

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

YANDILLA SUELLEN DOS SANTOS DA SILVA

**PINÇAS ÓPTICAS E PONTOS QUÂNTICOS PARA AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES ELÉTRICAS E BIOMECÂNICAS ERITROCITÁRIAS: Aplicações
em β Talassemia Intermediária**

Recife

2018

YANDILLA SUELLEN DOS SANTOS DA SILVA

**PINÇAS ÓPTICAS E PONTOS QUÂNTICOS PARA AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES ELÉTRICAS E BIOMECÂNICAS ERITROCITÁRIAS: Aplicações
em β Talassemia Intermediária**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica, da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Biomédica.

Área de Concentração: Bioengenharia

Linha de Pesquisa: Óptica Biomédica

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

Coorientador: Prof. Dr. Diego César Nunes

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

S586p Silva, Yandilla Suellen dos Santos da.

Pinças ópticas e pontos quânticos para avaliação de propriedades elétricas e biomecânicas eritrocitárias: aplicações em β Talassia Intermediária / Yandilla Suellen dos Santos da Silva – 2018.

75folhas, Il., e Abre.

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

Coorientador: Prof. Dr. Diego César Nunes da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2018.

Inclui Referências, Apêndices e Anexos.

1. Engenharia Biomédica. 2. Hemoglobinopatia. 3. Elasticidade. 4. Viscosidade. 5. Carga elétrica da membrana. 6. Eritrócitos. I. Fontes, Adriana (Orientadora). II. Silva, Diego César Nunes da (Coorientador). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2018-423

YANDILLA SUELLEN DOS SANTOS DA SILVA

**PINÇAS ÓPTICAS E PONTOS QUÂNTICOS PARA AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES ELÉTRICAS E BIOMECÂNICAS ERITROCITÁRIAS:
Aplicações em β Talassemia Intermediária**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovado em: 27/02/2018

Área de Concentração: Bioengenharia

Linha de Pesquisa: Óptica Biomédica

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

Coorientador: Prof. Dr. Diego César Nunes

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes (Orientadora)
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE
Doutor pela Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins
Departamento de Engenharia Biomédica – UFPE
Doutor pela Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Givaldo e Suely, por todo amor, dedicação e compreensão. Pelo exemplo que são para mim e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu irmão Kaio, grande amigo de todas as horas.

À minha orientadora, Adriana, pela oportunidade e por ter aceitado me acompanhar desde a graduação. Por todas às vezes que dedicou seu tempo para me ajudar e ensinar. Pela paciência, orientação competente e pelo exemplo que é para todos.

Ao meu co-orientador, Diego, pela ajuda, incentivo e disponibilidade em ensinar.

À Carina e Tiago, pela paciência, amizade, companhia nas longas horas de espera no HEMOPE e por toda ajuda.

Às novas amigas que o mestrado me deu e vou levar para a vida: Pâmela, Thâmara, Anne e Joelle. Obrigada por todos momentos vividos nesses dois anos.

Aos meus amigos da graduação, que me acompanham e apoiam desde 2012: Deborah, Diogenes, Jéssica, Daniel, Breno e Raul. Obrigada a todos pela amizade valiosa.

Aos pacientes e doadores, pela disponibilização das amostras.

A DEUS pela vida, por ter me dado forças e pela oportunidade.

RESUMO

Ferramentas fotônicas, como a pinça óptica (PO) e os pontos quânticos (PQs), vêm sendo cada vez mais utilizadas na área biomédica com o principal objetivo de extrair informações essenciais ao funcionamento celular. A PO é uma ferramenta que utiliza um laser no infravermelho próximo fortemente focalizado e, através da transferência de momento dos fótons, é capaz de exercer uma força suficiente para capturar, manipular, quantificar parâmetros físicos e correlacionar propriedades físicas/químicas de sistemas biológicos, sem qualquer contato mecânico. Por outro lado, os PQs são nanocristais fluorescentes de semicondutores que apresentam excepcional resistência à fotodegradação e superfície ativa para interação biológica. Nesse trabalho, a PO e os PQs foram explorados para caracterizar as propriedades biomecânicas e as cargas elétricas de membrana de eritrócitos. Para tanto inicialmente padronizou-se uma metodologia para determinar a elasticidade e a viscosidade da membrana eritrocitária a partir de um único experimento. A elasticidade foi obtida através da análise da deformação sofrida por eritrócitos capturados e arrastados pelo plasma sanguíneo em função da velocidade. Já a viscosidade da membrana foi determinada correlacionando-se a elongação eritrocitária com o tempo para o qual essas células levam para retornar à sua conformação original, depois de terem sido arrastadas pelo fluido. Adicionalmente, uma metodologia utilizando PQs catiônicos também foi avaliada para analisar a carga elétrica de membrana desses mesmos eritrócitos através de citometria de fluxo. Para isso, PQs de CdTe com emissão verde estabilizados com cisteamina foram sintetizados e caracterizados opticamente. As propriedades biomecânicas e elétricas são parâmetros fundamentais para o desempenho e a sobrevivência dos eritrócitos na microcirculação. Assim, nesse trabalho também foram estudadas células de β talassemia intermediária (Hb β). Os resultados indicaram que os eritrócitos Hb β são significativamente menos elásticos, com a membrana mais viscosa e apresentam carga elétrica membranar reduzida em relação aos normais. Ademais foram desenvolvidas metodologias para a mensuração de propriedades reológicas/elétricas, utilizando a PO e os PQs, eficientes, sensíveis e capazes de propiciar comparações entre eritrócitos normais com aqueles que sofreram modificações por problemas patológicos, tais como os Hb β . Quantificar propriedades biomecânicas e elétricas eritrocitárias é essencial para entender as alterações fisiológicas e contribuir para avanços terapêuticos para essas doenças.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia. Elasticidade. Viscosidade. Carga elétrica da membrana. Eritrócitos.

ABSTRACT

Photonic tools such as the optical tweezer (OT) and quantum dots (QDs) have been increasingly used in the biomedical area. These tools aim to extract essential information necessary to the cellular operation. The OT is a tool that uses a highly focused near infrared laser beam and, through photon momentum transfer, exerts a force sufficient to capture, manipulate, quantify physical parameters, and correlate physical/chemical properties of biological systems, without any contact mechanical. On the other hand, QDs are fluorescent semiconductor nanocrystals that have exceptional resistance to photodegradation and an active surface for biological interaction. Herein, the OT and QDs were explored to characterize biomechanical properties and membrane electrical charges of erythrocyte. To do so, initially, a methodology to determine, in a single experiment, the elasticity and the membrane viscosity of erythrocytes was developed. The elasticity was obtained by analyzing deformations suffered by erythrocytes captured and dragged by blood plasma as a function of velocity. On the other hand, the membrane viscosity was determined by correlating the erythrocyte elongation with the time that this cell takes to return to its original conformation, after being dragged through the fluid. Additionally, a methodology using cationic QDs was also evaluated to analyze the membrane electrical charges of these same erythrocytes through flow cytometry. For this, cysteamine stabilized green emitting CdTe QDs were synthesized and optically characterized. Biomechanical and electrical properties are fundamental parameters for the performance and survival of erythrocytes in the microcirculation. Thus, we also studied β thalassemia intermedia cells (Hb β). Results indicated that Hb β erythrocytes are significantly less elastic, with the membrane more viscous and present a considerable reduction in membrane electrical charges when compared to the normal ones. Moreover, the methodologies here developed to measure the rheological/electrical properties, by using OT and QDs, showed to be efficient, sensitive and able to provide comparisons between normal erythrocytes and those that were modified by pathological problems, such as Hb β . Quantifying biomechanical and electrical properties of erythrocytes is essential for understanding physiological changes and contributing to therapeutic advances for these diseases.

Keywords: Hemoglobinopathy. Elasticity. Viscosity. Membrane electric charge. Erythrocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Sequência de amplificação e maturação no desenvolvimento de eritrócitos maduros a partir do proeritroblasto	16
Figura 2 –	Produção de eritropoietina pelo rim.....	17
Figura 3 –	Estrutura da hemoglobina normal HbA.....	18
Figura 4 –	Locais de hematopoese durante o desenvolvimento humano.....	19
Figura 5 –	Biossíntese do grupo heme.....	19
Figura 6 –	Produção dos diferentes tipos de hemoglobina durante o desenvolvimento humano.....	20
Figura 7 –	Representação da membrana eritrocitária.....	21
Figura 8 –	Representação do Potencial Zeta.....	25
Figura 9 –	Mecanismos fisiopatológicos e complicações clínicas na β talassemia intermediária.....	30
Figura 10 –	Esquema simplificado do aprisionamento através da pinça óptica,.....	32
Figura 11 –	Absorção dos pigmentos de melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda.....	32
Figura 12 –	Destacando a relação entre tamanho e fluorescência dos PQs.....	35
Figura 13 –	Características dos PQ para detecção biológica.....	35
Figura 14 –	Estrutura de um PQ fluorescente conjugado a uma biomolécula.....	37
Figura 15 –	Estrutura de alguns agentes estabilizantes. A: AMA, B: AMP, C: AMS, D: CIS, E: CISTM.....	37
Figura 16 –	Ilustração do sistema de pinça óptica.....	40
Figura 17 –	Esquema geral do experimento.....	42
Figura 18 –	Esquema da mensuração do tempo de retorno do eritrócito.....	42
Figura 19 –	Deformação do eritrócito em função do tempo.....	43
Figura 20 –	Representação de parte do painel de controle da plataforma Labview utilizada para mensuração da elasticidade/viscosidade.....	44
Figura 21 –	Esquema da síntese dos PQs em meio aquoso.....	45
Figura 22 –	Citometria de Fluxo.....	47
Figura 23 –	Box Plot dos valores da elasticidade dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β ($p=0,0001$).....	48

