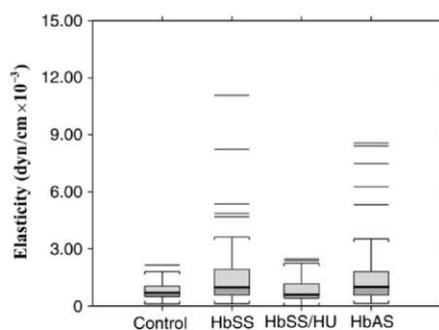


Figure 5 - Elasticity evaluated for RBCs from subjects control, HbSS, HbAS, and HbSS/HU. Image adapted with permission from John Wiley and Sons: [EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY] [36], copyright (2003).

In another work, Brandão *et al.* [37] studied stored RBCs from patients with sickle cell trait in order to analyze its elastic constant compared to a control group using the method previously described [33]. It is known that individuals with sickle cell trait, which are asymptomatic, are eligible for blood donation. Thus, an optical tweezer system was used to quantify the elastic constant of RBCs stored for 1, 14, 21, 28 and 35 days. These authors observed that HbAS RBCs stored up to 21 days showed elastic constant values significantly greater than control RBCs stored for the same period. The HbAS RBCs stored for 28 and 35 days exhibited higher rigidity, escaping from the optical trap, which made the measurements difficult. Therefore, the authors suggest that the transfusion of HbAS RBCs after a shorter storage period (below 21 days) may be desirable.

In 2008, De Luca *et al.* [38] studied erythrocyte deformability in thalassemic and normal RBCs using a dual-beam optical tweezer to directly stretch the cells, and by evaluating elongation as a function of the trapping power, they

determined the erythrocyte stiffness. It was observed that the RBC membrane rigidity increased more than 40% for thalassemic patients, when compared to normal ones. The results showed that the RBC mechanical properties are greatly affected by the genetic defect in the hemoglobin structure associated with thalassemia disease.

In 2009, Brandão and collaborators [39], using the same procedure described before, evaluated the deformability of RBCs from iron-deficient subjects and compared them to healthy donors. They observed that RBCs from iron-deficient patients were more rigid than the controls. The authors concluded that the results obtained for deformability were not related to cell geometry or volume, being more dependent on the hemoglobin content.

Pellizzaro *et al.* [40] used an optical tweezer to evaluate the blood transfusion efficacy in sickle cell anemia patients. The properties of RBCs were studied analyzing the cell maximum and minimum diameters, when the RBC was trapped using different laser powers (8 to 80 mW). The time that the cells take to relax and recover their original size and shape after being released from the trap was also analyzed. The results showed that RBCs from the transfused sickle cell patient presented lower deformation capacity and relaxation rates, when compared to control donors. These authors concluded that the deformability and relaxation rates of the RBCs could be correlated to the transfusion efficiency in sickle cell patients.

3.3. Applications in hemotherapy

RBCs stored for transfusion purposes undergo progressive deterioration. As previously mentioned, glycoproteins, rich in sialic acids, are responsible for the negatively charged erythrocyte membrane surface, which creates a repulsive electrical Zeta potential preventing RBC aggregation in the blood stream. In this context, Silva *et al.* [19] evaluated changes in the sialic acid profile of membranes by measuring the RBC Zeta potential using an optical tweezer system. The experiments were done with RBCs, collected in CPD-SAGM as a function of storage time. In this same work, the authors also evaluated the elastic properties of erythrocytes during the same storage period. In Zeta potential experiments, the optical tweezer was used only for recapturing the cell after being submitted to a set of different constant voltages (30, 40, 50, 60, 70 and 80 V). Then, by using the Smoluchowski equation, the Zeta potential was obtained. In deformability experiments, optical tweezers were used for dragging RBCs using a set of different constant velocities (from 140 to 290 $\mu\text{m/s}$) and by correlating the cell elongation with each velocity, the erythrocyte elastic constant was determined, according to the method previously established by Brandão *et al.* [33]. Results showed that RBCs were *ca.* 134% less deformable at the end of storage (on the 36th day). Figure 6 illustrates differences of RBCs elongations at 200 and 260 $\mu\text{m/s}$ on the day 8 and day 36. Moreover, the Zeta potential decreased by *ca.* 42% during that same period. The study pointed out that not only the elastic constant, but also the Zeta potential could provide new insights about RBC storage lesions.

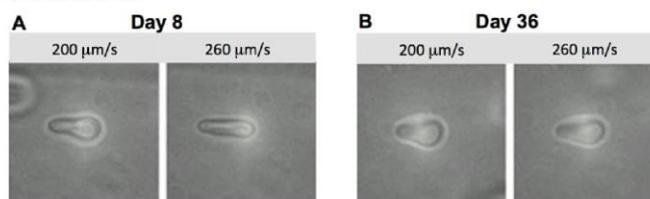


Figure 6 – RBC elongation according to dragging velocities of 200 $\mu\text{m/s}$ and 260 $\mu\text{m/s}$, on day 8 (A) and day 36 (B) of storage in CPD-SAGM bags. Image adapted with permission from PLoS ONE [19].

Transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GVHD) is a fatal complication of blood transfusion in immunosuppressed patients, in which blood donor leucocytes can cause an immune response against the blood cells of the receptor. The gamma irradiation of blood components is usually used as an effective way to prevent TA-GVHD. However, the question is this: can gamma irradiation change RBC biomechanical properties? It is known that irradiation can induce the production of reactive oxygen species and accelerate the leakage of potassium ions from cells, which can compromise the integrity of biological membranes. Moreover, blood banks, without immediate access to irradiators, can store pre-irradiated CPDA₁ RBC units for 28 days, as a routine procedure. In this context, the aim of the study of Barjas-Castro and colleagues [41] was to evaluate the elastic constant of RBCs collected in CPDA₁ units and irradiated with a dose of 25 Gy, using non-irradiated samples as controls. The RBC elastic properties were analyzed on days 1, 14, 21 and 28 by using an optical tweezer system applying the same experimental procedure described by Silva *et al.* [19]. Results showed that, for up to 14 days, the RBC elastic constant of irradiated units did not differ from the control. However, by the 21st day of storage, irradiated RBCs were 10-fold more rigid than the control, and on the 28th day, 30-fold more.

Li *et al.* [42] used an optical tweezer to study the elastic properties of RBCs stored in Alsever's Solution on days 2, 5, 7 and 14. For this, the optical tweezer was first calibrated by using the viscous force acting on a polystyrene bead of 5 μm . Then, a bead with a polylysine coating was trapped by the optical tweezer and bound to an RBC already attached to

the microscope chamber. In this configuration, stored cells were stretched at a maximum force of 315 pN and force-extension relation curves were acquired. Results showed that RBC deformability decreases with the storage time in this preservative solution, indicating that erythrocytes on day 14 were *ca.* 48% more rigid than on day 2.

3.4. Malaria studies

RBCs affected by *Plasmodium falciparum* the etiological agent of malaria undergo structural changes that can profoundly affect their biomechanical properties. In this context, Suresh *et al.* [5] used an optical tweezer for acquiring stretching force vs. cell diameter curves to extract the elastic properties of RBCs at different stages [ring (*Pf*-R-pRBC), trophozoite (*Pf*-T-pRBC), and schizont (*Pf*-S-pRBC)] of *P. falciparum* intracellular development. Results were then compared with the measurements obtained for normal erythrocytes (H-RBC) and with erythrocytes exposed to the parasite, but not infected (*Pf*-U-RBC). For the experiment (represented in Figure 7), two silica beads were attached to RBCs and moved diametrically opposite of each other by using one or both trapped beads, by applying two different stretching forces (68 and 151 pN) over the optical tweezer. The data indicated that *Pf*-U-RBC, *Pf*-R-pRBC, *Pf*-T-pRBC and *Pf*-S-pRBC were respectively 1.5-, 3.0-, 4.0- and 10-fold more rigid than H-RBC. The study showed that there was a progressive loss of deformability according to parasite maturation and the optical tweezer can be considered an important tool to detect and evaluate these changes.

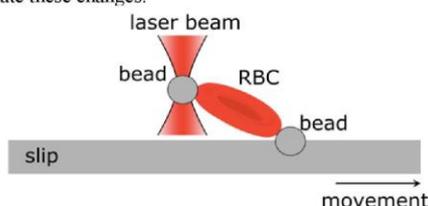


Figure 7 – Scheme of a methodology used to study the deformability of RBCs affected by *Plasmodium falciparum*, the etiological agent of malaria, using optical tweezers.

Mills *et al.* [43] also applied a similar procedure using optical tweezers to study the role of the parasite protein Pf155/ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) on RBC deformability. Proteins like this one can interact with the cell membrane and change the elastic properties of RBCs in the malaria erythrocytic cycle. These properties were first studied in RBCs in the late ring stage after invasion with wild-type *resa1+*, *resa1-KO*, and *resa1-rev* parasites. The authors also evaluated RBCs in the trophozoite stage under the same conditions. The last experiment performed by the researchers, in this same study, consisted of analyzing ring-stage RBCs harboring the three stages of parasites at two different temperatures, 37 °C and 41 °C, since malaria produces febrile episodes during the disease. Results showed that there was no difference in the elastic constant among parasite lines for the trophozoite phase. On the other hand, in the ring phase, only RBCs incubated with wild-type-*resa1+* and *resa1-rev* parasites were considerably more rigid (around 3-fold) than normal RBCs. Moreover, they observed that RESA has a greater effect on the deformability of RBCs under the febrile condition (41 °C), wild-type-*resa1+* erythrocytes were 3.5-fold less deformable than normal cells.

Using biochemical and biophysical techniques, Chandramohanadas *et al.* [44] studied the process of rupture of the parasitophorous vacuole (PV) within RBCs infected with *P. falciparum*. This event is also associated with the disruption of the RBC during parasite egress. One of the biophysical techniques applied in this study was the optical tweezer, which was used to evaluate RBC deformability under different conditions. By using a methodology similar to those described previously, they evaluated the elastic properties of RBCs treated or untreated with cysteine/serine protease inhibitors (E64d, EGTA-AM or chymostatin), which could prevent parasitophorous vacuole rupture. RBCs were treated at 44 hpi (44 hours post-invasion, in the schizont stage) and deformability was evaluated at 46 hours (early stage, before rupture-time point), and at 50–52 hours (late stage, after rupture-time point). The results showed that after inhibitor treatment, all RBCs were more rigid at 50–52 hours when compared to 46 hours. E64d, EGTA-AM and, after chymostatin, were respectively 2.5, 1.6, and 1.25 less deformable at 50–52 hours than at 46 hours. There was no PV breakdown with chymostatin, which could explain the smaller difference in deformability found for this inhibitor. Alterations of biophysical properties like these can play important roles in the parasite egress event.

3.5. Other biomedical applications

Optical tweezer systems have also been used in other applications, namely in the correlation of RBC biophysical deformability with tissue oxygenation [45] and for the study of RBCs from patients with diabetic retinopathy [46]. This optical tool has also been used in living animal studies, showing its great potential as a non-invasive technique [47].

Wu *et al.* [45] measured the elastic constant of RBCs obtained after the arterial occlusion test (AOT) using a jumping optical tweezer [48]. The AOT was used to characterize local muscle metabolism and tissue oxygenation. After the AOT, blood samples were collected from the subjects, and RBCs were analyzed using an optical tweezer system. The

results showed that there is a relationship between RBC elastic properties and their ability to supply oxygen to tissues. RBCs with greater deformability can deliver more oxygen to muscle tissue due to their greater ability to pass through clogged vessels. This phenomenon was observed by the slower increase/decrease of oxygenation tracings during AOT. The change of hemoglobin concentration dominates the correlation between the erythrocyte elastic constant and the dynamic tissue oxygenation induced by AOT. The acquired data highlighted the importance of correlating the contribution of the RBC elastic properties with the supply of oxygen to tissues.

Agrawal *et al.* [46] used a dual-beam optical tweezer system comprises by the division and recombination of a single NIR laser to stretching RBCs from patients with diabetic retinopathy (DR), as well as type 2 diabetes mellitus (DM), and investigating erythrocyte deformability by comparison with normal, healthy controls. Diabetic retinopathy is an eye disease that results from a complication of diabetes and is caused by damage to blood vessels, which can also lead to blindness. They demonstrated that the deformability index $[DI = (I_{\max} - I_0)/I_0]$, where I_{\max} is the final stretched length and I_0 the initial length] of DR RBCs (0.0635 ± 0.028) was smaller than in DM (0.0645 ± 0.038) and in control (0.0698 ± 0.0224) RBCs, indicating that the DR erythrocytes are less deformable and more swollen when compared to DM RBCs. Furthermore, they associated a higher initial cell size (I_0) with reduced deformability, observing that the I_0 of RBCs from patients with diabetes was higher (DM $8.68 \mu\text{m} \pm 0.49$; DR $8.82 \mu\text{m} \pm 0.32$) than the control ($8.45 \mu\text{m} \pm 0.25$). This study pointed out that the erythrocyte size in diabetic patients could be caused by metabolic disturbances, which could alter RBC deformability.

Zhong *et al.* [47] presented the first *in vivo* cell manipulation using an optical tweezer system (Figure 8), showing that this tool could be used as non-invasive method. They used an NIR optical trap to manipulate RBCs present in blood capillaries of the surface of mouse ears. With this tool, they were able to induce the formation of artificial RBC clots in capillary vessels, and then recover blood flow by removing the blockage with the same tool. Moreover, they determined the optical trap stiffness *in vivo* of $\sim 10 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, using the viscous drag force method. This work demonstrates the great potential of optical tweezers to be extended to *in vivo* studies, such as the ones related to hemodynamic parameters.

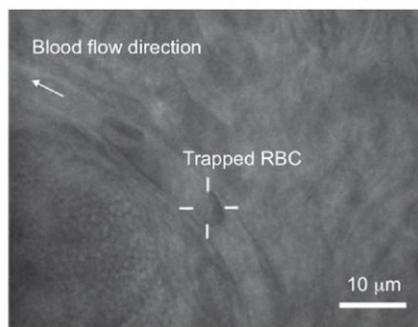


Figure 8 – *In vivo* optical tweezers: trapping a RBC within subdermal capillaries in a living mouse. Image adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: [NATURE COMMUNICATIONS] [47], copyright (2013).