Figura 24 –	Box Plot dos valores do tempo de retorno dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β (p= 0,0001).....	49
Figura 25 –	Deformação do eritrócito em função do tempo - HbA (A) e Hb β (B).....	50
Figura 26 –	Box Plot dos valores da viscosidade dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β (p= 0,0004).....	50
Figura 27 –	Emissão (linha sólida) e absorção (linha tracejada). Emissão no verde em 542 nm. Excitação em 365 nm.....	53
Figura 28 –	Histogramas de fluorescência característicos após marcação com PQs, obtidos através de citometria de fluxo, de eritrócitos HbA (a) e Hb β (b).....	53
Figura 29 –	Esfregaço de sangue total β Talassemia.....	54
Figura 30 –	β talassemia maior com poiquilocitose, eritroblasto, policromasia, corpúsculos de Howell-Jolly.....	54
Figura 31 –	Box plot da porcentagem de marcação das populações de eritrócitos HbA e Hb β quando incubados com os PQs, p < 0,001..	55
Figura 32 –	Box plot da mediana da intensidade de fluorescência das populações de eritrócitos HbA e Hb β quando incubados com os PQs, p < 0,001.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe ²⁺	Ferro reduzido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Filtro de leitura
FSC	Forward scatter
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbO ₂	Hemoglobina oxigenada
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Anemia falciforme
HbAS	Traço falciforme
HU	Hidroxiureia
NA	Abertura numérica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PO	Pinça Óptica
PQ	Pontos Quântico
RNA	ácido ribonucleico
SSC	Side scatter

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	O ERITRÓCITO	16
3.1.1	A Hemoglobina	17
3.1.2	A Membrana Eritrocitária	21
3.2	PROPRIEDADES MECÂNICAS E ELÉTRICAS ERITROCITÁRIAS	22
3.2.1	Deformabilidade Celular	22
3.2.2	Propriedades Viscoelásticas dos Eritrócitos	23
3.2.3	Potencial Zeta da Membrana Eritrocitária	25
3.3	DEFEITOS GENÉTICOS DA HEMOGLOBINA (HEMOGLOBINOPATIAS)..	26
3.3.1	Talassemias	28
3.3.2	Talassemia β	29
3.3.3	Talassemia β Intermediária	29
3.4	PINÇA ÓPTICA	31
3.4.1	Princípio Básico	31
3.4.2	Aplicações Hematológicas	33
3.5	PONTOS QUÂNTICOS	34
4	METODOLOGIA	40
4.1	ANÁLISES DA ELASTICIDADE E VISCOSIDADE DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA	40
4.1.1	Amostras	40
4.1.2	Sistema de Pinça Óptica	40
4.1.3	Procedimento Experimental	41
4.2	ANÁLISE DA CARGA ELÉTRICA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA COM PONTOS QUÂNTICOS	44
4.2.1	Síntese e Caracterização dos Pontos Quânticos	44

4.2.2	Amostras	45
4.2.3	Procedimento Experimental	46
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PRINCÍPIOS ÉTICOS	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	MENSURAÇÃO DA ELASTICIDADE E VISCOSIDADE DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA	48
5.2	ANÁLISE DA CARGA ELÉTRICA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA COM PONTOS QUÂNTICOS	52
5.2.1	Caracterização dos Pontos Quânticos	52
5.2.2	Avaliação de Carga da Membrana Eritrocitária	53
6	CONCLUSÃO	58
7	PERSPECTIVAS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE - CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO MICROSCOPY AND IMAGING SCIENCE: PRACTICAL APPROACHES TO APPLIED RESEARCH AND EDUCATION.....	71
	ANEXO A - TRABALHO APRESENTADO NO CONGRESSO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOFÍSICA (2016)...	72
	ANEXO B - A - TRABALHOS APRESENTADOS NO CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOFÍSICA 2017.....	73
	ANEXO C - PARECER COMITÊ DE ÉTICA.....	75

1 INTRODUÇÃO

A incorporação de lasers na microscopia óptica tem contribuído substancialmente para as mais modernas pesquisas na área biomédica, com propósitos de manipulação, medições, diagnóstico, microanálise e reconstrução de imagens. Entre essas técnicas, destaca-se a pinça óptica (PO), uma ferramenta que utiliza luz para capturar e mover partículas (ASHKIN, 1997). Por exercer forças da ordem de piconewtons sobre as partículas capturadas, sua principal aplicação é de interesse microscópico, especialmente no estudo de células e biomoléculas, tais como DNA, RNA e proteínas, que podem ser manipuladas individualmente sem danos térmicos através da transferência de momento de fótons (FONTES *et al.*, 2011). Devido a essas características, a PO também pode ser utilizada, por exemplo, para medir importantes propriedades mecânicas eritrocitárias, tais como adesão e elasticidade (BRANDÃO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012; CRICK *et al.*, 2014).

Uma importante função da PO é extrair a correlação existente entre o mundo mecânico e químico dos diversos sistemas biológicos. A PO pode então não só disparar um evento químico através de uma ação mecânica como também quantificar o reflexo de uma alteração química nas propriedades mecânicas. Isso exemplifica a importância fundamental dessa ferramenta e também justifica a sua ampla utilização. Assim, quando o foco é o estudo de propriedades biomecânicas dos eritrócitos, a PO pode então permitir a avaliação de fatores intrínsecos ou extrínsecos, tais como os relacionados a doenças hematológicas, sobre a reologia dos eritrócitos (SILVA *et al.*, 2012; FONTES *et al.*, 2011).

O bom desempenho das funções dos eritrócitos na corrente sanguínea está altamente associado a sua capacidade de deformação, que é determinada pelas propriedades de elasticidade e viscosidade da sua membrana (FONTES, 2004). A elasticidade, ou constante elástica eritrocitária (μ), é uma grandeza que reflete a capacidade do eritrócito de resistir à deformação. Quanto maior for o valor da constante elástica, mais difícil será deformar o eritrócito para uma dada força aplicada, assim como ocorre quando se trata de constante elástica de molas. Já a viscosidade da membrana ($\eta_{membrana}$) caracteriza a resistência do eritrócito a uma taxa de deformação (KIM *et al.*, 2012). Portanto, a determinação de valores para a elasticidade e viscosidade de membrana eritrocitárias é uma forma de se avaliar a sua deformabilidade. Essa propriedade é crítica para os eritrócitos na microcirculação, pois para transportar oxigênio dos pulmões para os

tecidos, essas células precisam passar por vasos com diâmetros menores que os seus. Portanto, se não forem deformáveis, não conseguirão desempenhar bem esse papel (ENGLISH & MCINTYRE, 2018).

Outro parâmetro crítico para os eritrócitos é o potencial Zeta (ζ), um potencial elétrico repulsivo resultante das cargas elétricas negativas associadas às glicoproteínas (principalmente à glicoforina A) das membranas eritrocitárias. A carga negativa membranar eritrocitária, através desse potencial, atua prevenindo fisiologicamente a interação entre os eritrócitos e entre estes e a parede vascular (STRATTON 1973; FONTES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). É suposto que alterações celulares, tais como as ocorridas em hemoglobinopatias, possam levar à perda de ácido siálico, principal responsável por conferir a carga negativa nas superfícies celulares, resultando em alterações no ζ . Esse agravante pode favorecer a aglutinação eritrocitária na microvasculatura e a oclusão vascular em portadores dessas patologias.

No contexto do ζ , os pontos quânticos (PQs) podem ser uma ferramenta útil para a elucidação da carga elétrica de membrana. Os PQs são nanocristais fluorescentes de semicondutores de tamanhos entre 2 a 10 nm e têm sido bastante utilizados em aplicações biológicas por apresentarem propriedades físico-químicas únicas, tais como: excepcional resistência à fotodegradação e superfície ativa para conjugação (FONTES *et al.*, 2012). Os PQs podem ser positivamente ou negativamente carregados dependendo do agente estabilizante utilizado na sua síntese. Se esse agente possuir um terminal amina, tal como a cisteamina, a carga desses nanocristais será positiva em pH fisiológico. Assim, é possível se utilizar dos PQs catiônicos para analisar a carga elétrica de membrana em eritrócitos, que é também um meio de se avaliar indiretamente o ζ dessas células.

As talassemias são um dos distúrbios genéticos mais comuns e são consideradas uma das doenças genéticas mais difundidas no mundo. A β talassemia intermediária (Hb β) é uma condição clínica de gravidade intermediária entre a talassemia β menor, o transportador assintomático, e a talassemia β maior (dependente de transfusão devido à anemia grave). A β talassemia intermediária tem um amplo espectro clínico, abrangendo desde uma apresentação levemente assintomática com anemia mínima (níveis de hemoglobina 7 – 10 g / dL) até uma condição com anemia acentuada que se torna clinicamente aparente entre 2 – 6 anos de vida (ASADOV *et al.*, 2018). A incidência anual total de indivíduos sintomáticos é estimada em 1 a cada 100.000 em todo o mundo

(SHAWKY & KAMAL, 2012). Apesar da alta incidência dessa doença, a β talassemia intermediária ainda é pouco estudada.

Frente a essa anomalia eritrocitária, é suposto que as alterações sofridas por estas células possam induzir modificações da carga elétrica de suas membranas e da sua deformabilidade. Logo, para o estudo de propriedades biomecânicas e cargas elétricas de membrana dos eritrócitos, a PO e os PQs podem ser ferramentas sensíveis para se realizar estudos comparativos entre eritrócitos normais e os que foram alterados por algum fator, como em doenças hematológicas. Assim, essa dissertação não só apresenta a padronização de uma metodologia para se obter a elasticidade e a viscosidade de membrana eritrocitária a partir de um único experimento através das POs, como também a utilização de PQs e citometria de fluxo para se avaliar a carga elétrica de membrana em eritrócitos.

Adicionalmente, também são apresentados os resultados obtidos para essas análises biomecânicas/elétricas em eritrócitos Hb β , comparando-os aos indivíduos saudáveis (controle). Por fim, no apêndice também encontra-se um capítulo de revisão produzido durante essa dissertação que relata as principais aplicações da PO no estudo dos eritrócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar as pinças ópticas e os pontos quânticos como ferramentas fotônicas para determinar propriedades biomecânicas e elétricas de eritrócitos normais e de portadores de β talassemia intermediária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia para mensurar a elasticidade e a viscosidade de membrana de eritrócitos, de forma simultânea, utilizando pinças ópticas;
- Avaliar a elasticidade e viscosidade de membrana eritrocitária de pacientes Hb β em comparação a indivíduos saudáveis (HbA);
- Desenvolver uma metodologia para estudar as alterações na carga elétrica de membrana eritrocitária utilizando pontos quânticos catiônicos;
- Avaliar a carga elétrica de membrana eritrocitária para pacientes Hb β em comparação a indivíduos controle (HbA);

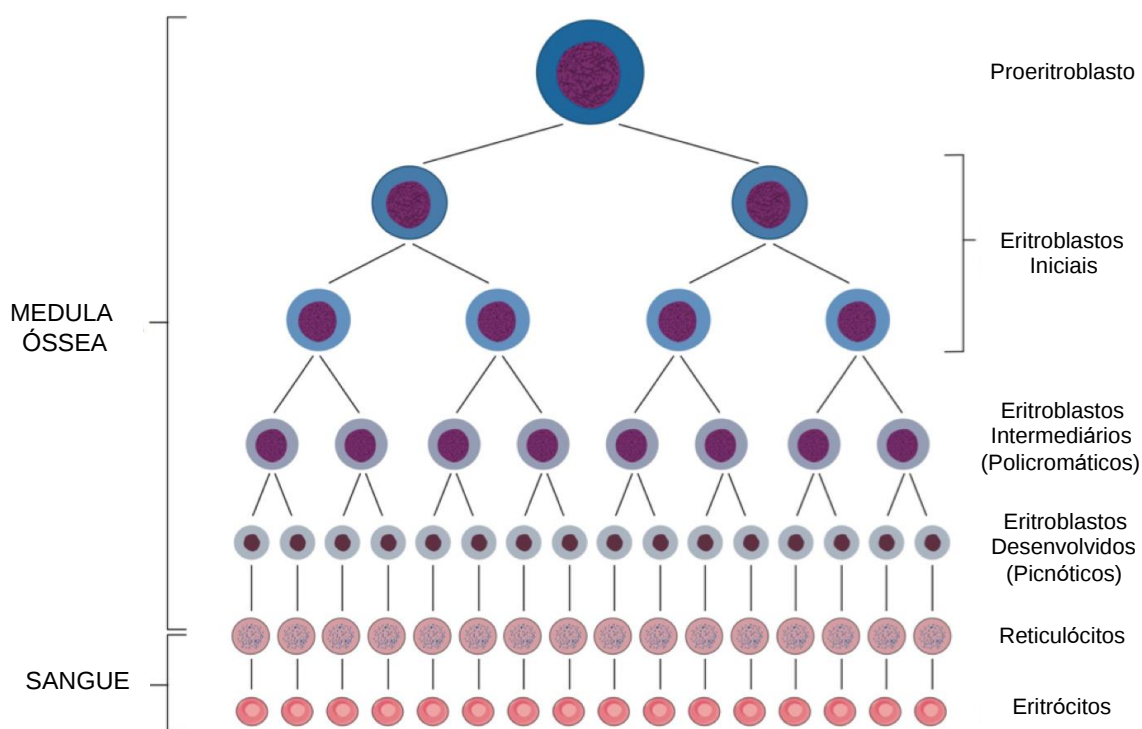
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O ERITRÓCITO

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais abundantes. Também conhecidos como células vermelhas ou hemácias, possuem o formato de disco bicôncavo com diâmetro médio de aproximadamente 8 μm . O seu citoplasma é rico em hemoglobina, que é formada por quatro grupos heme e contém o ferro. Cada eritrócito possui aproximadamente 640 milhões de moléculas de hemoglobina. A principal função dos eritrócitos é realizar as trocas gasosas (BRESNICK *et al.*, 2018).

A produção das células vermelhas do sangue ao longo da vida é o resultado de um processo complexo de diferenciação, a eritropoese, que gera mais de dois milhões de reticulócitos a cada segundo na corrente sanguínea (KADRI *et al.*, 2015). Na medula óssea, esse processo (Figura 1) ocorre a partir de células progenitoras e evolui por meio de células precursoras eritroides nucleadas (eritroblastos) até um estágio de reticulócitos e posteriormente na corrente sanguínea aos eritrócitos maduros (BRESNICK *et al.*, 2018).

Figura 1. Sequência de amplificação e maturação no desenvolvimento de eritrócitos maduros a partir do proeritroblasto.

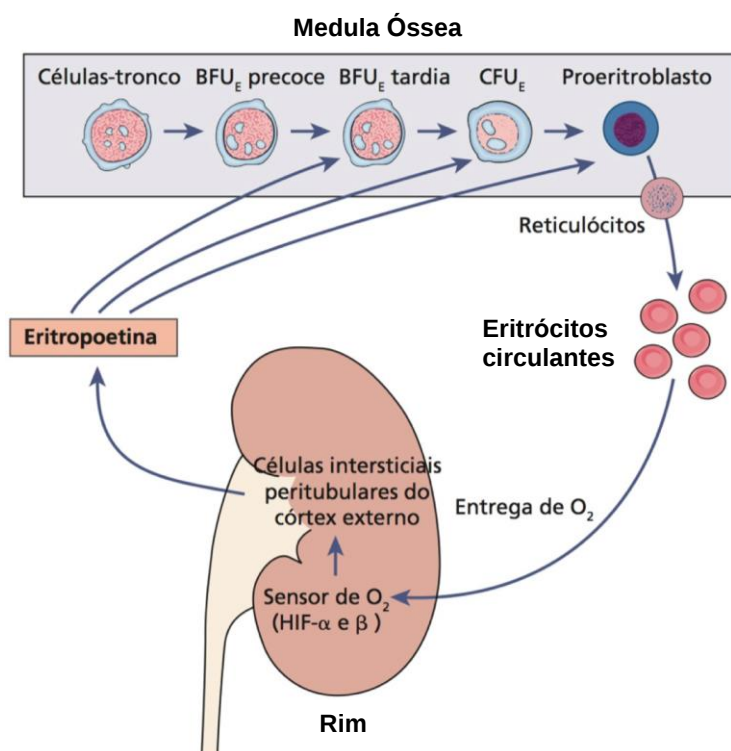


Fonte: HOFFBRAND & MOSS, 2013.

Fatores de crescimento, como a eritropoietina (Figura 2), controlam e estimulam a

produção dos eritrócitos. Esse hormônio, produzido principalmente no tecido renal, atua sobre as células precursoras na medula induzindo a sua maturação (PERREAULT & VENTERS, 2018).

Figura 2. Produção de eritropoietina pelo rim.



Fonte: HOFFBRAND & MOSS, 2013.

Normalmente, o tempo de vida eritrocitária é de aproximadamente 120 dias. Depois desse período os eritrócitos passam a sofrer várias alterações morfológicas, causadas especialmente pela redução de sua atividade metabólica e pela oxidação da hemoglobina (GHAFFARI, 2008).