4. Conclusions

About thirty years have now passed since Ashkin's first experimental capture and manipulation of biological systems using NIR optical tweezers. Over the years, as described in this review, the optical tweezer technique has proved to be a valuable microscopy tool, capable not only of manipulating, but also of evaluating important biophysical properties associated with the aggregation and the deformability of RBCs, including in *in vivo* studies. Since aggregation and deformability are important parameters for RBCs in performing their biological functions in the blood stream, optical tweezers have opened up new possibilities in the biomedical field, allowing for quantitative understanding of the roles of intrinsic and extrinsic conditions, such as diseases and storage in blood banks, on RBC biomechanics. Certainly, the optical tweezer microscopy technique will set the pace of many biomedical studies for years to come.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). This work is also linked to the Instituto Nacional de Fotonica (INFO).

References

- [1] Ashkin A, Dziedzic J. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*. 1987; 235:1517-20.
- [2] Molloy JE, Padgett MJ. Lights, action: Optical tweezers. *Contemporary Physics*. 2002; 43:241-58.
- [3] Stevenson DJ, Gunn-Moore F, Dholakia K. Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics. *J Biomed Opt*. 2010; 15:041503-21.
- [4] Fontes A, Castro MLB, Brandão MM, Fernandes HP, Thomaz AA, Huruta RR, et al. Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. *J Opt*. 2011; 13:044012.
- [5] Suresh S, Spatz J, Mills JP, Micoulet A, Dao M, Lim CT, et al. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomater*. 2005; 1:15-30.
- [6] Moffitt JR, Chelma YR, Smith SB, Bustamante C. Recent Advances in Optical Tweezers. *Annu Rev Biochem*. 2008; 77:205-28.
- [7] Bryant Z, Stone MD, Gore J, Smith SB, Cozzarelli NR, Bustamante C. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*. 2003; 424:338-41.
- [8] Galla L, Meyer AJ, Spiering A, Sischka A, Mayer M, Hall AR, et al. Hydrodynamic Slip on DNA Observed by Optical Tweezers-Controlled Translocation Experiments with Solid-State and Lipid-Coated Nanopores. *Nano Lett*. 2014; 14:4176-82.
- [9] Cecconi C, Shank EA, Bustamante C, Marqusee S. Direct Observation of the Three-State Folding of a Single Protein Molecule. *Science*. 2005; 309:2057-60.
- [10] Rebane Aleksander A, Ma L, Zhang Y. Structure-Based Derivation of Protein Folding Intermediates and Energies from Optical Tweezers. *Biophys J*. 2016; 110:441-54.
- [11] Huisstede JHG, Subramaniam V, Binnink ML. Combining optical tweezers and scanning probe microscopy to study DNA-protein interactions. *Microsc Res Tech*. 2007; 70:26-33.
- [12] Heller I, Hoekstra TP, King GA, Peterman EJG, Wuite GJL. Optical Tweezers Analysis of DNA-Protein Complexes. *Chem Rev*. 2014; 114:3087-119.
- [13] Schwingel M, Bastmeyer M. Force Mapping during the Formation and Maturation of Cell Adhesion Sites with Multiple Optical Tweezers. *Plos One*. 2013; 8:e54850.
- [14] Stellamanns E, Uppaluri S, Hochstetter A, Heddergott N, Engstler M, Pfohl T. Optical trapping reveals propulsion forces, power generation and motility efficiency of the unicellular parasites *Trypanosoma brucei brucei*. *Sci Rep*. 2014; 4:6515.
- [15] Ferraro-Gideon J, Sheykhan R, Zhu Q, Duquette ML, Berns MW, Forer A. Measurements of forces produced by the mitotic spindle using optical tweezers. *Mol Biol Cell*. 2013; 24:1375-86.
- [16] Dao M, Lim CT, Suresh S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2003; 51:2259-80.
- [17] Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol*. 1993; 30:171-92.
- [18] Baskurt OK, Meiselman HJ, editors. *Blood rheology and hemodynamics*. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2003: Thieme Medical Publishers.
- [19] Silva DCN, Jovino CN, Silva CAL, Fernandes HP, Filho MM, Lucena SC, et al. Optical Tweezers as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells. *Plos One*. 2012; 7:e31778.
- [20] Wolfe LC. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion*. 1985; 25:185-203.
- [21] Kriebardis Anastasios G, Antonelou Marianna H, Stamoulis Konstantinos E, Economou-Petersen E, Margaritis Lukas H, Papassideri Issidora S. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion*. 2007; 47:1212-20.
- [22] Hovav T, Yedgar S, Manny N, Barshtein G. Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage. *Transfusion*. 1999; 39:277-81.
- [23] Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, Yedgar S, Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*. 2008; 48:136-46.
- [24] Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, De Wildt-Eggen J, Graaff R, Rakhhorst G, Van Oeveren W. Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion*. 2010; 50:941-8.
- [25] Chuitmans JCA, Chokkalingam V, Janssen AM, Brock R, Huck WTS, Bosman GJCGM. Alterations in Red Blood Cell Deformability during Storage: A Microfluidic Approach. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:9.
- [26] Eylar EH, Madoff MA, Brody OV, Oncley JL. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte. *J Biol Chem*. 1962; 237:1992-2000.
- [27] Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro MdL. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2011; 33:297-301.
- [28] Ashkin A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys Rev Lett*. 1970; 24:156-9.
- [29] Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett*. 1986; 11:288-90.
- [30] Jones P, Maragó O, Volpe G. *Optical tweezers: Principles and applications*. 1st Edition ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2015.
- [31] Lee K, Kinnunen M, Khokhlova MD, Lyubin EV, Priezzhev AV, Meglinski I, et al. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions. *J Biomed Opt*. 2016; 21:035001.
- [32] Khokhlova MD, Lyubin EV, Zhdanov AG, Rykova SY, Sokolova IA, Fedyanin AA. Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces. *J Biomed Opt*. 2012; 17:0250011-6.
- [33] Fernandes HP, Fontes A, Thomaz A, Castro V, Cesar CL, Barjas-Castro ML. Measuring red blood cell aggregation forces using double optical tweezers. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013; 73:262-4.

- [34] Fontes A, Fernandes HP, de Thomaz AA, Barbosa LC, Barjas-Castro ML, Cesar CL. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. *J Biomed Opt.* 2008; 13:014001–6.
- [35] Yang B-W, Li Z. Measuring micro-interactions between coagulating red blood cells using optical tweezers. *Biomed Opt Express.* 2010; 1:1217-24.
- [36] Brandão MM, Fontes A, Barjas-Castro ML, Barbosa LC, Costa FF, Cesar CL, et al. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *Eur J Haematol.* 2003; 70:207-11.
- [37] Brandão MM, Saad STO, Cezar CL, Fontes A, Costa FF, Barjas-Castro ML. Elastic properties of stored red blood cells from sickle trait donor units. *Vox Sanguinis.* 2003; 85:213-5.
- [38] De Luca AC, Rusciano G, Ciancia R, Martinelli V, Pesce G, Rotoli B, et al. Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman Tweezers. *Opt Express.* 2008; 16:7943-57.
- [39] Brandao MM, Castro MdLR, Fontes A, Cesar CL, Costa FF, Saad ST. Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009; 43:217-21.
- [40] Pellizzaro A, Welker G, Scott D, Solomon R, Cooper J, Farone A, et al. Direct laser trapping for measuring the behavior of transfused erythrocytes in a sickle cell anemia patient. *Biomed Opt Express.* 2012; 3:2190-9.
- [41] Barjas-Castro ML, Brandão MM, Fontes A, Costa FF, Cesar CL, Saad STO. Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. *Transfusion.* 2002; 42:1196-9.
- [42] Li Y, Wen C, Xie H, Ye A, Yin Y. Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009; 70:169-73.
- [43] Mills JP, Diez-Silva M, Quinn DJ, Dao M, Lang MJ, Tan KSW, et al. Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007; 104:9213-7.
- [44] Chandramohanadas R, Park Y, Lui L, Li A, Quinn D, Liew K, et al. Biophysics of Malarial Parasite Exit from Infected Erythrocytes. *Plos One.* 2011; 6:e20869.
- [45] Wu Y-T, Chiou A, Sun C-W. Correlation between tissue oxygenation and erythrocytes elasticity. *J Biophotonics.* 2011; 4:224-8.
- [46] Agrawal R, Smart T, Nobre-Cardoso J, Richards C, Bhatnagar R, Tufail A, et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. *Sci Rep.* 2016; 6:15873.
- [47] Zhong M-C, Wei X-B, Zhou J-H, Wang Z-Q, Li Y-M. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers. *Nature Comm.* 2013; 4:1768.
- [48] Liao G-B, Bareil PB, Sheng Y, Chiou A. One-dimensional jumping optical tweezers for optical stretching of bi-concave human red blood cells. *Opt Express.* 2008; 16:1996-2004.

**5 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “TRANSFUSION MEDICINE”: VITAMIN E
NANOEMULSION ACTIVITY ON STORED RED BLOOD CELLS**

Vitamin E nanoemulsion activity on stored red blood cells

C. A. L. Silva,¹ C. A. Azevedo Filho,² G. Pereira,³ D. C. N. Silva,⁴ M. C. A. B. Castro,⁵ A. F. Almeida,⁶ S. C. A. Lucena,⁷ B. S. Santos,⁸ M. L. Barjas-Castro⁹ & A. Fontes¹ 

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ²Centro Universitário Taboas de Almeida (Asces - Unita), Caruaru, Brazil, ³Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴Colegiado de Ciências Biológicas, Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brazil, ⁵Núcleo de Enfermagem, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil, ⁶Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - CPqAM, FIOCRUZ, Brazil, ⁷Fundação Hemope, Recife, Brazil, ⁸Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, and ⁹INCTS - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

Received 19 October 2016; accepted for publication 30 January 2017

SUMMARY

Background: Stored red blood cells (RBCs) undergo numerous changes that have been termed RBC storage lesion, which can be related to oxidative damage. Vitamin E is an important antioxidant, acting on cell lipids. Thus, this study aimed to investigate vitamin E activity on stored RBCs.

Methods: We prepared a vitamin E nanoemulsion that was added to RBC units and stored at 4 °C. Controls, without vitamin E, were kept under the same conditions. Reactive oxygen species (ROS) production was monitored for up to 35 days of storage. RBC elasticity was also evaluated using an optical tweezer system.

Results: Vitamin E-treated samples presented a significant decrease in ROS production. Additionally, the elastic constant for vitamin E-treated RBCs did not differ from the control.

Conclusion: Vitamin E decreased the amount of ROS in stored RBCs. Because vitamin E acts on lipid oxidation, results suggest that protein oxidation should also be considered a key factor for erythrocyte elastic properties. Thus, further studies combining vitamin E with protein antioxidants deserve attention, aiming to better preserve overall stored RBC properties.

Key words: emulsion, elasticity, erythrocyte, reactive oxygen species, vitamin E.

INTRODUCTION

Red blood cells (RBCs) stored for transfusion purposes undergo a variety of changes, collectively termed RBC storage lesion. Erythrocytes change from discocytic to spherocytic shapes, shed

lipids and exhibit decay in ATP content and a decrease in membrane zeta potential due to the loss of glycoprotein sialic acids, which can progressively reduce the ability of the RBCs to resist in circulation (Silva *et al.*, 2012; Bosman, 2013). The loss of RBC deformability is also one of the most commonly observed storage injuries (Fontes *et al.*, 2011; Daly *et al.*, 2014). Deformability is a fundamental erythrocyte mechanical property, allowing RBCs to pass through capillaries with diameters of 2–3 µm, which are smaller than RBC dimensions (6–8 µm). Thus, evaluating and ensuring the overall quality of stored RBCs has become a contentious and relevant issue (Bosman, 2013).

The storage injuries already mentioned, and others, may be directly related to the gradual oxidation of membrane lipids and/or proteins. Deeper knowledge in this area would help to develop new preservative preparations for RBC units, supplemented by antioxidants, which could be capable of improving the biophysical and functional integrity of these cells in circulation after longer storage periods, leading to better post-transfusion yield (Racek *et al.*, 1997; Chung and Benzie, 2000; Sparrow, 2015).

Over the years, vitamin E has attracted attention as a lipid-soluble antioxidant, and several studies have demonstrated its activity on lipids by minimising the peroxidation of fatty acids in biological membranes (Racek *et al.*, 1997; Chung and Benzie, 2000; Pfeifer *et al.*, 2008). Vitamin E intercepts hydroxyl and peroxy radicals, resulting in the formation of tocopheryl radicals, which can even be regenerated by vitamin C (Rucker *et al.*, 2007). Chan *et al.* (1999) showed that vitamin E supplementation improved clinical symptoms in individuals with haemoglobinopathies, who have increased oxidative stress. Pfeifer *et al.* (2008) also showed that vitamin E can reduce oxidative stress in RBCs of β -thalassaemia intermedia patients. The role of vitamin C was also investigated to improve the condition of RBCs for transfusion purposes, showing that this antioxidant was able to reduce membrane mechanical fragility and did not alter biochemical parameters in AS-5 RBC units (Raval *et al.*, 2013). In addition, vitamin C was also able to increase

Correspondence: Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, CB, UFPE, Recife, PE 50670-901, Brazil.
Tel.: +55 81 21267818; fax: +55 81 21268560. e-mail: adri-fontes@uol.com.br

post-transfusion recovery and decrease alloimmunisation in mice (Stowell *et al.*, 2013).

Therefore, considering that the RBC storage lesion may also be related to lipid oxidation of erythrocyte membranes, this study aimed to evaluate the effect of vitamin E as a possible antioxidant of RBC units stored for transfusion purposes. We believe that this research can provide support for a deeper comprehension of the mechanisms and consequences of vitamin E activity on stored RBCs.