3.1.1 A Hemoglobina

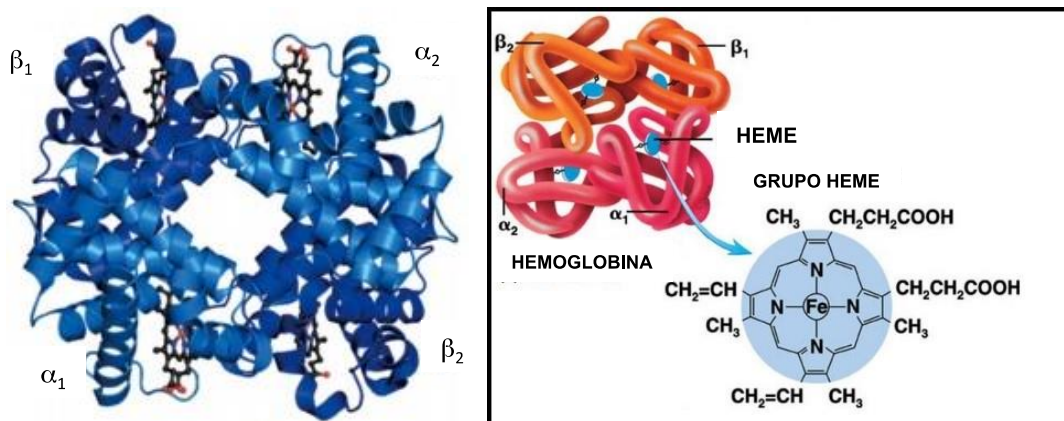
A hemoglobina é a proteína mais conhecida e estudada em seus aspectos fisiológico, genético e bioquímico (NAOUM & NAOUM, 2004; OLIVEIRA & MORAES, 2009). Sendo a principal proteína dos eritrócitos, corresponde a 95% do seu conteúdo citoplasmático (ÇIMEN, 2008), é especializada no transporte de oxigênio (O₂) aos tecidos e no retorno de dióxido de carbono (CO₂) dos tecidos para os pulmões e na regulação do equilíbrio ácido-base (ENGLISH & MCINTYRE, 2018).

Em humanos, a hemoglobina normal no adulto (HbA) é uma proteína de estrutura

globular tetramérica formada por quatro cadeias polipeptídicas (globinas) cada uma delas associada a um grupo prostético heme (LEHNINGER & COX, 2006). A parte proteica é constituída por duas cadeias globinas do tipo alfa (α), com 141 aminoácidos em cada uma, e duas cadeias globinas beta (β), com 146 aminoácidos em cada. O pigmento heme é formado por um anel porfirínico que acomoda em seu centro um átomo de ferro no estado reduzido (Fe^{2+}) ligado a quatro átomos de nitrogênio (Figura 3). O ferro presente nesse pigmento se combina com o oxigênio de forma reversível e confere à molécula a sua capacidade de transportar o gás (DICKERSON & GEIS, 1983; YUAN *et al.*, 2015). A hemoglobina pode ser saturada com moléculas de oxigênio (oxihemoglobina), ou dessaturada (sem oxigênio). Como já foi citado, cada uma das quatro cadeias da hemoglobina possuem um grupo heme, podendo se ligar a moléculas tais como o oxigênio (O_2), monóxido de carbono (CO) ou óxido nítrico (NO) (YUAN *et al.*, 2015).

Para realizar sua função, as quatro cadeias de globina da HbA são dobradas de maneira globular formando uma molécula com dimensões aproximadas de 50 x 55 x 64 Å e com peso molecular de 68.000 Daltons (NAOUM, 1987).

Figura 3. Estrutura da hemoglobina normal HbA.

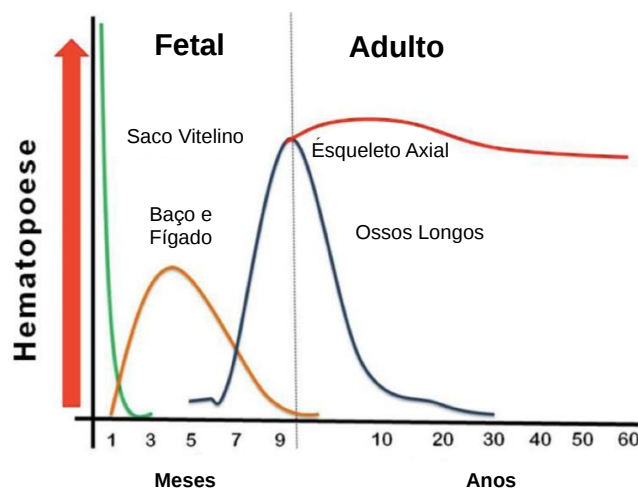


Fonte: YUAN *et al.*, 2015; ROMANELLO, 2013.

A síntese da hemoglobina ocorre nos sítios hematopoiéticos. Esses sítios variam de acordo com a fase de desenvolvimento humano (Figura 4). A hematopoese tem início por volta da terceira semana de gestação. Durante o período embrionário a hematopoese primitiva ocorre no saco vitelínico. Depois do primeiro mês de gestação, o fígado e baço passam a ser o principal local de hematopoese fetal. A medula óssea é o sítio mais importante a partir de 6 a 7 meses de vida fetal, e durante a infância e a vida adulta, é a

única fonte de células sanguíneas (DA CUNHA *et al.*, 2012).

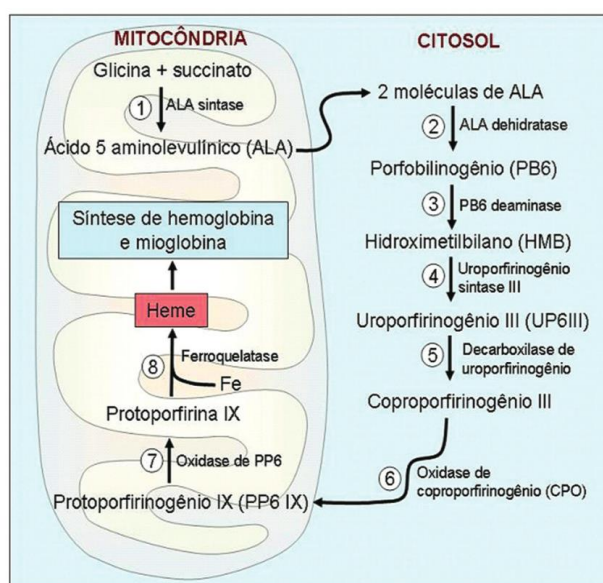
Figura 4. Locais de hematopoiese durante o desenvolvimento humano.



Fonte: DA CUNHA *et al.*, 2012.

A síntese da hemoglobina requer a produção adequada de diferentes proteínas globinas em conjunto com a produção do grupo heme (não proteico). A produção do pigmento heme ocorre principalmente nas mitocôndrias através de uma série de reações bioquímicas que resultam na síntese da protoporfirina (Figura 5). Ao final do processo, a protoporfirina combina-se com o ferro no estado ferroso para a formação do grupo heme. Essas reações dependem de coenzimas importantes, como a vitamina B₆, que é estimulada pela eritropoietina (GROTTO, 2010).

Figura 5. Biossíntese do grupo heme.

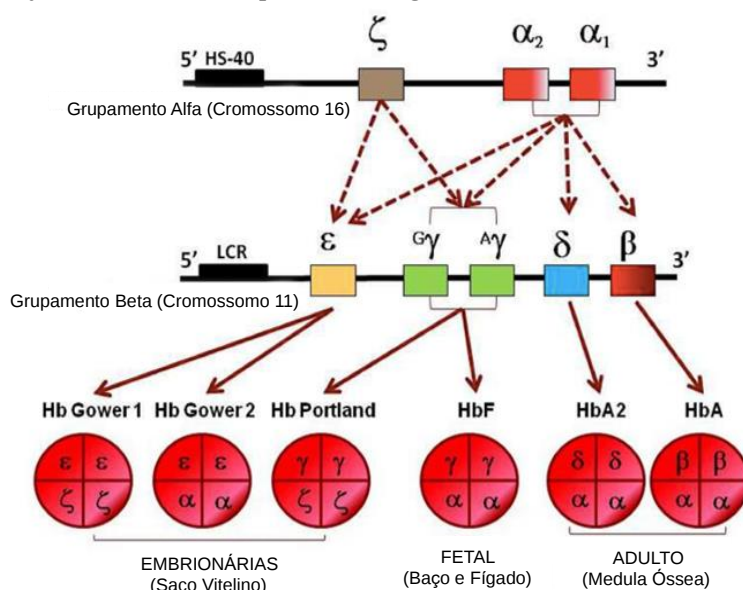


Fonte: GROTTO, 2010.

A síntese das cadeias globinas acontece nos ribossomos e é controlada por dois grupamentos cromossômicos: o α e o β (Figura 6). O grupamento α , que está localizado no cromossomo 16, é responsável pela produção da globina zeta embrionária (ζ) e consiste de dois genes alfa (α_1 e α_2). Por outro lado, o grupamento β está localizado no cromossomo 11 e é composto pelo gene embrionário épsilon (ϵ), pelos genes gama-glicina (γ^G) e gama-alanina (γ^A), pelos genes delta (δ) e beta (β) (TANG *et al.*, 2008). Os genes δ e β são ativados depois do período fetal e são expressos após o nascimento (SCHECHTER, 2008).

No período embrionário existem três hemoglobinas resultantes da expressão de genes embrionários de hemoglobina. A hemoglobina Gower-1 é composta por duas cadeias zeta e duas épsilon ($\zeta_2 \epsilon_2$). Após as semanas iniciais as cadeias α e β começam a ser produzidas e formam a hemoglobina Gower-2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). Após a décima segunda semana gestacional do período embrionário essas hemoglobinas são substituídas pela hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha_2 \gamma_2$) que predomina até a trigésima semana de gestação, quando ocorre o aumento da produção da cadeia β da globina formando a hemoglobina A (HbA, $\alpha_2 \beta_2$) (STAMATOYANNOPOULOS, 2005; STEINBERG, 2005). No nascimento a síntese de HbF representa cerca de 60% e a sua substituição pela HbA se completa até o sexto mês de vida. Em adultos normais a HbA constitui aproximadamente de cerca de 97% do conteúdo total de hemoglobinas e há resquícios de HbF correspondendo a menos de 1% do total de hemoglobina. Outra hemoglobina encontrada no adulto normal é a HbA₂, formada por globinas $\alpha_2 \delta_2$, que representa 1,5 a 3% (STAMATOYANNOPOULOS, 2005; STEINBERG, 2005; ZAGO, 2013).

Figura 6. Produção dos diferentes tipos de hemoglobina durante o desenvolvimento humano.

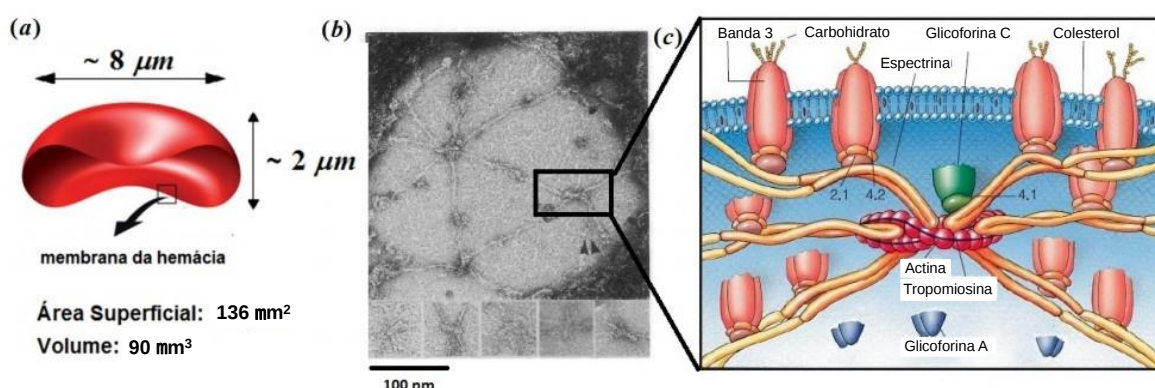


Fonte: DA CUNHA *et al.*, 2012.

3.1.2 A Membrana Eritrocitária

A membrana eritrocitária é uma das membranas mais conhecidas em termos de função e estrutura. Tem como principal função controlar a transferência de diversas moléculas que entram e saem da célula, funciona como uma barreira seletiva. Além disso, também confere ao eritrócito o seu formato de disco bicôncavo e sua deformabilidade. Essa membrana é formada basicamente por proteínas e lipídeos, que se encontram dispostos na superfície de eritrócito de forma bastante complexa (Figura 7). Consiste em uma bicamada lipídica, com proteínas e um citoesqueleto membranar (MURADOR & DEFFUNE, 2007).

Figura 7. Representação da membrana eritrocitária. (a) morfologia de eritrócito normal, (b) rede de espectrina por microscópio eletrônico e (c) membrana eritrocitária e proteínas.



Fonte: PRINCE & SCHRIER, 2008; KIM *et al.* 2012.

A bicamada lipídica representa cerca de 50% da massa total da membrana (MURADOR & DEFFUNE, 2007). É composta por aproximadamente 60% de fosfolipídios, 30% de colesterol e 10% de glicolipídios. Os fosfolipídios se encontram distribuídos na membrana de forma assimétrica, onde na face externa da membrana encontra-se principalmente fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM), enquanto na face interna da membrana fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) são predominantes (YAWATA, 2003).

As proteínas que formam a membrana são classificadas em três grupos. O primeiro grupo é constituído por proteínas do citoesqueleto. As proteínas periféricas formam o citoesqueleto da membrana. A espectrina é a principal proteína periférica, é uma proteína longa, fina e flexível sendo responsável pelo formato do eritrócito e é uma das proteínas responsáveis pela deformabilidade da célula (BOAL, 2002). O segundo grupo é constituído por proteínas integrais (banda 3, glicoforinas), que atravessam e penetram a bicamada

lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. A banda 3 é a principal proteína integral da membrana, e tem função importante na retirada de CO₂ dos tecidos e na regulação do metabolismo da glicose. Além disso, essa proteína ajuda a manter a morfologia eritrocitária e a remover células senescentes (MURADOR & DEFFUNE, 2007). O terceiro grupo é constituído por proteínas de ancoragem, que tem como função a conexão entre as proteínas integrais e do citoesqueleto, tais como a anquirina e a proteína 4.2.

Defeitos na estrutura da membrana eritrocitária, como alteração na densidade das proteínas, podem resultar em alterações morfológicas celulares e desordens de deformabilidade (YAWATA, 2003). Mutações na banda 3, por exemplo, foram associadas a esferocitose e ao aumento da rigidez do eritrócito (JAROLIN, *et al.*, 1998). A deformabilidade destas células é um parâmetro essencial para diagnosticar e entender a ação das doenças hematológicas que comprometem a principal função dessas células, o transporte de gases.

3.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ELÉTRICAS ERITROCITÁRIAS

3.2.1 Deformabilidade Celular

O sistema circulatório transporta oxigênio, gás carbônico, nutrientes, hormônios e as células sanguíneas através de vasos sanguíneos. O diâmetro desses vasos é variável, vai de vasos com grande calibre (alguns centímetros de diâmetro) a vasos de pequeno calibre (poucos micrômetros de diâmetro). Muitos capilares possuem calibres bem menores que o diâmetro dos eritrócitos, que para passar repetidamente por essa microcirculação precisam sofrer uma deformação significativa sem perder a sua integridade (MEYERS & CHEN, 2014; YOON & YOU, 2015). Assim, a deformabilidade dos eritrócitos é um parâmetro fundamental para a homeostase e é um tema de considerado interesse científico (OLUMUYIWA-AKEREDOLU *et al.*, 2017).

A deformabilidade do eritrócito é estabelecida por características celulares, tais como: a razão área de superfície por volume e contorno da membrana (liso ou crenado), pela viscosidade citoplasmática (atribuída especialmente à concentração de hemoglobina) e pelas propriedades elásticas e viscosas dos constituintes da membrana (bicamada lipídica e citoesqueleto) (JOHNSON, 1989; PEARSON, 2001; YOON & YOU, 2015). Para tolerar grandes tensões, a membrana deve ser resistente o suficiente para prevenir fragmentação

da célula e ser flexível o bastante para fluir através dos capilares (EVANS & SKALAK, 1979).

A deformabilidade pode ser afetada de maneira significativa por alterações fisiológicas, tais como alterações na constituição da hemoglobina, defeitos de proteínas da membrana plasmática, modificações na composição lipídica celular, que podem ser decorrentes, por exemplo, de mutações genéticas. Esses fatores podem alterar as características eritrocitárias e gerar a perda ou diminuição da deformabilidade e funcionalidade eritrocitária e, conseqüentemente, levar a uma menor sobrevivência na circulação (BARJAS-CASTRO *et al.*, 2002; SURESH, 2006; SILVA *et al.*, 2012). A redução da deformabilidade traz efeitos diretos sobre a microcirculação, como retardo do fluxo sanguíneo e eventos vasoclusivos em pacientes. Algumas doenças são conhecidas por alterar a deformabilidade das células vermelhas. A anemia falciforme, malária e diabetes mellitus, por exemplo, causam alterações bioquímicas na estrutura da membrana e na estrutura celular, diminuindo a deformabilidade do eritrócito (YOON & YOU, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

3.2.2 Propriedades Viscoelásticas dos Eritrócitos

Materiais flexíveis podem ser caracterizados por propriedades viscoelásticas, exibindo características de armazenamento de energia elástica e dissipação de energia viscosa. O eritrócito é um biomaterial flexível que exhibe propriedades viscoelásticas únicas (HOCHMUTH & WAUGH, 1987; KIM *et al.*, 2012).

Dentre as propriedades de interesse, associadas à deformabilidade dos eritrócitos, merecem destaque: a viscosidade da membrana e citoplasma, e a constante elástica eritrocitária (elasticidade de cisalhamento, ou simplesmente “elasticidade”) (BRANDÃO *et al.*, 2003; BRANDÃO *et al.*, 2009).

Aqui, a grandeza que denominamos como “elasticidade”, reflete a capacidade do eritrócito resistir à deformação. Quanto maior é o valor da constante elástica, mais difícil será deformar o eritrócito para uma dada força aplicada, assim como ocorre quando se trata da constante elástica das molas. Assim, a determinação de valores para a elasticidade é uma forma de se inferir sobre a deformabilidade eritrocitária.