METHODS

Vitamin E nanoemulsion – preparation and characterisation

As vitamin E is lipophilic, it was dispersed in aqueous media to improve its interaction with erythrocytes. Thus, vitamin E was formulated as an oil/water nanoemulsion by mixing 160 mg of vitamin E (T3376 – Sigma-Aldrich), 265 mg of Polysorbate 20 (V001280, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States), 265 mg of Polysorbate 80 (V000749, Sigma-Aldrich) and 50 mL (at approximately 50 °C) of SAG-M preservative solution (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany), followed by sonication (5 min, frequency of 25 kHz – ultrasound bath).

Average droplet size was evaluated by dynamic light scattering (DLS – Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Worcester-shire, UK) over 1 month to confirm the nanometric regime and evaluate its stability.

Vitamin E nanoemulsion was also characterised using high-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu – Prominence, Kyoto, Japan). The elution of samples was carried out in a reverse phase C18 150 × 4.6 mm, 5.0 µm column (Kinetex – Phenomenex), and analysis was performed in the spectral range of $\lambda = 190$ –400 nm, allowing for observation of the vitamin E absorption band at 286 nm. The mobile phase applied was methanol (HPLC grade), and analysis was performed in isocratic mode, with a flow rate of 1 mL min⁻¹ at 35 °C, with a total run time of 7 min. For vitamin E nanoemulsion preparation, an extraction solution was used consisting of hexane-ethyl acetate 80:20 v/v. A standard control was also prepared by dissolving vitamin E in methanol.

RBC samples

RBC units were obtained from healthy blood donors (male, age: 22–31 years) at the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (HEMOPE - Ethics Committee Report 003/09). Units were collected in CPD/SAG-M, citrate phosphate dextrose/ Saline Adenine Glucose Mannitol (Fresenius Kabi), and on the same day, each unit was split into two portions of 150 mL. Immediately after, one of the portions received 10 mL of freshly prepared vitamin E nanoemulsion. The other portion received the same amount of the respective solvent and was considered the control. All manipulations were performed via sterile connecting devices, and subsequently, units were stored at 4 °C.

The amount of 10 mL was chosen to achieve a concentration of approximately 0.2 mg mL⁻¹ of vitamin E in each bag, which was based on the concentration used in parenteral pharmaceutical lipid complexes (Xu *et al.*, 2015). Five RBC split units were evaluated.

RBC analyses

Quality control. All the samples (with or without vitamin E nanoemulsion) were analysed by the quality control service routine on the 35th day of storage at HEMOPE. Haemoglobin and haematocrit were evaluated in an XS=1000i-Hematology-Analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). The percentage of haemolysis was determined using a similar procedure to that previously reported (Sowemimo-Coker, 2002). Microbiological tests were performed using BacT/ALERT[®] culture media (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Reactive oxygen species (ROS) evaluation. Reactive oxygen species (ROS) production in the RBC units was monitored on the 7th, 21st and 35th days of storage using the DCFH-DA fluorescent label (2',7'-dichlorofluorescein-diacetylated – D6883 – Sigma-Aldrich). For this, 500 µL of each unit sample (with or without vitamin E nanoemulsion) was washed three times by centrifugation (1027 g for 5 min) and resuspended in 0.9% saline solution to obtain approximately 10⁶ cells mL⁻¹. Subsequently, cells were incubated with 0.5 µL (at 10 mM) of DCFH-DA for 30 min. Finally, samples were again washed twice by centrifugation (1027 g for 5 min) and were evaluated using flow cytometry (FACSCalibur System, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A total of 20 000 events was analysed for each test. The green fluorescence of DCFH-DA was measured by the FL1 channel and was excited with a 488 nm laser.

Positive control evaluation was also performed using 1 µL of hydrogen peroxide (30%, Sigma-Aldrich) diluted in 50 µL of 0.9% saline solution. For this, 10 µL of the prepared H₂O₂ solution was added to RBC samples (also at 10⁶ cells mL⁻¹), and ROS species were analysed by the same protocol.

Elasticity measurements

In order to measure the erythrocyte elastic constant, cells obtained from RBC units with and without vitamin E nanoemulsion were analysed by optical tweezers using a previously proposed method (Fontes *et al.*, 2011). The erythrocyte elastic constant (named here as 'elasticity') reflects the ability of cells to resist deformation. The higher the value of the elastic constant, the more difficult it is to deform the RBC for a given applied force. Thus, measurement of elasticity is a way to infer RBC deformability.

Erythrocyte deformability can be studied by different complementary techniques (Tomaiuolo, 2014), such as ektacytometry and optical tweezers. Nevertheless, while ektacytometry evaluates the RBC elongation index related to a bulk cell population,

optical tweezers provide the elastic constant of single cells. Optical tweezers have been proven to be a versatile and sensitive tool to study RBC biology (Fontes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Tomaiuolo, 2014).

The optical tweezers system used in this work consisted of a laser beam in the near infrared ($\lambda = 1064$ nm – IPG Photonics, Oxford, MA, USA) focused on the microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) through an objective of 100 \times (NA = 1.25). For measurements, RBCs (diluted in blood serum – 1:1000 μ L) were placed in a Neubauer chamber, captured by the optical tweezer and dragged against the blood serum with six constant velocities ranging from 140 to 315 μ m s⁻¹. When RBCs are dragged, they are deformed, and the analysis of the cell elongations L as a function of drag velocities v can be used to extract the value for the elasticity μ by using Eqn 1:

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

adopting L_0 as the initial cell length; η is the blood serum viscosity ($\eta = 1.65$ cP, measured by an Ostwald viscometer); and $Z_{eq} = 25$ μ m, a parameter related to the distance from the trapped cell to the chamber and the coverslip surfaces (Fontes *et al.*, 2011).

As with the ROS evaluation, elasticity measurements were carried out on the 7th, 21st and 35th days of storage. For each day, at least 20 cells were measured by each unit.

Statistical analyses

To examine statistical differences or similarities presented between the groups (with or without vitamin E nanoemulsion), the Wilcoxon test was used as the data do not follow a normal distribution (Zar, 1999). Groups were considered significantly different at P values lower than 0.05 (for a two-tail hypothesis).

RESULTS

Vitamin E emulsions – characterisation

The formulation droplets maintained their average size over the evaluated time period, indicating that the formulation was stable during the study and presented particles on the nanometer scale of 21 ± 5 nm. Also, vitamin E nanoemulsion was translucent and did not present visible phase separation over at least 2 months.

Figure 1a presents the absorption spectra of the vitamin E standard reference (solid line) and of the nanoemulsion (dashed line), respectively, with a similarity index above 99.9%, obtained by LC Solution software. The absorption band of vitamin E (at $\lambda = 286$ nm) was observed in both samples, confirming that the vitamin remained structurally intact after being incorporated in the nanoemulsion. Figure 1b shows the chromatogram of the standard solution and of the nanoemulsion, which showed that vitamin E was separated from the other components of the formulation.

Table 1. RBC elasticity in control and vitamin E-treated samples as a function of storage time

Storage day	Control RBCs elasticity ($\times 10^{-4}$ dyn. cm ⁻¹)	Vitamin E-treated RBCs elasticity ($\times 10^{-4}$ dyn. cm ⁻¹)
7 ¹	4.7 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4
21 ²	4.9 \pm 0.5	4.5 \pm 0.5
35 ³	6.0 \pm 0.4	6.1 \pm 0.4

¹ $P = 0.4$.

² $P = 0.2$.

³ $P = 0.3$.

Quality control

Results of quality control, determined on the 35th day of storage, showed no significant differences between the units with or without vitamin E nanoemulsion. All samples showed mean values for haemoglobin, haematocrit and haemolysis of 47.5 ± 0.2 g/unit, $55.5 \pm 0.6\%$ and $0.60 \pm 0.01\%$, respectively, as recommended by the quality control service. Microbiological tests were also negative for all units.

ROS evaluation

DCFH-DA fluoresces only after cell oxidation, and the number of labelled cells is proportional to the amount of ROS produced. The positive control assessed with hydrogen peroxide showed that 96% of cells were labelled, demonstrating the effectiveness of this fluorescent ROS probe.

Subsequently, results were compared between samples with and without vitamin E for each day, and the relative increase/decrease of ROS production was calculated (where negative values represent an ROS decrease for samples containing vitamin E with respect to the control, and positive values represent the opposite). These results are presented in Fig. 2, which shows that there was an effective ROS reduction for all evaluated storage days ($P < 0.03$).

Elasticity measurements

Results of the temporal changes in elasticity, and standard errors, for the control and for samples incubated in vitamin E nanoemulsion are shown in Table 1. The cells were shown to be less deformable according to storage time ($P < 0.01$ for both days 7 and 21 compared to day 35). In addition, there were no significant differences in the elasticity values between the control and those units where the vitamin E nanoemulsion was added for all days of measurement ($P > 0.2$).

DISCUSSION

Our results showed an efficient ROS reduction of at least 35% for all days analysed. Chung & Benzie (2000) showed that vitamin

4 C. A. L. Silva et al.

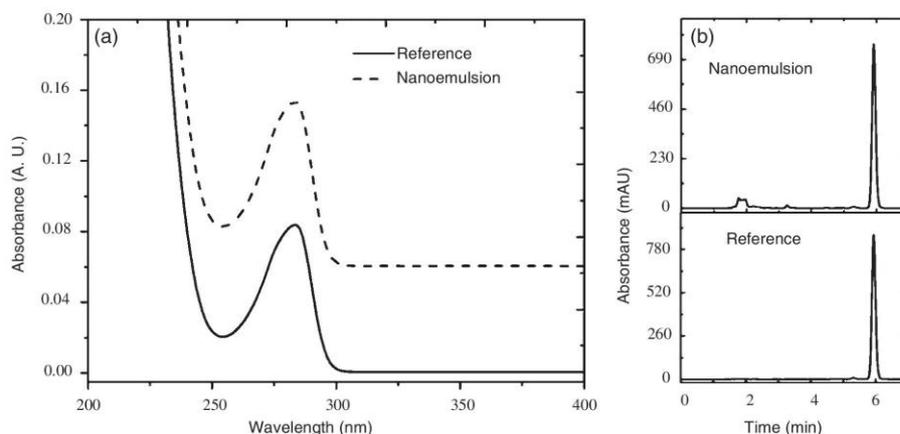


Fig. 1. (a) Absorption spectra of vitamin E in different media: reference standard in methanol (solid line) and in nanoemulsion (dashed line). (b) HPLC chromatogram of vitamin E reference and sample.

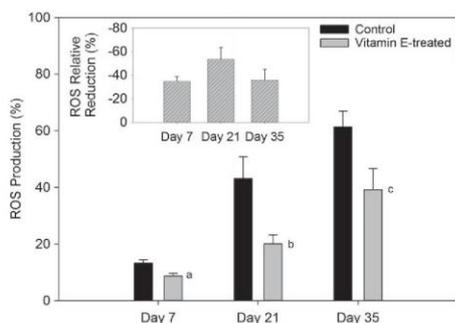


Fig. 2. ROS production (%) per day of storage; control units in black and vitamin E-treated ones in grey. Inset: ROS relative reduction (%) with respect to controls per day of storage (^a $P=0.01$, ^b $P=0.03$, ^c $P=0.01$).

E was an effective antioxidant for decreasing RBC membrane peroxidation after *in vitro* treatment with cumene hydroperoxide. Racek *et al.* (1997) showed that vitamin E supplementation of blood donors can decrease malondialdehyde levels, a marker of lipoperoxidation. Thus, our result with CPD/SAG-M RBC units is corroborated by these and other reported experimental data, performed *in vivo* or *in vitro* with heparinised blood, which have shown the antioxidant activity of vitamin E on RBCs under different conditions (Racek *et al.*, 1997; Chung & Benzie, 2000; Pfeifer *et al.*, 2008; Abdallah *et al.*, 2011; Eroglu *et al.*, 2013).

RBC deformability decreases with storage, which is corroborated by studies reported in the literature (Bennett-Guerrero

et al., 2007; Daly *et al.*, 2014). In addition, the cell constant elastic value presented a smaller variation as a function of storage time when compared to previous work (Silva *et al.* 2012), probably because an extra amount of SAG-M was added to all units for both conditions, providing an additional quantity of supplements.

Our results indicate that although vitamin E nanoemulsion was able to decrease ROS production, it did not modify the deformability properties of stored RBCs. The work of Kriebardis *et al.* (2007), for instance, showed evidence of the occurrence of oxidative damage in proteins of RBCs stored in CPDA with emphasis on components of the cytoskeleton. Moreover, Snyder *et al.* (1985) studied RBCs after treatment with H_2O_2 , carbon monoxide (known to inhibit haeme-protein degradation) and butylated hydroxytoluene (BHT) antioxidant, showing that BHT was able to decrease lipid peroxidation, but it was not able to prevent the loss of deformability, suggesting that RBC biomechanics is highly related to membrane protein oxidation. More recently, other reports supported this conclusion about the role of proteins (Srouf *et al.*, 2000; Hale *et al.*, 2011). Dikmenoglu *et al.* (2008) also demonstrated that another antioxidant, melatonin, was able to prevent lipid peroxidation but did not change the overall elastic properties of erythrocytes. The antioxidant capacity of vitamin E is focussed on membrane phospholipids. Thus, supported by these studies, our findings suggest that, although ROS production decay associated with lipids is an important issue, it is not sufficient to improve cell biomechanics. Therefore, more studies focusing on the combination of vitamin E with protein antioxidants could be relevant in order to maintain the characteristics of erythrocytes as a whole during storage.

This study also presents some limitations. Evaluations of mechanical fragility were not performed. To better understand

RBC biophysical properties, it would be relevant to correlate elastic properties with mechanical fragility and ROS production. We also did not perform studies related to gender or leukoreduction, which may influence some parameters investigated.

CONCLUSION

In conclusion, our results showed that a vitamin E nanoemulsion prepared in SAG-M decreased ROS production in RBC units by at least 35% without changing RBC elasticity. Supported by other reports, we also suggest that as vitamin E acts on membrane lipids, and protein oxidation appears to also be a key factor in RBC biomechanics, more studies combining vitamin E with protein antioxidants deserve attention, aiming at the better preservation of overall RBC properties during storage.