Enquanto a propriedade elástica eritrocitária caracteriza a resistência do eritrócito à deformação, a propriedade viscosa caracteriza a resistência da célula a uma taxa de deformação por unidade de tempo. As propriedades viscosas dos eritrócitos podem ser

estabelecidas pela viscosidade citoplasmática e/ou pela viscosidade da membrana (HOCHMUTH & WAUGH, 1987; KIM *et al.*, 2012). Hochmuth e colaboradores mostraram que as viscosidades do citoplasma e do plasma são desprezíveis comparadas com a viscosidade da membrana para efeitos rápidos, na escala de centenas de milissegundos. Durante o processo de recuperação, após grande deformação dos eritrócitos, a viscosidade da membrana domina a dissipação de energia (EVANS & HOCHMUTH, 1976). Esses autores mostraram que o tempo de retorno é dado por $\tau = \eta_{membrana}/\mu$ sendo $\eta_{membrana}$ a viscosidade da membrana e μ a elasticidade (HOCHMUTH *et al.*, 1987; FONTES, 2004).

Muitos estudos sobre a deformabilidade dos eritrócitos vêm sendo realizados por diferentes métodos experimentais. Devido ao tamanho reduzido dos eritrócitos, as mensurações das forças de deformação são difíceis e trabalhosas. Existem alguns métodos para se avaliar a deformação da célula (BRANDÃO, 2003). Um dos métodos mais comuns é a aspiração por micropipeta (EVANS, 1973; HOCHMUTH *et al.*, 1973; HOCHMUTH & WAUGH, 1987), que funciona por gradiente de pressão. Essa técnica avalia a elasticidade da membrana eritrocitária se baseando na porção da membrana celular que é aspirada, dessa forma não avalia a elasticidade como um todo da célula. Nessa técnica a viscosidade da membrana também pode ser obtida através da mensuração do tempo de recuperação para a forma original a partir da liberação da pressão negativa. No entanto, a pipeta exerce forças acentuadas sobre as células e muitas podem se romper, prejudicando a medição. Outras técnicas também são usadas para avaliar a deformação dessas células, tais como: ectacitometria (BESSIS *et al.*, 1980; JOHNSON, 1989; KUYPERS *et al.*, 1990) e reoscopia (GRONER *et al.*, 1980; SUTERA *et al.*, 1985; DOBBE *et al.*, 2002).

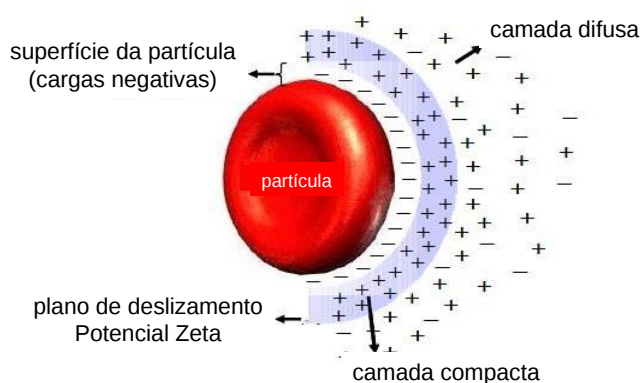
Em 2000, Zhu e colaboradores introduziram o conceito de propriedades aparentes. Nessa definição o autor propõe que as propriedades visco-elásticas mensuradas para as células são dependentes dos modelos e das técnicas aplicadas e não podem ser considerados valores intrínsecos e absolutos, até mesmo pelo fato de se ter que fazer várias simplificações para se caracterizar sistemas biológicos bastante complexos (ZHU *et al.*, 2000). Assim, o mais relevante é que as técnicas usadas para determinação dessas propriedades visco-elásticas sejam na verdade reprodutíveis e sensíveis o suficiente para que possam distinguir diferentes estados biológicos, a fim de serem aplicadas em avaliações comparativas.

3.2.3 Potencial Zeta da Membrana Eritrocitária

O ζ é uma grandeza característica de suspensões coloidais e está também presente em coloides biológicos, como os eritrócitos. Ocorre em decorrência do ácido siálico (ácido acetil neuramínico), presente em algumas glicoproteínas de membrana (principalmente na glicoforina A), que em contato com o meio aquoso polar torna-se negativamente carregada por apresentar em sua estrutura o grupo carboxil (EYLAR, MADOFF, BRODY *et al.*, 1962; HUNTER, 1981).

Quando uma partícula carregada é colocada numa solução eletrolítica, a mesma afeta a distribuição de íons que a circunda, resultando no aumento da concentração de íons de carga oposta à da partícula nas proximidades de sua superfície (HUNTER, 1981). Essa camada de contra-íons circundando a partícula é composta por (Figura 8): uma região mais interna, chamada camada compacta ou camada de Stern (na qual os íons estão fortemente ligados à partícula) e uma mais externa chamada camada difusa (na qual os íons estão ligados fracamente à partícula). Se um campo elétrico for aplicado a esse sistema, a partícula será atraída para o eletrodo de polaridade oposta e quando se movimentar levará consigo os íons mais próximos e mais fortemente ligados a ela (NI & AMME, 2003). O potencial entre a partícula e esse plano de deslizamento e chamado de Potencial Zeta.

Figura 8. Representação do Potencial Zeta.



Fonte: POLLACK & RECKEL, 1977.

Nos eritrócitos o ζ é uma propriedade importante na estabilização destas células em suspensões coloidais, prevenindo que eles se aglutinem não só com outras células, mas principalmente entre elas mesmas. Quanto maior for a camada iônica ao redor da célula, maior será o valor do ζ eritrocitário, tendo importante papel biológico em dificultar a agregação celular, aumentando a repulsão entre os eritrócitos (STRATTON,

RAWLINSON, GUNSON *et al.*, 1973; LUNER, STURGEON, SZKLAREK *et al.*, 1975).

A remoção de moléculas de ácido siálico, pelo tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas ou por outros fatores externos que podem atuar na superfície celular, reduz diretamente a carga elétrica da superfície eritrocitária o que provoca uma redução do ζ (STRATTON, RAWLINSON, GUNSON *et al.*, 1973; LUNER, STURGEON, SZKLAREK *et al.*, 1975). Estudos de Durocher e colaboradores evidenciaram que a perda de ácido siálico leva à alteração de carga elétrica de superfície de células maduras, podendo determinar o sequestro das mesmas pelo sistema reticulo-endotelial e diminuir sua sobrevivência na circulação (DUROCHER, 1975). Outros autores revelaram que células endoteliais também possuem superfícies com carga negativa e que o fluxo sanguíneo na microvasculatura é favorecido pela repulsão elétrica entre os eritrócitos e a parede dos capilares, o que leva a crer que alterações na carga das membranas podem levar a uma maior interação entre os eritrócitos e as paredes dos capilares (DANON & SKUTELSKY, 1976; BORN & PALINSKI, 1989).

No estudo realizado por Tokumasu e coautores (2009) com pacientes portadores da hemoglobina HbC, também foi realizada a análise do ζ e os eritrócitos de indivíduos HbC foram aproximadamente 2 mV menor quando comparados com eritrócitos de indivíduos HbA, indicando assim uma redução no conteúdo de ácido siálico e na carga elétrica de membrana nessas células (TOKUMASU *et al.*, 2009). Outro trabalho em 2012 analisou o ζ em eritrócitos armazenados em bancos de sangue e foi observado uma diminuição de 42% nesse potencial (em consequência da remoção de ácido siálico) ao final do período de estocagem (SILVA *et al.*, 2012).

3.3 DEFEITOS GENÉTICOS DA HEMOGLOBINA (HEMOGLOBINOPATIAS)

As diversas mutações que alteram a expressão dos genes relacionados a hemoglobina normal resultam no grupo de doenças que são chamadas de hemoglobinopatias. Essas alterações são um grupo heterogêneo de doenças que afetam os genes encarregados pela síntese das cadeias globínicas e agrupam tanto doenças em que ocorre alteração quantitativa da síntese de determinada globina, como doenças para as quais ocorre síntese de alguma hemoglobina estruturalmente anormal. Esses distúrbios representam a forma mais comum de anemia hemolítica hereditária (BAIN, 2011; ROMANELLO, 2014).

As hemoglobinopatias estão incluídas entre as doenças genéticas que são

frequentemente encontradas na população humana. Os últimos dados encontrados da OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2008, estimam que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora de alguma hemoglobinopatia (OMS, 2008). A distribuição é bastante heterogênea. As hemoglobinopatias são mais comuns nos países tropicais, mas existem hoje em todo mundo. Essas doenças genéticas também são comuns em população de origem no continente africano, região mediterrânea, sudoeste asiático e oriente médio (HELMI *et al.*, 2017). A alta prevalência das hemoglobinopatias, associada à gravidade das manifestações clínicas dos homozigotos, faz destas um sério problema de saúde pública (HELMI *et al.*, 2017).

Como já referido, as hemoglobinopatias são classificadas em dois grupos gerais: hemoglobinopatias estruturais (distúrbios qualitativos) e funcionais (distúrbios quantitativos). As hemoglobinopatias funcionais são aquelas em que ocorre ausência ou redução de alguma cadeia globínica. São exemplos: talassemias α e β . As estruturais são aquelas que possuem cadeia globínica variante, com alguma anormalidade estrutural, como a anemia falciforme (HbS) e hemoglobinas instáveis. A Tabela 1 exemplifica a classificação (TEIXEIRA, 2014).

Tabela 1. Classificação das Hemoglobinopatias.

Hemoglobinopatias Funcionais	<i>Síndromes Talasêmicas</i>	α talassemias
		- Hereditária (Formas deletoriais e Formas não deletoriais)
		- Adquirida (ATR e ATMDS)
		β talassemias
	<i>Síndrome Falciforme</i>	- Classificação Clínica (β talassemia <i>minor</i> , β talassemia <i>intermedia</i> , β talassemia <i>major</i>)
		- Classificação Genética (β^0 talassemia, β^+ talassemia)
		- Traço Falciforme, HbAS
		- Anemia Falciforme, HbSS
Hemoglobinopatias Estruturais		- Com outras variantes (Doenças da HbSC, HbS/ β talassemia)

	<i>Doença da Hemoglobina C</i>	- Traço, AC - Doença, CC
	<i>Hemoglobinas Instáveis</i>	- Hereditária - Adquiridas

OBS: ATR significa síndrome de α talassemia associada a atraso mental, por mutação do gene ATR; ATMDS significa síndrome com mutação do gene ATR associada a síndrome mielodisplásica. Hemoglobinas instáveis adquirida são descritas após doença mieloproliferativa (policiteima vera). Adaptado de NAOUM & NAOUM, 2017.

Existem aproximadamente 1200 variantes estruturais descritas, mas nem todas têm tradução clínica. A maioria dessas mutações são substituições ou deleções de aminoácidos na base do DNA da cadeia β (GIORDANO *et al.*, 2014). No Brasil as variantes mais comuns e de maior importância clínica são as anemias associadas à HbS e HbC (hemoglobina C) (MELO-REIS *et al.*, 2006)

3.3.1 Talassemias

As talassemias são hemoglobinopatias quantitativas e hereditárias decorrentes de mutações nos genes da globina que provocam uma redução ou ausência na síntese de uma ou mais cadeias das globinas que formam a hemoglobina. As alterações provocadas por essas mutações levam ao desequilíbrio na produção das globinas e, como consequências, ocorrem principalmente anemia hemolítica e eritropoese ineficaz (LIUSONG *et al.* 2017).

De acordo com a cadeia polipeptídica afetada, essa doença apresenta uma grande variedade de sintomas e manifestações laboratoriais. Esses fatores dependem da cadeia globínica afetada e do grau de desequilíbrio na produção dessas cadeias. As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia polipeptídica afetada, sendo as mais frequentes as talassemias do tipo α e as do tipo β . Também são descritas as talassemias do tipo delta, delta-beta e gama-delta-beta, porém são muito raros estes tipos de talassemia (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2016).

Nessa doença, as alterações levam ao acúmulo daquela cadeia cuja produção está preservada. As cadeias acumuladas precipitam e acabam por lesar a membrana dos eritrócitos, levando à destruição prematura dos eritrócitos. A β talassemia intermediária constitui um grupo no qual ocorre uma redução significativa da síntese das cadeias de globina β , levando consequentemente a uma menor produção de hemoglobina A. É uma

hemoglobinopatia sintomática, para a qual os pacientes por vezes necessitam de transfusões e de característica microcítica e hipocrômica (NAOUM, 2007).

3.3.2 Talassemia β

A talassemia β , abrange três apresentações clínicas: talassemia β menor/traço talassêmico β (anemia leve), β talassemia intermediária (de anemia leve a grave, podendo necessitar de transfusões de eritrócitos de forma esporádica ou crônica) e talassemia β maior (anemia grave que necessita de transfusões de eritrócitos cada a 2 a 4 semanas desde os primeiros meses de vida) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O diagnóstico da talassemia é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares (BEZERRA, 2009). O diagnóstico precoce é fundamental para que as pessoas sejam convenientemente cuidadas.

3.3.3 Talassemia β Intermediária

Diferentes interações genéticas resultam nas formas clínicas presentes nessa doença. Nesse caso as pessoas com essa herança apresentam um quadro clínico mais ameno que o da talassemia β maior. A Hb em torno de 7 g/dL é o nível geralmente utilizado como ponto de corte entre a β talassemia intermediária e a talassemia β maior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

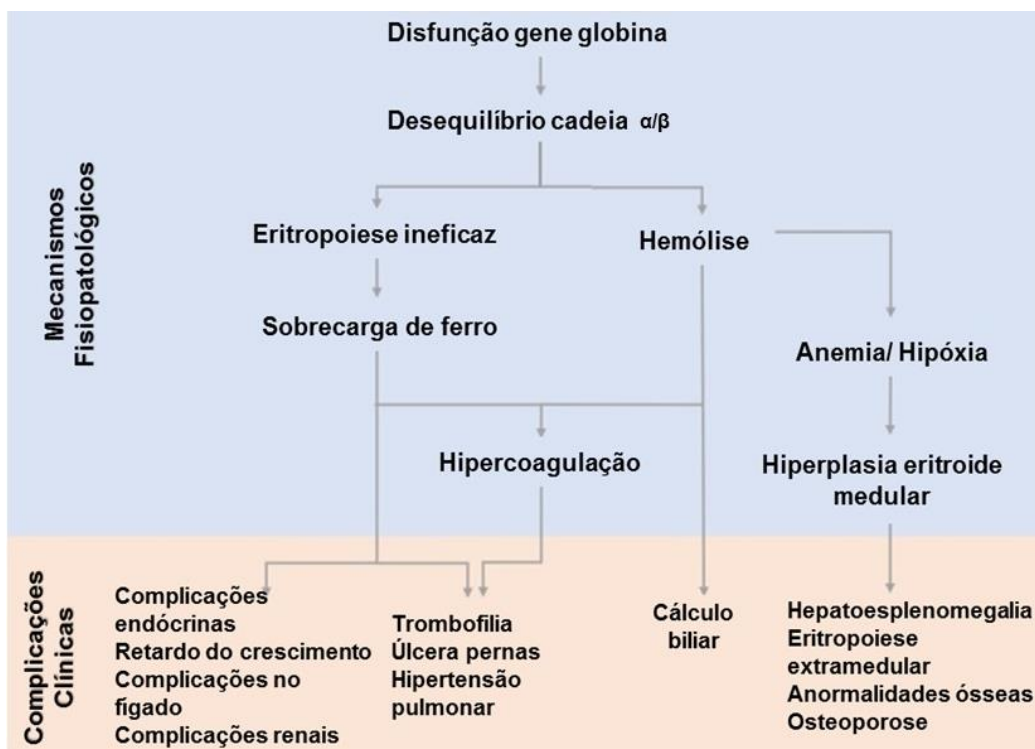
Portanto a definição de talassemia intermediária subentende um diagnóstico clínico que envolve um amplo espectro de fenótipos em dois extremos, em que se distingue desde formas leves até formas graves. Formas leves podem permanecer assintomáticas e bem toleradas até a idade adulta quando, geralmente, se apresentam com marcada hepatoesplenomegalia e sinais de hiperesplenismo (MEHRISHI & RISSO, 2016). A caracterização clínico-laboratorial da β talassemia intermediária é frequentemente dificultada pela grande variabilidade da sintomatologia e dos dados hematológicos dos pacientes.

As complicações clínicas da β talassemia intermediária são decorrentes de três processos principais: eritropoese ineficaz, anemia crônica e sobrecarga de ferro. A gravidade clínica depende primariamente do defeito molecular no gene. A diminuição da síntese de cadeias β leva a um desequilíbrio com as cadeias α . Excessos de cadeias α são extremamente instáveis e precipitam nos precursores eritroides da medula óssea, formando corpos de inclusão, que causam danos à membrana e morte celular, levando à

eritropoese ineficaz. Quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de globinas α livres que precipitam dentro do eritrócito e, conseqüentemente, menor será a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicações clínicas (ASADOV *et al.*, 2018).

A eritropoese leva a uma tal expansão medular (hiperplasia), que ocupa a matriz óssea e provoca osteoporose e deformidades características do crânio e ossos faciais e fraturas patológicas em ossos longos. O *stress* eritropoético a que a medula é constantemente imposta pode determinar compressão por massas eritropoéticas em vários locais, prevalentemente intravertebrais, mas também no fígado ou intra-raqueanas (HAIDAR *et al.*, 2010). O nível de eritropoese ineficaz é o determinante primário no desenvolvimento da anemia. A anemia crônica leva a um aumento da absorção gastrointestinal de ferro, resultando em sobrecarga de ferro, que pode ser a causa de várias complicações sérias, incluindo cardiopatia e anormalidades endócrinas, tais como diabetes mérito e hipogonadismo (TAHER *et al.*, 2006). Pacientes que não recebem tratamento adequado podem apresentar complicações como descrito no esquema da Figura 9.