REFERENCES

- Abdallah, F.B., Gargouri, B., Bejaoui, H., Lassoued, S. & Ammar-Keskes, L. (2011) Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environmental Toxicology*, **26**, 287–291.
- Bennett-Guerrero, E., Veldman, T.H., Doctor, A. *et al.* (2007) Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 17063–17068.
- Bosman, G. (2013) Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences. *Frontiers in Physiology*, **4**, 376.
- Chan, A.C., Chow, C.K. & Chiu, D. (1999) Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **222**, 274–282.
- Chung, W.Y. & Benzie, I.F.F. (2000) Probe-assisted flow cytometric analysis of erythrocyte membrane response to site-specific oxidant stress. *Cytometry*, **40**, 182–188.
- Daly, A., Raval, J.S., Waters, J.H., Yazer, M.H. & Kameneva, M.V. (2014) Effect of blood bank storage on the rheological properties of male and female donor red blood cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **56**, 337–345.
- Dikmenoglu, N., Ileri, E., Seringec, N. & Ercil, D. (2008) Melatonin prevents lipid peroxidation in human erythrocytes but augments deterioration of deformability after in vitro oxidative stress. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **40**, 235–242.
- Eroglu, S., Pandir, D., Uzun, F.G. & Bas, H. (2013) Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biological Research*, **46**, 33–38.
- Fontes, A., Castro, M.L.B., Brandão, M.M. *et al.* (2011) Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. *Journal of Optics*, **13**, 044012.
- Hale, J.P., Winlove, C.P. & Petrov, P.G. (2011) Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties. *Biophysical Journal*, **101**, 1921–1929.
- Kriebardis, A.G., Antonelou, M.H., Stamoulis, K.E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L.H. & Papassideri, I.S. (2007) Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **11**, 148–155.
- Pfeifer, W.P., Degasperi, G.R., Almeida, M.T., Vercesi, A.E., Costa, F.F. & Saad, S.T.O. (2008) Vitamin E supplementation reduces oxidative stress in beta thalassaemia intermedia. *Acta Haematologica*, **120**, 225–231.
- Racek, J., Herynková, R., Holeček, V., Jeřábek, Z. & Sláma, V. (1997) Influence of antioxidants on the quality of stored blood. *Vox Sanguinis*, **72**, 16–19.
- Raval, J.S., Fontes, J., Banerjee, U., Yazer, M.H., Mank, E. & Palmer, A.F. (2013) Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. *Transfusion Medicine*, **23**, 87–93.
- Rucker, R.B., Zempleni, J., Suttie, J.W. & McCormick, D.B. (2007) *Handbook of Vitamins*, 608. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Silva, D.C.N., Jovino, C.N., Silva, C.A.L. *et al.* (2012) Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells. *PLoS One*, **7**, e31778.
- Snyder, L.M., Fortier, N.L., Trainor, J. *et al.* (1985) Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, **76**, 1971–1977.
- Sowemimo-Coker, S.O. (2002) Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion Medicine Reviews*, **16**, 46–60.
- Sparrow, R.L. (2015) Red blood cell storage duration and trauma. *Transfusion Medicine Reviews*, **29**, 120–126.
- Srouf, M., Bilito, Y., Juma, M. & Irhimeh, M. (2000) Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **23**, 13–21.
- Stowell, S.R., Smith, N.H., Zimring, J.C., Fu, X., Palmer, A.F., Fontes, J., Banerjee, U. & Yazer, M.H. (2013) Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization. *Transfusion*, **53**, 2248–2257.
- Tomauiuolo, G. (2014) Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, **8**, 051501.
- Xu, Z., Harvey, K.A., Pavlina, T.M., Zaloga, G.P. & Siddiqui, R.A. (2015) Tocopherol and tocotrienol homologs in parenteral lipid emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **117**, 15–22.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE, Aggeu Magalhães Institute – FIOCRUZ and HEMOPE. This work is also linked to National Institute of Photonics and National Institute of Science and Blood Technology.

A. F., B. S. S., M. L. B.-C. and C. A. A. F. conceived and designed the experiments. C. A. L. S., D. C. N. S., M. C. A. B. C. and A. F. A. performed the experiments. C. A. L. S., G. P. and S. C. A. L. analysed and discussed the data. All the authors participated in the writing of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no competing interests.

6 MANUSCRITO: FORMATADO PARA INTEGRATIVE BIOLOGY

EVALUATION OF SHORT-CHAIN POLYPHOSPHATES AS AN ADDITIVE TO PACKED RED BLOOD CELLS

C. N. Jovino^{†a}, C. A. L. Silva^{†b}, D. C. N. Silva^c, S. C. A. Lucena^d, G. A. L. Pereira^e, B. S. Santos^a, A. Fontes^b

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x
www.rsc.org/

Red blood cells (RBCs) stored for transfusion purposes undergo oxidized lesions that can affect their deformability. Polyphosphates are inorganic polymers with antioxidant, buffering, chelating action and bactericidal properties, besides they are still sources of phosphorus and energy. This work evaluated the action of sodium polyphosphate (NaPolyP, $n = 9$) on RBCs. Initially, erythrocytes collected in EDTA were analyzed morphologically, after 24 h and two weeks of incubation with NaPolyP (from 0.05 to 0.4 mg/mL), in order to determine the amount that best preserved their biconcave shape. The highest concentration used (0.4 mg/mL) was responsible for the best preservation of the erythrocyte morphology. In parallel, the influence of NaPolyP concentrations on the coagulation was evaluated applying Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) tests in blood collected in sodium citrate. Clotting time increased with NaPolyP concentration only for the intrinsic pathway, which excluded the hypothesis that it could stimulate coagulation processes. From then on, CPD/SAG-M RBC units were treated with NaPolyP and analyzed for their quality control, including hemoglobin content, hematocrit determination, hemolysis, and microbiological testing. The elasticity of RBCs was also measured using an optical tweezer. NaPolyP exposure of RBC units did not significantly alter quality control parameters. NaPolyP treated erythrocytes showed to be about 25% more deformable than the untreated ones at day 35 of storage.

Introduction

The main biological function of human red blood cells (RBCs) is the supply of molecular oxygen to tissues. The transfusion of RBCs is a procedure commonly used to treat established anemia and cases of blood loss due to events such as trauma, surgical procedures, and severe gastrointestinal bleeding, in order to prevent inadequate O_2 release in the body¹. When erythrocytes are stored under blood bank conditions, they undergo biochemical and biophysical changes, known as the RBC storage lesion, which affect cell function, metabolism and morphology². The use of preservative/additive solutions aims to decrease the RBC storage lesion upholding their cellular integrity and deformability, fundamental characteristics to their 24 h post-transfusion survival and to the maintenance of the tissue perfusion³. However, even so, it has been observed that stored erythrocytes can: (i) undergo a drop in the glycolytic rate, as well as an increased hemolysis; (ii) accumulate glycolysis products and oxidative stress; and also (iii) present a gradual loss on deformability and zeta potential^{2,4,5}. Many reports have studied stored erythrocytes, and some of them also aimed to improve RBC properties under this condition^{4,5,6,7,8}.

Polyphosphates (PolyPs) constitute a set of phosphate

groups, necessary for cell growth and metabolism. They are inorganic polymers presenting a general formula $[PO_3^-]_n$, where n is the degree of polymerization. Physicochemical analyses showed that the hydrolysis of P-O-P bonds, in linear polyphosphates, releases energy equivalent to approximately 10 kcal/mol, the same amount of energy released by the hydrolysis of the terminal phosphoric group of ATP⁹. The buffering activity of PolyPs also has biological importance due to the neutralizing action of alkalis inside the cells¹⁰. Reports on literature have proven the presence of inorganic polyphosphates in a variety of human cells (including the platelets) and tissues^{10,11}. Others useful features of PolyPs are the antioxidant and bactericidal properties, as well as chelating action on bivalent ions^{12,13}.

Thus, these polyphosphate characteristics of retarding the acidification of the medium, preventing oxidative damage, being a source of inorganic phosphate and its potential for energy reserve may be useful to improve the quality of stored RBCs and lead to a better post-transfusion yield. However, the polymer size-dependence procoagulant effect reported to PolyPs can be a concern to blood transfusion^{14,15}. Thereby, the aim of this work was to evaluate the action of sodium polyphosphate (NaPolyP) with a chain of nine groups ($n = 9$) on the quality parameters adopted by hemotherapy services, clotting time and mechanical properties of erythrocytes stored in CPD/SAG-M units.

Methodology

NaPolyP Solution Preparation

The sodium polyphosphate salt $[(NaPO_3)_9 - \text{Sigma-Aldrich}]$ applied in this work presents 96% of purity and polymeric

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Colegiado de Ciências Biológicas, Campus de Ciências Agrárias, Universidade do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

^d Fundação Hemope, Recife, Pernambuco, Brazil.

^e Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

[†] These authors contributed equally to this work.

chain containing 9 phosphate units, as determined by the equation described by Greenfield and Clift¹⁶, which was applied to the ³¹P NMR spectrum data obtained with a Varian spectrometer (7 T, operating at 121 MHz, data not shown).

The starting sodium polyphosphate concentration (0.1 mg/mL) used in this study was estimated from the equivalence with the phosphorus amount remained in a CPDA₁ RBC unit (ca. 6.6 mg that corresponds to ca. 29.2 mg of NaPolyP in a final volume of 250 mL), after the removal of the platelet-rich plasma during the whole blood fractionation. The amount of NaPolyP solutions applied in the entire study always represents less than 2% of the total blood constituent volume used, which is not capable to alter considerably the sample isotonicity. Here was to apply the NaPolyP to supplement CPD/SAG-M RBC units, which have almost all the total phosphorus withdrawn during the blood processing, and investigate biochemical and biophysical parameters modifications compared with samples without the NaPolyP. The SAG-M units can be preserved for a longer period than CPDA₁ ones¹⁷. Thus, the hypothesis is that the supplementation with phosphorus, besides the others promising characteristics of PolyPs, could improve the stored conditions of SAG-M RBCs.

Evaluation of the NaPolyP on the Erythrocyte Morphology

Before applying the NaPolyP in RBC units, we evaluated its effect on the erythrocyte morphology. This procedure also aids to adjust the NaPolyP amount to be added to the units. Ethics Committee approved this study (Report 003/09 and CAEE 41109115.6.3001.5195). For this, RBCs collected in EDTA were resuspended in 0.9% saline solution and submitted to increasing NaPolyP concentrations (1X, 2X and 4X, respectively 0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL), taking as control erythrocytes in absence of NaPolyP. All systems were analyzed by optical microscopy (Axiolab – Carl Zeiss) after 24 h and two weeks of incubation.

Evaluation of the NaPolyP on the Coagulation

The direct action of the NaPolyP (n = 9) on clotting was also evaluated through Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), in order to verify possible variations in the both extrinsic and intrinsic pathways, respectively. These coagulation monitoring tests involve the clotting cascade activation artificially induced, and measure the time elapsed until clot formation. For this, coagulation times were obtained for plasma samples, collected in sodium citrate, from four different healthy donors, incubated with NaPolyP solutions of increasing concentrations (1X, 2X, 4X, and 10X, respectively 0.1, 0.2, 0.4 and 1 mg/mL) and compared to the control. Clotting time analyses were performed in an Automated Coagulometer ACL 7000[®] (Instrumentation Laboratory), with reference values 10.8 and 29.1 seconds for

PT and APTT, respectively. Biotécnica[®] kits specific for PT and APTT determination were used.

RBC Units

RBC units were obtained from healthy donors at the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (HEMOPE). RBCs were collected in CPD/SAG-M (Fresenius Kabi) and, at the same day, each unit was split into two portions. Right after, one of them received a NaPolyP solution (0.4 mg/mL) freshly prepared. The other portion was considered as control. All manipulations were performed via sterile connecting devices, and units were stored at 4 °C. Three RBC split units were evaluated for each type of analysis.

Quality Control Tests in RBC units

All samples, with or without the NaPolyP (4X) were analyzed by the quality control service, on the 35th day of storage, at HEMOPE, by evaluating hemoglobin, hematocrit, and hemolysis by the XS-1000i-Hematology-Analyzer[®] (Sysmex) and absorption spectroscopy¹⁸. Reference values are hemoglobin > 45 g/unit, hematocrit 50 – 70% and hemolysis < 0.8%. Microbiological tests were also performed using BacT/ALERT[®] culture media (BioMérieux).

Evaluation of Stored RBC Elasticity

In order to evaluate the RBC elastic constant (named here as “elasticity”), cells obtained from units, with or without the NaPolyP, were evaluated by an optical tweezers system. The erythrocyte elasticity provides information about its deformability. The optical tweezers system used in this work consisted of a laser beam operating in the near infrared spectral region ($\lambda = 1064 \text{ nm}$ – IPG Photonics) focused on a microscope (Axiolab – Carl Zeiss) through an objective of 100X (NA = 1.25). For the measurements, RBCs (diluted in blood serum – 1:1000 μL) were analyzed in a Neubauer chamber. They were captured by the optical tweezers and dragged against the fluid with six different constant velocities ranging from 140 to 315 $\mu\text{m/s}$ by using a motorized stage (ProScan – Prior Scientific) coupled to the microscope⁶. When an RBC is dragged through the blood serum, they are deformed and a hydrodynamic force and an elastic force act upon the cell. Equilibrium occurs when elastic force cancels the drag force. At equilibrium,

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

where μ is the overall apparent elasticity, $\Delta L = L - L_0$ is the cell length deformation (adopting L_0 as the cell length in the absence of any force), η is the blood serum viscosity (1.65 cP, measured by an Ostwald viscosimeter) and v is the drag velocity applied. The cell is located at a distance Z_1 from the bottom of a Neubauer chamber and Z_2 from the coverslip, $1/Z_{eq} = 1/Z_1 + 1/Z_2$. Therefore, since the blood serum viscosity η , L_0 and Z_{eq} are known, the measurement of the cell length as

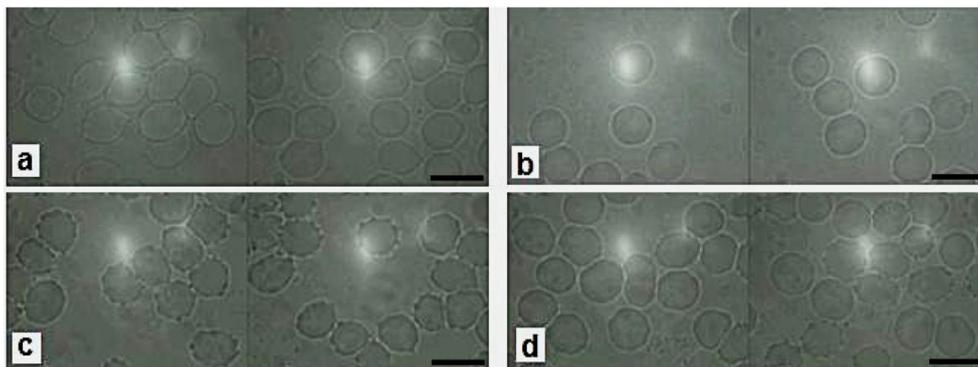


Figure 1. Representative microscopy images from different fields showing: (a) control RBCs after 24 h; (b) RBCs with NaPolyP (0.4 mg/mL) after 24 h; (c) control RBCs after two weeks and (d) RBCs with NaPolyP (0.4 mg/mL) after two weeks. Scale bar = 10 μ m.

function of the drag velocity can be used to extract a value for μ . The cell movement at different velocities was registered with a real-time image capture system integrated with a computer. The L value was measured from video snapshots with Image Pro-Plus software (Media Cybernetics). The snapshots were obtained by using the softwares Virtual Dub (by Avery Lee) and Paint Shop Pro (Corel Corporation). The depth Z_1 was set by focusing the bottom of the Neubauer and then lowering the chamber by the desired amount (in this case 50 μ m) while keeping the cell fixed with the optical tweezers. Elasticity measurements were carried out on the 7th, 21st and 35th days of storage. For analysis, at least 20 cells were measured by each unit in each day.

Statistical Analyses

To examine statistical differences or similarities presented between the groups, we used the Wilcoxon test to the elasticity evaluation and Kruskal-Wallis to the coagulation experiments. Groups were considered significantly different at p values lower than 0.05 (for a two-tail hypothesis).

Results and Discussion

Evaluation of the NaPolyP on the Erythrocyte Morphology

No morphological changes were observed after 24 h, either in control erythrocytes or in those treated with 0.4 mg/mL NaPolyP, as depicted in representative images of Figure 1a and 1b, where RBCs are showing the usual discoid shape. After two weeks, the biconcave phenotype was rare to be observed in control samples (Figure 1c). In contrast, RBCs treated with 0.4 mg/mL NaPolyP presented a lower amount of echinocytes per field, as showed in Figure 1d. Other NaPolyP concentrations tested did not induce significant changes in RBC morphology when compared to control at the same time interval considered previously (data not shown).

The echinocyte morphology may be a response to cellular energy depletion (ATP) and/or increased intracellular calcium concentration. Thus, we believe that NaPolyP treated erythrocytes had their morphology better conserved due to the energy supplied, as well as the antioxidant and chelating Ca^{2+}

properties, provided by this inorganic polymer. A particular feature of the storage lesion is the presence of spherocytes and echinocytes¹⁹. The biconcave form of erythrocyte is essential for the development of its biological function and is also associated with its deformability²⁰. Therefore, these observed images suggest that NaPolyP at 0.4 mg/mL presents potential to be applied for RBCs units' preservation.

Evaluation of the NaPolyP on the Coagulation

The Prothrombin Time (PT) test results showed that the presence of NaPolyP ($n = 9$) did not interfere in the extrinsic coagulation pathway ($p > 0.4$, Figure 2a). On the other hand, the time observed for APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) showed a progressive delay in the onset of coagulation ($p < 0.01$) with the increase of NaPolyP amounts, being more pronounced to the concentration of 1 mg/mL, indicating an influence of NaPolyP on the intrinsic pathway (Figure 2b). Results for control samples were in according to reference values.

Reports have shown that PolyP (from 25 mers) can be a hemostatic regulator and modulates the blood coagulation at various steps, even for concentrations 10-fold smaller than the one applied here^{14,15}. Therefore, this study was carried out to evaluate which role NaPolyP ($n = 9$) could perform on blood clotting, in order to verify its applicability in RBC units for transfusion purposes. It was verified that there was no procoagulant activity, but the opposite. Differently from the previous reported works, NaPolyP ($n = 9$) delayed the coagulation related to the intrinsic pathway, not accelerated. These early studies revealed that PolyPs can exert differential speed-ups on blood clotting depending on the concentration and the polymer length. Those with sizes from 60 to 100 mers (similar to PolyP polymer lengths released by platelets) accelerate effectively the activation mediated by Factor V, whereas those with larger size mediate directly the coagulation through the contact (intrinsic) pathway and increase the polymerization of fibrin^{14,15}. Thus, the opposite result found by us can be due to the difference on the length chain applied in this study. In addition, the coagulation time increase in the presence of NaPolyP ($n = 9$), showed by the APTT data, can be

probably ascribed by the direct action on the sequestration of Ca^{2+} ions, a cofactor agent of coagulation activation to the intrinsic pathway.

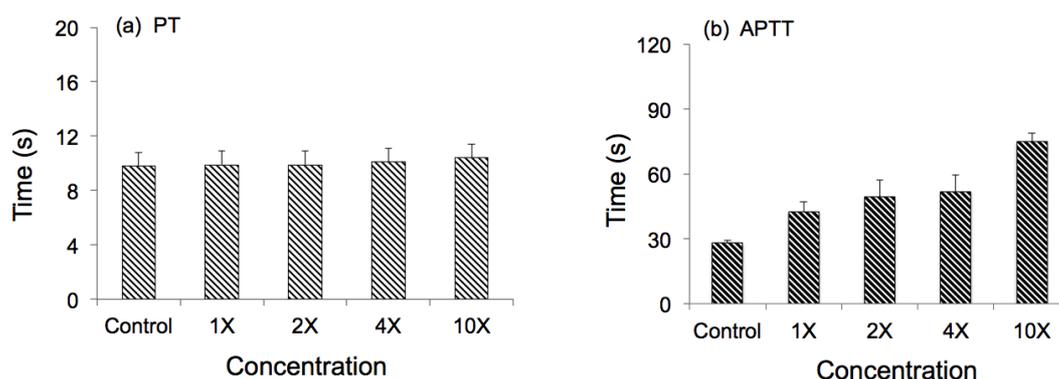


Figure 2. Evolution of (a) Prothrombin Time ($p > 0.4$) and (b) Activated Partial Thromboplastin Time ($p < 0.01$) as a function of NaPolyP concentration ($n = 9$).

Regarding the 2-fold time-delay observed to coagulation (4X concentration), we believe that it does not represent a critical concern, since licensed RBC preservative solutions contain even anticoagulants³. Thus, as it was not detected procoagulant activity, NaPolyP ($n = 9$) may be a promisor additive to RBCs units.

Quality Control Tests in RBC units

The quality control tests showed acceptable results considering the parameters established by blood banks²¹. The presence of NaPolyP, determined on day 35 of storage, did not significantly modify the total amount of free hemoglobin levels, the hematocrit, and the hemolysis. Mean values for hemoglobin, hematocrit, and hemolysis were (51.8 ± 0.3) g/unit, (59.2 ± 0.6)% and (0.6 ± 0.02)%, respectively. Microbiological tests were also negative for all units.

Evaluation of Stored RBC Elasticity

The results of the temporal changes in the elasticity for the control and NaPolyP added samples are shown in Figure 3. The RBC deformability decreases according to storage time ($p < 0.01$, both for day 7 and for 21 when compared to day 35), which is corroborated by previous studies reported in the literature^{4,5}.

On days 7 and 21, there were no significant differences in the elasticity values between NaPolyP treated and control samples ($p > 0.2$). Nevertheless, on day 35, RBCs treated with 0.4 mg/mL of NaPolyP presented a lower elastic constant value when compared to the control ($p < 0.04$), showing to be *ca.* 25% more deformable.

Studies have pointed out to the protein oxidation as the major responsible to the loss of the RBC deformability^{18,22,23,24}. In addition, Snyder and co-authors also showed that the treatment of RBCs with carbon monoxide prevent the echinocyte formation

and the increase of membrane rigidity after exposure to H_2O_2 . Carbon monoxide is known to inhibit the methemoglobin and spectrin-hemoglobin cross-linking formation.

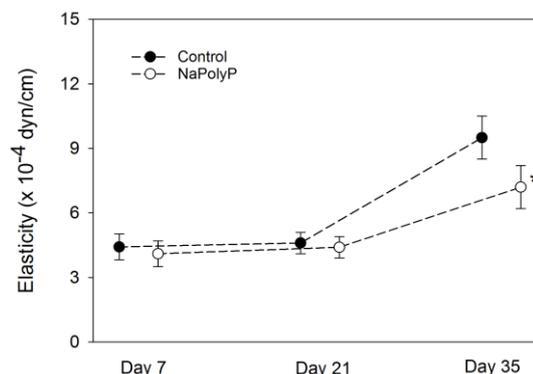


Figure 3. RBC elasticity of control and NaPolyP treated samples as a function of storage time. The asterisk indicates that the result was statically significant on day 35 ($p < 0.04$), when treated and not-treated groups were compared.

Recently, it has also been reported that PolyPs can protect proteins against oxidative stress. Moreover, PolyPs can defend biological systems against the Fenton reaction, in which H_2O_2 interacts with metal ions, such as Fe^{2+} , and generates the hydroxyl radical (OH^{\bullet}), considered the most reactive ROS. The Fenton reaction is one of the major oxidative routes in erythrocytes due to the hemoglobin iron and leads not only to the production of OH^{\bullet} but also of the methemoglobin^{13,25,26}. Thus, our findings, supported by previously studies, suggest that these directly and indirectly protections of PolyPs from oxidative stress were responsible for the improvement of the deformability observed on day 35. Moreover, we also believe that other PolyPs properties, such as being a source of energy also helped in this process. The defence against the Fenton reaction and methemoglobin formation can

also reinforce the lower amount of echinocytes observed in PolyP treated samples of Figure 1.

Conclusions

By concluding, our results showed that the NaPolyP (n= 9, 0.4 mg/mL) does not promote procoagulant activity, guarantees the preservation of the erythrocyte biconcave morphology, as well as improves the RBC deformability without interfering with the quality control parameters. Thus, this short-chain polyphosphate showed to be a potential additive to RBCs units. However, further studies deserve attention in order to better understand the role of this small polymer on blood biophysical and biochemical properties.

Acknowledgements

Authors are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE, and HEMOPE. This work is also linked to National Institute of Photonics and National Institute of Science and Blood Technology.

References

- R.L. Sparrow, *Transfusion Medicine Reviews*, 2015, **29**, 120 – 126
- G. Bosman, *Frontiers in Physiology*, 2013, **4**, 376-1 – 376-8.
- R. L. Sparrow, *Blood Transfusion*, 2012, **10** (Suppl. 2), s7 – s11.
- A. Daly, J.S. Raval, J.H. Waters, M.H. Yazer and M.V. Kamenewa, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2014, **56**, 337 – 345.
- D. C. N. Silva, C. N. Jovino, C. A. L. Silva, H. P. Fernandes, M. M. Filho, S .C. Lucena, A. M. D. N. Costa, C. L Cesar, M. L Barjas-Castro, B. S. Santos and A. Fontes, *Plos One*, 2012, **7**, e31778.
- A. Fontes, M. L. B. Castro, M. M. Brandão, H. P. Fernandes, A. A. Thomaz, R. R. Huruta, L. Y. Pozzo, L. C. Barbosa, F. F. Costa, S. T. O. Saad and C. L. Cesar, *Journal Optics*, 2011, **13**, 044012.
- J. S. Raval, J. Fontes, U. Banerjee, M. H. Yazer, E. Mank and A. F. Palmer, *Transfusion Medicine*, 2013, **23**, 87 – 93.
- S.R. Stowell, N.H. Smith, J.C. Zimring, X. Fu, A.F Palmer, J. Fontes, U. Banerjee, and M. H. Yazer, *Transfusion*, 2013, **53**, 2248 – 2257.
- I. S. Kulaev, V. M. Vagabov, T. V. Kulakovskaya, *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, 2. John Wiley & Sons, 45-51, 2004.
- A. Kornberg, N. N. Rao and D. Ault-riché, *Annu. Rev. Biochem*, 1999, **68**, 89–125.
- T. T. Cowling, H. H. C. Birnboim, *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(13), 9480–9485.
- P. Hourant, *Water*, 2004, **15**, 85–94.
- M. J. Gray and U. Jako, *Curr Opin Microbiol*, 2015, **24**, 1–6.
- S. A. Smith, N. J. Mutch, D. Baskar, P. Rohloff, R. Docampo and J. H. Morrissey, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(4), 903–908.
- S. A. Smith, S. H. Choi, R. Davis-Harrison, J. Huyck, J. Boettcher, C. M. Rienstra, J. H. Morrissey, *Blood*, 2010, **116**, 4353 – 4359.
- S. Greenfield and M. Clift, *International Series in Analytical Chemistry*. v. 57. New York: Pergamon Press, 1974. 155p.
- G. M. D'Amici, C. Mirasole, A. D'Alessandro, T. Yoshida, L. J. Dumont and Zolla L. *Blood Transfusion*, 2012, **10** (Suppl. 2), s46 – s54.
- C.A.L. Silva, C. A. Azevedo Filho, G. Pereira, D.C.N. Silva, M.C.A.B. Castro, A.F. Almeida, S.C.A. Lucena, B. S. Santos, M.L. Barjas-Castro and A. Fontes, *Transfusion Medicine*, 2017.
- B. Blasi, A. D'Alessandro, N. Ramundo, and L. Zolla, *Transfusion Medicine*, 2012, **22**(2), 90–96.
- M. Diez-Silva, M. Dao, J. Han, C.-T. Lim, and S. Suresh, *MRS Bulletin / Materials Research Society*, 2010, **35**(5), 382–388.
- EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE: Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. Recommendation No. R (95) 15, 18th Edition, 2015.
- L.M. Snyder, G. Fairbanks, J. P. Trainor, N.L. Fortier, J.B. Jacobs and L. Leb, *British journal of Haematology*, **59**(3), 1985, 513-522.
- M.A. Srour, Y.Y. Bilito, M. Juma, and M.R. Irhimeh, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2000, **23**(1), 13-21.
- J.P. Hale, C.P. Winlove and P.G. Petrov, *Biophysical journal*, 2011, **101**(8), 1921-1929.
- Y. Richter and B. Fischer, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2006, **11**(8), 1063–1074.
- S. Rachmilovich-Calis, A. Masarwa, N. Meyerstein and D. Meyerstein, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**(5), 2011, 669–674.

7 CONCLUSÕES

- A vitamina E foi eficazmente dispersada em CPD/SAG-M com o auxílio de tensoativos (Tweens 20 e 80). A nanoemulsão permaneceu estável ao longo do período de estudo e suas gotículas apresentaram tamanho médio de 21 ± 5 nm. A vitamina E se manteve estruturalmente íntegra após ser incorporada nas formulações.
- A incubação com a vitamina E nanoemulsionada não alterou os parâmetros de controle de qualidade de CHs. Tanto as amostras controles quanto as com vitamina E emulsionada não apresentaram diferenças significativas.
- A vitamina E nanoemulsionada reduziu a produção de ROS nos CHs de CPD/SAG-M em pelo menos 35% ao longo do período de estocagem.
- Embora tenha reduzido a produção de ROS, a vitamina E nanoemulsionada não modificou a deformabilidade eritrocitária ao longo do período de estocagem, corroborando estudos que indicam que a deformabilidade está mais relacionada à oxidação das proteínas da membrana.
- Os eritrócitos coletados em EDTA, ressuspensos em NaCl 0,9% e tratados com polifosfato de sódio ($n = 9$; 0,4 mg/mL) tiveram sua morfologia bicôncava melhor preservada em comparação aos não tratados, após duas semanas.
- O polifosfato de sódio ($n = 9$) não modificou os tempos de coagulação relacionados à via extrínseca. Já o tempo de coagulação relacionado à via intrínseca aumentou com a concentração de polifosfato de sódio, o que exclui a hipótese de que esse polímero poderia estimular o processo de coagulação.
- A incubação dos CHs em CPD/SAG-M com o polifosfato de sódio não alterou os parâmetros de controle de qualidade ao longo da estocagem.
- Os resultados indicam que eritrócitos provenientes de bolsas de CPD/SAG-M tratados com o polifosfato de sódio ($n = 9$) apresentam cerca de 25% mais deformabilidade que os não tratados no 35º de estocagem. Sugere-se que esses resultados são devido à proteção proteica ao estresse oxidativo, à defesa contra a reação de Fenton e o suprimento de energia proporcionado por esse polímero.

- Como perspectivas de curto prazo objetiva-se: aumentar o número de CHs avaliados com o aditivo polifosfato de sódio. Além disso, pretende-se avaliar a ação do polifosfato de sódio na produção de ROS, estudando sua ação separada em lipídeos e proteínas e na fragilidade osmótica. Em médio prazo pretende-se investigar a ação de outros aditivos tais como um derivado de porfirina que mimetiza a SOD.

APÊNDICE

Outras Avaliações com Vitaminas E e C

1. Introdução:

Esta seção reúne estudos adicionais que avaliaram a ação da nanoemulsão de vitamina E e da vitamina C como possíveis agentes antioxidantes de CHs. Para fins de uma contínua construção do conhecimento sobre as ações da vitamina E em eritrócitos estocados, estudos bioquímicos foram também realizados, incluindo fragilidade osmótica, composição de fosfolípídeos totais de membrana de eritrócitos e dosagem de colesterol de membrana de eritrócitos. Nesta seção, relata-se também as análises da ação da vitamina C sobre os eritrócitos estocados, incluindo também fragilidade osmótica, avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e controle de qualidade.

2. Breve Descrição da Metodologia

2.1 Preparação das Formulações

Devido a sua natureza hidrofóbica, a vitamina E foi solubilizada em meio aquoso, em SAG-M. Em forma de emulsão a interação da vitamina E com os eritrócitos dos CHs se torna possível. A preparação dessas emulsões envolveu a combinação de 3 componentes: SAG-M (50 mL), óleo (160 mg de vitamina E) e tensoativos (265 mg de *Tween* 20 e 265 mg de *Tween* 80). A formulação foi preparada de forma a atingir uma concentração de 0,2 mg/mL no CH (CONSTANTINIDES et al., 2008).

Já como a vitamina C é hidrossolúvel, para esta foi preparada uma solução levando em consideração o estudo de Raval e co-autores (RAVAL et al., 2013). Essa formulação foi também preparada em SAG-M (0,24 g de ácido ascórbico e 10 mL de SAG-M) para atingir uma concentração final de 8,78 mmol L⁻¹ nos CHs.

2.2 Amostra dos Eritrócitos

As hemácias foram obtidas a partir de segmentos de CHs de CPD/SAG-M estocadas no HEMOPE (Parecer 003/09, CAEE 41109115.6.3001.5195). Cada

bolsa foi dividida em 2 unidades de 150 mL. Uma das unidades recebeu 10 mL da formulação da vitamina C ou da vitamina E, conforme concentrações finais descritas na seção 2.1. A outra unidade recebeu a mesma quantidade do solvente (sem vitaminas) e foi considerada como controle. As formulações foram adicionadas às bolsas de sangue de forma asséptica e, em seguida, os CHs foram armazenados a 4 °C. Foram avaliados cinco CHs para a vitamina E e dois para a vitamina C. As diferenças e similaridades estatísticas apresentadas entre grupos controle e teste foram avaliadas por Wilcoxon.

2.3 Controle de Qualidade

Os testes do controle de qualidade foram realizados para amostras contendo ou não as vitaminas no 35º dia de armazenamento, no HEMOPE. Para garantir a qualidade dos CHs, o controle de qualidade é realizado por dois parâmetros: a inspeção visual (alteração de cor, lipemia do sobrenadante, presença de coágulos e vazamentos) e testes estabelecidos na portaria 1352 de 13 de junho de 2011, tais como controle microbiológico, determinação do hematócrito, da hemoglobina e da hemólise (EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES et al. 2015).

2.4 Avaliação das Espécies Reativas de Oxigênio

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi realizada a marcação das hemácias com o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) nos dias: 7, 21 e 35 de armazenamento. Para isso, 500 µL de cada amostra (CHs com e sem vitaminas) foram diluídos em 5 mL de solução salina (0,9%) e lavados 3 vezes por centrifugação. Posteriormente, 10 µL desta solução foram diluídos em 990 µL de solução salina e incubados com 0,5 µL de DCFH-DA por 30 minutos. Depois disso, as amostras foram lavadas novamente 1 vez por centrifugação para remover o excesso do marcador e ressuspendidas em 990 µL de solução salina.

As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo através de histogramas com excitação em 488 nm e detecção no canal FL1 (BD Accuri C6). Também foi realizada a avaliação de um controle positivo usando 1 µL de peróxido de hidrogênio diluído em 50 µL de salina. A quantidade de 10 µL destas soluções foi adicionada às amostras e as espécies reativas de oxigênio foram analisadas pelo mesmo protocolo descrito acima.

A citometria de fluxo identifica a conversão do DCFH-DA em 2',7'-dichlorofluoresceína (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 ROS. Assim quanto maior for a fluorescência detectada, maior é a quantidade de ROS produzida pela célula (AMER et al., 2003). Foram assim avaliadas todas as bolsas de CHs.

2.5 Fragilidade Osmótica

A fragilidade osmótica dos eritrócitos, estocados a curto e longo prazo, das amostras tratadas ou não com vitaminas foi avaliada tal como descrito por Moore e co-autores (MOORE, 1968), após algumas modificações. Diluiu-se as células a serem testadas de 1:100 com solução salina. A seguir, adicionou-se 0,3 mL da solução acima em 4,5 mL de soluções salinas (nas concentrações de 0,9 a 0,3%, com intervalos de 0,1) misturando rapidamente e leu-se a D.O. a 675 nm após 60 segundos, para cada tubo. A partir da densidade óptica, encontrou-se o percentual de hemólise para as diversas concentrações.

2.6 Composição de Lipídeos Totais da Membrana de Eritrócitos

Os lipídeos foram extraídos a partir da membrana de eritrócitos, estocados a curto e longo prazo, como descrito por Folch (1957) (FOLCH & LESS, 1957), com clorofórmio: metanol (2:1, v/v). A extração lipídica foi realizada adicionando-se vagarosamente 0,5 mL de eritrócitos lavados no centro de um tubo contendo 7 mL de metanol sob agitação constante. Posteriormente, foram acrescentados 14 mL de clorofórmio. Filtrou-se a solução final e completou-se com uma solução de clorofórmio/metanol proporcional (2:1 v/v). Em seguida, foram adicionados 10 mL de KCL e as amostras ficaram sob extração por no mínimo 12 horas.

A partir desses extratos, a dosagem de fosfolípidos totais (FLT) das amostras foi realizada pelo método de Bartlett (1959) e a determinação do teor de colesterol das membranas de eritrócitos das amostras foi realizada por espectrofotometria utilizando o método colorimétrico (Labtest Sistemas Diagnósticos Ltda). A absorbância foi medida num espectrofotômetro a $\lambda = 735$ nm (BARTLET, 1959).

3. Resultados

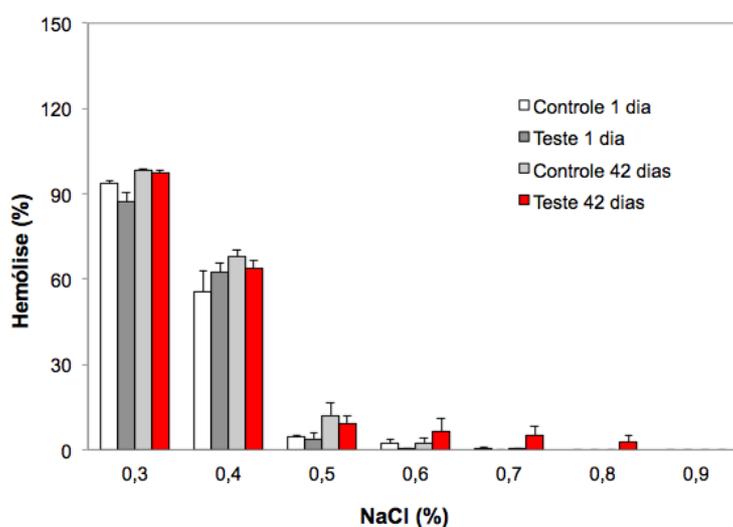
O objetivo principal do estudo bioquímico com a vitamina E foi verificar se a redução de ROS (apresentada no artigo) teria correlação com a composição lipídica e colesterol de membrana eritrocitária, bem como sobre sua resistência a variações osmóticas. Para estes estudos bioquímicos, escolheu-se realizar análises nos extremos do período de armazenamento a fim de detectar variações mais significativas. Com relação aos testes com vitamina C, tratam-se de estudos preliminares que tiveram o objetivo de avaliar o potencial da ação dessa vitamina através da avaliação do controle de qualidade, fragilidade osmótica e produção de ROS e assim realizar uma triagem.

3.1 Vitamina E

- Fragilidade Osmótica

Os resultados da fragilidade osmótica para CHs contendo ou não a vitamina E, estão apresentados na Figura 1. Os resultados demonstram que a percentagem de hemólise de todas as amostras no final da estocagem foi significativamente maior quando comparada ao início ($p < 0,03$). Foi constatado, ainda, que quando os eritrócitos estocados foram incubados com as nanoemulsões com vitamina E, não houve diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,5$).

Figura 1. Fragilidade osmótica em função de concentrações de NaCl, com e sem a emulsão de vitamina E.



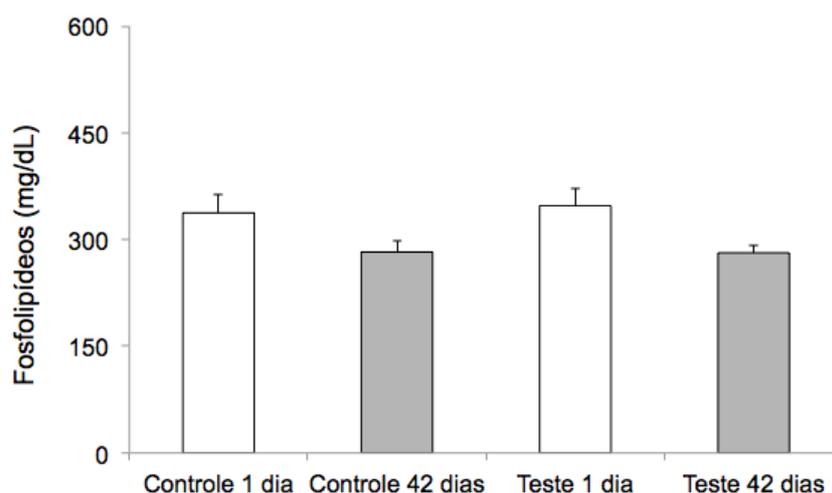
Fonte: o autor.

Estes resultados são corroborados pela literatura que constata que as hemácias, durante o período de estocagem, perdem a resistência à hemólise em meios hipotônicos (RAVAL et al., 2013; ALMIZRAQ et al., 2013). Vários estudos vêm sendo realizados para estabelecer uma correlação entre o aumento da fragilidade osmótica e o estresse oxidativo (SROUR, et al., 2000) e a hemólise (JOHNSON et al., 1994, EDGREEN et al., 2010; LACROIX; TUCCI, 2011; RINALDUCCI et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012; GRAZZINI; VAGLIO, 2012). No entanto, o estresse oxidativo relacionado às proteínas, e não aos lipídeos, tem sido apontado como o fator mais crítico para o comportamento reológico eritrocitário, incluindo a fragilidade osmótica e a elasticidade (SROUR, et al., 2000; KRIEBARDIS et al., 2007; HALE et al., 2011). Dessa forma, sugere-se que a vitamina E não modificou a resistência à hemólise, pois atua principalmente prevenindo a lipoperoxidação.

- Composição de Lipídeos Totais de Membrana de Eritrócitos

Os teores de colesterol e fosfolipídeos obtidos para as membranas dos eritrócitos dos CHs estão apresentados nas Figuras 2 e 3. Os nossos resultados indicaram que a dosagem de fosfolipídeos totais reduziu (cerca de 15%) no último dia em relação ao primeiro em ambas as amostras ($p < 0,04$) com ou sem vitamina E. No entanto, não houve diferença entre as amostras controles e testes ($p > 0,2$).

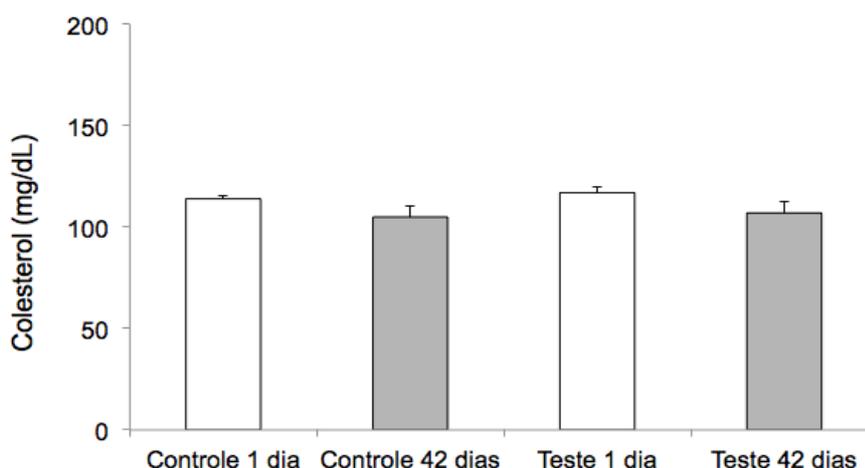
Figura 2. Médias das concentrações de fosfolipídeos totais de membranas de eritrócitos estocados a curto e longo prazo, com e sem vitamina E.



Fonte: o autor.

A dosagem de colesterol (Figura 3) constatou uma redução em torno de 8% do primeiro dia para o último dia de estocagem das amostras ($p < 0,04$). Não houve diferenças significativas entre a concentração de colesterol de membranas de eritrócitos provindos de CHs com e sem nanoemulsão de vitamina E para curto e longo prazo ($p > 0,2$).

Figura 3. Médias das dosagens de colesterol de membranas de eritrócitos estocados a curto e longo prazo, com e sem vitamina E.



Fonte: o autor.

Os valores dos teores de fosfolípidos e colesterol encontrados nesse estudo, bem como a sua redução em função do armazenamento, estão de acordo com dados relatados na literatura, embora tenham sido realizados com bolsas estocadas em outras soluções aditivas e/ou lecoreduzidas (WAGNER et al., 1987; GREENWALT et al., 1990; DRAPER et al., 2002; ALMIZRAQ, et al., 2013).

Ademais, alterações de composição podem levar a alterações na permeabilidade da membrana, de modo a afetar sua resistência a tensões osmóticas podendo se correlacionar então aos resultados encontrados para a fragilidade osmótica e quantificação lipídica em função da estocagem (STOLL et al., 2011).

A perda lipídica ao longo do armazenamento está relacionada à formação de microvesículas que se desprendem da membrana eritrocitária (WILLEKENS et al., 2008). Adicionalmente, Wagner e co-autores relataram que a oxidação da proteína espectralina está correlacionada com a vesiculação (WAGNER et al., 1987). Assim,

mais uma vez reforça-se a hipótese de que a utilização de antioxidantes proteicos podem ser mais efetivos nas lesões de estoque que os que atuam nos lipídeos.

3.2 Vitamina C

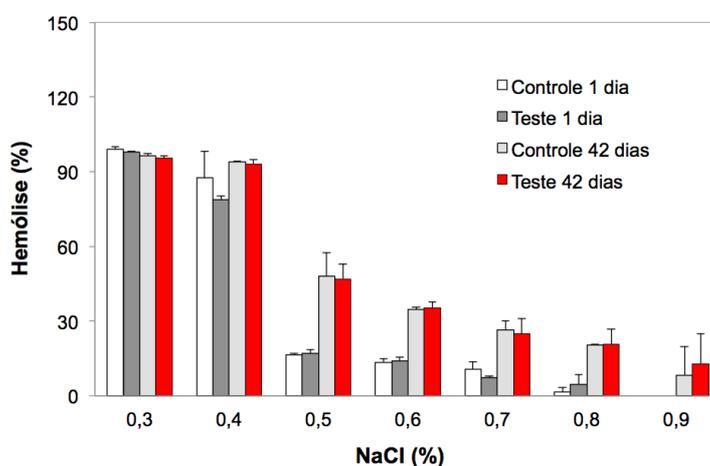
- Controle de Qualidade

Os valores médios para os testes de controle de qualidade realizados no 35° dia de armazenamento para a vitaminas C foram: hematócrito ($57 \pm 0,6$)%, hemoglobina ($48 \pm 0,2$) g/unidade e hemólise ($0,6 \pm 0,02$)%. Não houve diferenças entre as amostras controle e teste. As análises microbiológicas demonstraram que não houve contaminações por bactérias Gram positivas ou negativas neste período. Todas as amostras tiveram valores que estão de acordo com os de referência (50 a 70% de hematócrito; hemoglobina > 45 g/unidade; grau de hemólise < 0,8%) (EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES et al. 2015).

- Fragilidade Osmótica

Os resultados da fragilidade osmótica para CHs contendo ou não a vitaminas C estão apresentados na Figura 4. Assim como para as análises com vitamina E, para todas as amostras houve uma redução na resistência à perturbação causada pela variação da osmolaridade do meio dos eritrócitos ao final da estocagem ($p < 0,03$). Não houve diferença significativa entre CHs contendo ou não vitamina C ($p > 0,4$).

Figura 4. Fragilidade osmótica em função de concentrações de NaCl, com e sem a vitamina C.



Fonte: o autor.

- Avaliação de ROS

O controle positivo de H₂O₂ mostrou que 96,4% das células foram marcadas, demonstrando a eficiência desta sonda fluorescente. As porcentagens indicaram um aumento relativo da produção de ROS em função do período de estocagem para amostras contendo vitamina C em relação ao controle foram: +14±3%, +15±4% e +13±3% para os dias 7, 21 e 35 respectivamente, embora não significativo ($p > 0,3$).

Uma vez que os resultados não foram promissores nessas avaliações, e tendo em vista as experiências desenvolvidas com a pesquisa com a vitamina E, optou-se por não dar prosseguimento a este estudo no momento. Mais análises são necessárias para confirmar esses resultados preliminares.

4. Considerações Finais

As análises bioquímicas indicaram que os eritrócitos de CHs perdem a resistência a perturbações osmóticas, tendem a hemolisar e perdem lipídeos e colesterol de membrana durante a estocagem em bolsas de CPD/SAG-M. A nanoemulsão de vitamina E não interferiu nessas alterações, sugere-se que pelo fato de ser um antioxidante lipídico, uma vez que tais características estão relacionadas com o citoesqueleto. Apesar de ser um estudo preliminar, a vitamina C não modificou os parâmetros de controle de qualidade dos CHs, bem como não alterou a resistência à perturbação causada pela variação da osmolaridade do meio e indicou uma tendência de aumento da marcação por DCFH-DA, embora não significativa, ao longo do período de estocagem. Mais estudos são necessários para melhor elucidar esses pontos, tais como: prevenir e avaliar uma possível fotodegradação da vitamina C, verificar a sensibilidade da metodologia de avaliação da fragilidade osmótica, verificar a influência do pH e aumentar o número de bolsas avaliadas para pelo menos cinco.

5. Referências

ALMIZRAQ, Ruqayyah *et al.* Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. **Transfusion**, v. 53, n. 10, p. 2258-2267, 2013

AMER, Johnny; GOLDFARB, Ada; FIBACH, Eitan. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. **European journal of haematology**, v. 70, n. 2, p. 84-90, 2003.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography, **J. Biol. Chem**, v.234, p. 466-468, 1959.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 6, p. 757–767, 2008.

D'ALESSANDRO, A. *et al.* Time-course investigation of sagm-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: From metabolism to proteomics. **Haematologica**, v. 97, n. 1, p. 107–115, 2012.

DRAPER, C. J.; GREENWALT, T. J.; DUMASWALA, U. J. Biochemical and structural changes in RBCs stored with different plasticizers: the role of hexanol. **Transfusion**, v. 42, n. 7, p. 830-835, 2002.

EDGREN, G. *et al.* Duration of red blood cell storage and survival of transfused patients (CME). **Transfusion**, v. 50, n. 6, p. 1185-1195, 2010.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE: Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. **Recommendation No. R (95) 15**, 18th Edition, 2015.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissues. **J. Biol. Chem.** v. 226, p. 497-510, 1957.

GRAZZINI, G.; VAGLIO, S. Red blood cell storage lesion and adverse clinical outcomes: Post hoc ergo propter hoc? **Blood Transfusion**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 10–12, 2012.

GREENWALT, Tibor J.; BRYAN, Donna J.; DUMASWALA, Umakant J. Erythrocyte Membrane Vesiculation and Changes in Membrane Composition during Storage in Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine-1. **Vox sanguinis**, v. 47, n. 4, p. 261-270, 1984.

HALE, J.P.; WINLOVE, C.P. and PETROV, P.G. Effect of Hydroperoxides on Red Blood Cell Membrane Mechanical Properties. **Biophysical Journal** 101, 1921-1929, 2011.

KRIEBARDIS, A. G. *et al.* Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 148–155, 2007.

LACROIX, J.; TUCCI, M. Impact clinique de la durée de conservation des globules rouges avant transfusion. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, n. 2, p. 97–105, 2011.

MOORE, T. J. Glycerol permeability of human fetal and adult erythrocytes and of a model membrane, **Journal of Lipid Research**, v.9, p. 642-646, 1968.

RAVAL, Jay Suman *et al.* Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. **Transfusion Medicine**, v. 23, n. 2, p. 87-93, 2013.

RIETJENS, Ivonne MCM *et al.* The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 321-333, 2002.

RINALDUCCI, Sara *et al.* Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. **Transfusion**, v. 51, n. 7, p. 1439-1449, 2011.

SROUR, M. A. *et al.* Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 23, n. 1, p. 13-21, 2000.

STOLL, Christoph *et al.* Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 1, p. 474-481, 2011.

UCHENDU, Chidiebere *et al.* Erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation following chronic co-exposure of rats to chlorpyrifos and deltamethrin, and the beneficial effect of alpha-lipoic acid. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 373-378, 2014.

WAGNER, G. M. *et al.* Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. **Blood**, v. 69, n. 6, p. 1777-1781, 1987.

WILLEKENS, Frans LA *et al.* Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? **British journal of haematology**, v. 141, n. 4, p. 549-556, 2008.

ANEXO

NORMAS DA EDITORA DO CAPÍTULO E DAS REVISTAS

Manuscript preparation guidelines

A. Méndez Vilas^{*,1,2} and J. A. Mesa González¹

¹ FORMATEX Research Center, Zurbarán 1, 2-Office 1, 06002 Badajoz, Spain

² Department of Applied Physics, University of Extremadura, Avda. Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain

This document contains a short summary about how to prepare manuscripts before their submission to the book titled: “*Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education*”. Manuscripts have to be formatted according to the current layout and page size. Each manuscript requires an abstract with a maximum length of about ten lines.

Keywords: keyword; keyword

1. General remarks

Submissions to “*Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education*” should be written in correct English. Please consult a native speaker or a knowledgeable colleague for help, if necessary.

Please submit your manuscript exclusively as **one single Word document** including the entire text as well as all tables, figures and references. Please note that **manuscripts must** be restricted to a total of 8 or 12 pages for education-oriented original research papers, and mini-reviews, respectively. Large numbers of figures should be avoided.

Deadline for chapter submission: 15 November 2016

2. Title information

The manuscript should begin with the title of the paper in lower case letters except for proper nouns, certain abbreviations, physical quantities etc. It is followed by the names of all authors (with first name initials or full names) and the corresponding institutions (from the smallest to the largest unit, e.g. group, department, and university) with addresses. Countries should be written in English.

Keywords *must* be provided separated by semicolon.

3. Manuscript layout

3.1 File formats and templates

Please prepare your manuscript electronically using Microsoft Word (or compatible formats like RTF). All textual material of the paper (including tables, captions, etc.) should be in a single file. It is essential that you use the provided **template**. Please use the predefined styles for title, authors, abstract, body etc. Please use Times New Roman, Times or Symbol fonts as much as possible. Some other fonts (e.g., Asian or Russian character fonts) may cause problems and should be avoided.

Section headings on all (preferably not more than three levels) should be consecutively numbered by decimal numbers as 1, 1.1, 1.1.1 etc.

3.2 Figures and tables

Figures must be carefully prepared and submitted ready for reproduction. Lettering and symbols should be clear and large enough in the final figure size. Avoid small open symbols, small dots, small decimal points, and hairlines, close-dotted or short-dashed lines. Draw a closed axes frame in diagrams with the axis titles (quantity followed by the unit in brackets) parallel to the corresponding axis, outside the frame. For numbers, use a

decimal point instead of a comma. For symbols and units, avoid writing alpha, Ohm, deg; use Greek and special characters instead: α , Ω , $^\circ$.

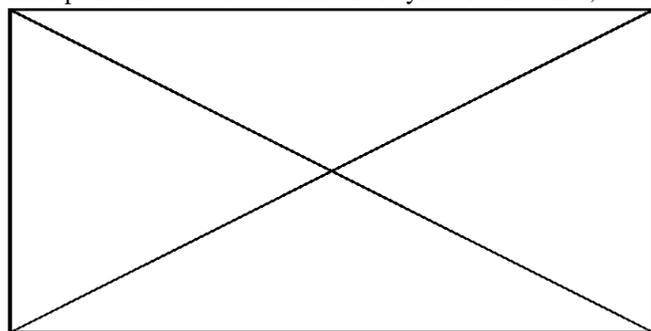


Table 1 Tables will appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned, unless it is very wide and requires the whole page width.

Year	Random data	Random data	Random data
2015	23	89	788
2014	64	73	733

Fig. 1 Figures and tables will appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned.

Figures and tables including captions will be embedded in the manuscript file, in order to indicate their appropriate position and required space. Figures and tables will appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned. Possible arrangements are shown in this document (Figs. 1–3, see also Table 1). Please make sure to use only standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol) or include the fonts in the figure file. When composing a figure, avoid using separate drawing elements in Word such as arrows, symbols or letters, since these are often lost if a figure must be extracted from the Word file during typesetting. All elements of a figure should be grouped together as one graphics object.

In the text, the figures or tables are referred to as “... in Fig. /Table 1” or as “Figure/Table 1 shows ...” at the beginning of a sentence.

Figures and images will appear in black and white (grayscale) in the paperback format and in color in the ebook format. If some author is interested in color reproduction in print, please contact the publisher (color reproduction could have extra costs)

3.3 Quantities, units, and equations

All physical quantities and constants should be given in *italic*, vectors in ***bold italic*** letters. Care should be taken to distinguish subscripts, superscripts, and special symbols. Units should be written in upright letters (not in italics) with a short space to the number before. SI units should be used throughout. Mathematical functions which are tabulated (e.g. sin, cos, exp, e, etc.) should be given in upright letters (not in italics).

Equations may be numbered sequentially. Except for small in-line equations, they should appear on separate lines, such as

$$f(x) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right) \quad (1)$$

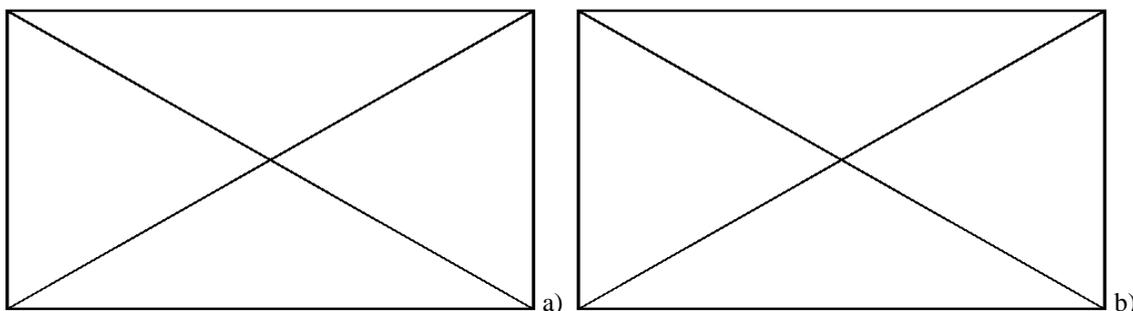


Fig. 2 Two parts of a figure side-by-side. They should be labelled a) and b) either in the figure or adjacent to it. Two figures of similar size with consecutive numbers may be arranged in the same way, with separate captions underneath each figure.

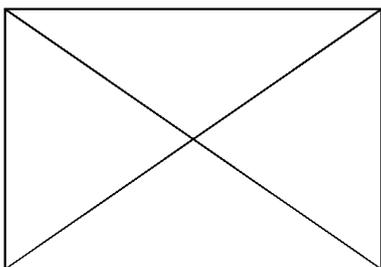


Fig. 3 Figure with side caption. This option is particularly appropriate for a single illustration with a maximum width of about 8 cm which cannot be grouped together with another figure. The figure is placed left-aligned with no indentation. The caption text must not exceed the available space beside the figure. Depending on the position of the figure at the top or the bottom of the page, the caption is also aligned top or bottom, respectively.

In the text, equations may be referred to by writing "... in Eq. (1)". At the beginning of a sentence, use the full form "Equation (1) shows ...".

3.4 Formatting of references

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in square brackets.

References should follow the standards summarized in the NLM's webpage International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References.

Some examples about citation of journal articles, books and websites are shown below.

Acknowledgements The support by XXX is gratefully acknowledged.

References

- [1] Hess ST, Girirajan TP, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*. 2006; 91:4258-72.
- [2] Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
- [3] Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
- [4] Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. *Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK*. New York: Springer; 2002.
- ...
- [10] Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2012 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Transfusion Medicine - Author Guidelines

The editorial policy of *Transfusion Medicine* reflects the interests of clinicians, scientists and other professionals working in the field of transfusion medicine. Authors wishing to submit a paper for publication in *Transfusion Medicine* are asked to follow the guidelines below. Submission of manuscripts

All manuscripts should be submitted online via ScholarOne (formerly known as Manuscript Central) - <http://mc.manuscriptcentral.com/transmed> .

Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you cannot submit online please contact the Editorial Office (transmed.edit@gmail.com)

If you have any queries regarding manuscript submission, please contact Maria Davie in the Editorial Office by email (transmed.edit@gmail.com)

Each article should be accompanied by a covering letter, signed by the main author, which states the following:

'The manuscript has been seen and approved by all authors, it is not under active consideration for publication, has not been accepted for publication, nor has it been published, in full or in part (except in abstract form)'. It should be noted that review of articles cannot proceed until the signed statement is received.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

TEXT

Manuscripts should be submitted online via ScholarOne (formerly known as Manuscript Central) - <http://mc.manuscriptcentral.com/transmed>

COVER PAGE

The first page should bear the title of the paper (which should be brief) and name of the author(s), together with the name of the hospital, laboratory or institution. It should also include the name, email address and full postal address of the author for correspondence and offprint requests; this will appear as a footnote in the journal and the publishers will send the proofs to this author at the given address unless contrary instructions are written on the manuscript. A running title of no more than 50 characters (including spaces) should be included.

PAGE NUMBERING

All pages should be numbered consecutively.

BODY

The body of the paper should normally be divided into Introduction, Materials and Methods, Subjects Studied, Results, Discussion, Acknowledgements and References. SI units should be used throughout and authors should refer to *Units, Symbols and Abbreviations* published by the Royal Society of Medicine. Units should be expressed in the following way: mg mL⁻¹. Numbers are written in full to nine, numerals are used from 10 upwards. Abbreviations must be written in full at the beginning of a sentence. The 24-hour clock is used. Statistical methods should be defined and any not in common use should be described in detail or supported by references. The Editor reserves the right to make literary changes.

WHEN SUBMITTING YOUR MANUSCRIPT, PLEASE ENSURE THAT YOU REFER TO GUIDELINES BELOW WHICH EXPLAIN THE STRUCTURE THAT THE VARIOUS TYPES OF MANUSCRIPT MUST TAKE.

PLEASE NOTE THAT THE EDITOR MAY NOT CONSIDER YOUR MANUSCRIPT FOR PUBLICATION IN *TRANSFUSION MEDICINE* IF THESE GUIDELINES ARE NOT MET.

Original Articles

Should contain a structured abstract of no more than 250 words rather than a summary with the following headings: Objectives; Background; Methods/Materials; Results; Conclusion.

- They should be no longer than 5000 words and contain not more than 60 references and no more than six figures/tables.

Short Communication

Should contain a structured abstract of no more than 200 words rather than a summary with the following headings: Objectives; Background; Methods/Materials; Results; Conclusion.

- They should be no longer than 3000 words and contain no more than 25 references and no more than three tables/figures.

HEADINGS

Sub-headings should be used to guide the reader. The relative importance of headings must be clearly indicated.

ILLUSTRATIONS

These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig. 1, Fig. 2, etc., in order of appearance. Tables and figures should not appear within the main body of the text but on a separate page and identified appropriately. Each figure should have a legend clearly describing it; these legends should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. These should not be larger than A4 and may be in the form of digital files.

Images should be suitable for online viewing. Digital files in accordance with our instructions at http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp can be used by production. EPS (illustrations, graphs, annotated artwork; minimum resolution 800 dpi) and TIFF (micrographs, photographs; minimum resolutions 300 dpi) are recommended, although in some cases other formats can be used. Files should be at print size.

It is the policy of *Transfusion Medicine* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing requires you to complete and return a colour work agreement before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the internet. The web address for the form is: TME CWA Form 2015.

A soft and hard copy of the Colour Work Agreement Form (CWA) must be sent to the following address:

Customer Service (OPI)
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex PO22 9NQ
Fax: +44 (0) 1243 843303/2

Email: tme@wiley.com

Any article received by Wiley Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

ELECTRONIC ARTWORK

We would like to receive your artwork in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

TABLES

These should include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively in Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption.

REFERENCES

Only papers closely related to the work presented should be referred to; exhaustive lists should be avoided. In the text references should give the author's surname with the year of publication in parentheses. If more than one reference is cited, they should be in chronological order. Where the reference contains more than two authors, it should be given at each mention in the text with only the first surname plus *et al.*, e.g. (Smith *et al.* 1989). If citing several papers by the same author(s) and from the same year, add a, b, c, etc., after the year of publication, e.g. (Smith *et al.* 1989 a,b). When more than one reference is made in the text to a book or monograph, referring to different pages, etc., each textual reference should contain the author's surname, the year of publication and the

appropriate page number; the complete reference is thus cited only at the end of the paper. All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order, with names of all authors, titles of journals given in full and with both first and last page numbers given.

Examples:

Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. & Race, R. (1945) A new test for the detection of weak and 'incomplete' Rh agglutinins. *British Journal of Experimental Pathology*, 26, 255-266.

Bowman, J.M., Pollock, J.M. & Biggins, K.R. (1988) Antenatal studies and the management of haemolytic disease of the newborn. In: *Blood Transfusion, Methods in Haematology* (ed. Greenwalt, T.J.), 17, 163-212. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Perry, R.M. (1983) *The occurrence and significance of platelet and granulocyte specific antibodies in bone marrow transplantation*. PhD thesis, University of London.

Unpublished material should be referenced in the text *only* with the authors name and initials.

Authors are responsible for the accuracy of references: they must check every reference in the manuscript and again in the proofs.

AUTHORSHIP

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafting the paper or revising it critically, and
- Approval of the submitted and final versions.

In the Acknowledgments section of the paper all authors, must indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Some examples include

- X performed the research
- Y designed the research study
- Z contributed essential reagents or tools
- A analysed the data
- B wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work. E.g. 'A performed the research, A and C analysed the data and wrote the paper, E contributed the knockout mice for the study and G designed the research study and wrote the paper'.

ETHICAL POLICY AND GUIDELINES

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Read the Editorial on plagiarism by Professor David Roberts [here](#).

The Journal's ethical policies are outlined in the separate document **Ethical Policies of Transfusion Medicine**. Submitted work must comply with this policy, which is based on the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct.

Transfusion Medicine will not consider papers that have been accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication. The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

DISCLOSURE AND COMPETING INTERESTS STATEMENTS

Authors are required to disclose financial interests in any company or institution that might benefit from their publication. A competing interest exists when a primary interest (such as patients' welfare or the validity of

research) might be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). It may arise for the authors of a Transfusion Medicine article when they have a financial interest that may influence their interpretation of their results or those of others. Financial interests are the easiest to define and they have the greatest potential to influence the objectivity, integrity or perceived value of a publication. They may include any or all, but are not limited to, the following:

- Personal financial interests: Stocks or shares in companies that may gain or lose financially through publication; consultant fees or fees from speakers bureaus other forms of remuneration from organisations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication.
- Funding: Research support from organisations that might gain or lose financially through publication of the paper.
- Employment: Recent, present or anticipated employment of you or a family member by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper. Any such competing interest that authors may have should be declared. The aim of the statement is not to eradicate competing interests, as they are almost inevitable. Papers will not be rejected because there is a competing interest, but a declaration on whether or not there are competing interests will be added to the paper.
- Patent rights
- Consultancy work.

All authors must disclose competing interests, or state “none” via the Journal's ScholarOne Manuscripts website.

All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

For papers where there are no competing interests, all authors must include the statement ‘Competing interests: the authors have no competing interests.’ We will also ask reviewers to provide a statement of competing interests.

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

Title

A. N. Authorname,^a A. N. Authorname^b and A. N. Authorname^{c*}

Received 00th January 20xx

Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Abstract text goes here. The abstract should be a single paragraph that summarises the content of the article

A Headings are the primary heading type, e.g.

Introduction, Results and Discussion,

Experimental

□

B Headings should always be subordinate to A headings, e.g.

Synthetic procedures, Materials and methods, Crystallography

□

C Headings should always be subordinate to B headings, e.g.

General procedure for synthesis of compound X of the main

paragraph text follows directly on here.

The main text of the article should appear here with headings as appropriate.

Conclusions

The conclusions section should come in this section at the end of the article, before the acknowledgements.

Acknowledgements

The acknowledgements come at the end of an article after the conclusions and before the notes and references.

Notes and references

Footnotes relating to the main text should appear here. These might include comments relevant to but not central to the matter under discussion, limited experimental and spectral data, and crystallographic data.

^a Address here.

^b Address here.

^c Address here.

* Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

§
§§
etc.

1 Citations should appear here in the format A. Name, B. Name and C. Name, *Journal Title*, 2000, 35, 523; A. Name, B. Name and C. Name, *Journal Title*, 2000, 35, 523.

2 ...

Formatting – please delete this box prior to submission

- Graphics, including tables, will be located at the top or bottom of the column following their first citation in the text during production (unless they are equations, which appear in the flow of the text). They can be single column or double column as appropriate and require appropriate captions.
 - Text is not wrapped around any of the graphics.
 - During production, sufficient space will be inserted around graphics for clarity of reading; a horizontal bar will also be used to separate all inserted graphics, tables and their captions from the text:
-
- Please consult the Styles menu for recommended formatting for all text, including footnotes, references, tables, images and captions.

Please do not adjust margins