Figura 9. Mecanismos fisiopatológicos e complicações clínicas na β talassemia intermediária.



Fonte: ASADOV *et al.*, 2018.

O bom desempenho das funções dos eritrócitos na corrente sanguínea está fortemente ligado à sua capacidade de deformação e de impedir agregação, que por sua vez é mantida por essas propriedades de elasticidade celular, viscosidade e carga elétrica de sua membrana. O estudo dessas propriedades se torna importante pois a partir da caracterização desses aspectos pode-se observar o quanto os eritrócitos afetados por essa doença estão com suas propriedades alteradas e como isso pode influenciar na fisiopatologia e no tratamento da doença.

3.4 PINÇA ÓPTICA

De modo geral a PO é uma ferramenta que consiste em um feixe de laser infravermelho fortemente focalizado através da objetiva de grande abertura numérica de um microscópio (ASHKIN, 1970). Sob certas condições, a PO é capaz de capturar e movimentar a amostra, sendo uma ferramenta de micromanipulação bastante aplicada para sistemas biológicos e partículas com tamanho na escala de micrômetros e nanômetros.

3.4.1 Princípio Básico

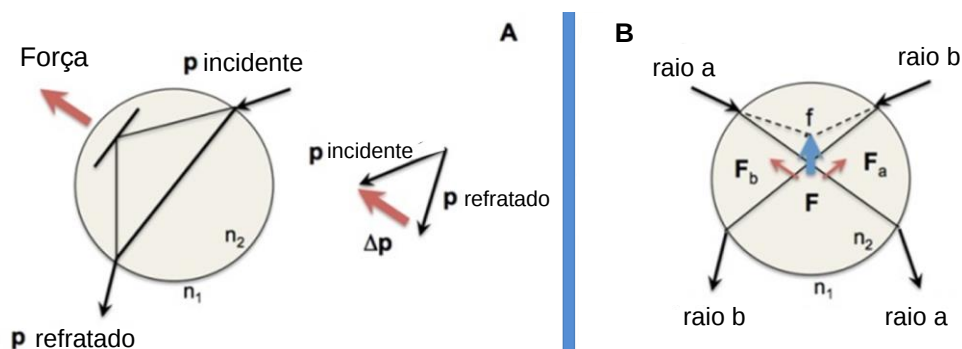
O fenômeno do pinçamento óptico foi descoberto em 1969 nos laboratórios Bell, Estados Unidos, por Arthur Ashkin e colaboradores. Eles demonstraram o uso dessa ferramenta, denominada pinça óptica, baseada na transferência de momento de fótons para capturar partículas dielétricas (ASHKIN *et al.*, 1986).

Com o desenvolvimento da teoria eletromagnética de Maxwell no século XIX, demonstrou-se que a luz é capaz de transferir momento para um meio ao incidir sobre este, exercendo assim uma força sobre este meio. Esta força depende da potência da luz incidente e da sua velocidade de propagação no meio de incidência. Podemos entender o princípio da PO considerando que a luz transporta momento através dos fótons, e por isso é capaz de exercer forças sobre um objeto ao transferir momento para este. Como o momento dos fótons tem uma magnitude muito pequena, a pinça óptica só exerce forças significativas em pequenos objetos, com tamanhos entre 50 nm e 50 μm aproximadamente (SILVA *et al.*, 2017).

Uma forma intuitiva de entender a PO é através da óptica geométrica. Pode-se imaginar o fóton 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 mostra a Figura 10 (a). Os raios a e b da Figura 10 (b) se encontrariam no foco f se não houvesse a esfera. O desvio

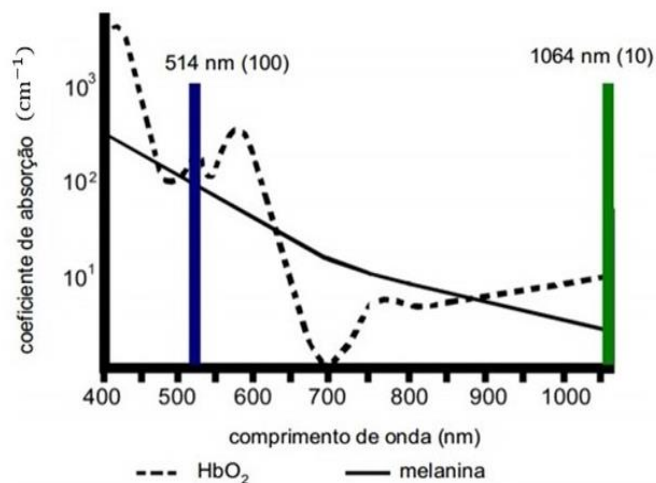
desses raios produz os recuos na direção $\mathbf{F}_a$ e $\mathbf{F}_b$, e a combinação dos dois leva ao recuo na direção $\mathbf{F}$ em (b). Veja que o recuo $\mathbf{F}$ tende a obrigar o centro da esfera a coincidir com o foco do laser f . Desta forma um feixe de laser focalizado cria uma “armadilha” que mantém o centro das partículas no foco do laser. É como tivéssemos sempre uma mola ($\mathbf{F}$ é uma força restauradora, assim como a de uma mola) conectando o centro da partícula ao foco do laser e quando movemos o laser, a partícula acompanha seu movimento tridimensionalmente. É ainda importante que o índice de refração da partícula seja maior que o índice de refração do meio externo, pois do contrário a direção da força resultante $\mathbf{F}$ tenderia a afastar o centro da partícula do foco do laser, expulsando-a ao invés de aprisioná-la. O objeto também não pode ser refletor e não pode absorver a luz do laser, pois essas situações tendem a expulsar e não capturar a partícula (FONTES, 2004).

Figura 10. Esquema simplificado do aprisionamento através da pinça óptica (considerando apenas dois raios de luz de um feixe de laser focalizado na aproximação de óptica geométrica, exemplificando as forças que atuam sobre a partícula para capturá-la).



Fonte: SILVA *et al*, 2017.

Figura 11. Absorção dos pigmentos de melanina e hemoglobina em função do comprimento de onda



Fonte: SILVA, 2010.

A PO vem sendo utilizada desde a década de 70 em aplicações tanto físicas quanto biológicas (ASHKIN, 1970; GRIER, 2003; SPARKES *et al.*, 2017). Desde o seu desenvolvimento, muitas adaptações para aplicações biológicas foram realizadas, tais como a utilização de lasers no infravermelho próximo (785 a 1200 nm). A princípio, Ashkin utilizou um laser de argônio ($\lambda = 514$ nm). Porém, devido ao alto coeficiente de absorção da radiação no comprimento de onda visível pelos tecidos e pigmentos biológicos, esse causava danos aos sistemas vivos levando-os à morte (ASHKIN & DZIEDZIC, 1987). Passaram, então, a utilizar um laser infravermelho, com $\lambda = 1064$ nm. Esse fato caracterizou um avanço importante, pois a maioria das substâncias que compõem os seres vivos são transparentes ao infravermelho, sendo a absorção pequena, não causando danos as estruturas biológicas estudadas. A Figura 11 mostra o comportamento de absorção dos pigmentos de hemoglobina oxigenada (HbO₂) e da melanina em função dos comprimentos de onda (SILVA, 2010).

A PO tem sido basicamente utilizada em duas vertentes: manipulação direta de células, pequenas organelas e biomoléculas (DNA, RNA e proteínas) e quantificação de propriedades mecânicas (tais como: força, adesão, elasticidade e fluidez) desses sistemas biológicos (ZHANG *et al.*, 2008; GREENBERG *et al.*, 2015; BAZONI *et al.*, 2015). No estudo da biologia eritrocitária a utilização da PO para mensuração de propriedades reológicas celulares como a elasticidade vem crescendo.

3.4.2 Aplicações Hematológicas

Como mencionado anteriormente, uma propriedade eritrocitária importante, associada à deformabilidade, que pode ser analisada através da pinça ótica é a elasticidade eritrocitária. Alguns estudos vêm sendo realizados e visam elucidar o comportamento reológico dos eritrócitos afetados por doenças humanas através da PO. Por exemplo, em 2003, Brandão e colaboradores utilizaram a PO para avaliar a elasticidade eritrocitária de 15 pacientes homozigotos de anemia falciforme (HbSS), sendo cinco destes usuários de hidroxiuréia (HU) por pelo menos 6 meses (HbSS/HU), 10 indivíduos com traço falciforme (HbAS) e 35 controles normais. Esta mensuração foi avaliada através da deformação do eritrócito em função da velocidade, resultante do arraste das células contra o fluido plasmático. O estudo revelou que a capacidade de deformação eritrocitária dos indivíduos portadores da HbS (hemoglobina S) (HbSS e HbAS) foi menor quando comparada com a de indivíduos HbA. Entretanto, quando

indivíduos com HbSS fizeram uso de HU, a elasticidade eritrocitária se comportou de modo semelhante a de indivíduos saudáveis (BRANDÃO *et al.*, 2003).

Um estudo de Suresh e colaboradores avaliou as mudanças progressivas das propriedades mecânicas que ocorrem nos eritrócitos quando infectados pelo *Plasmodium falciparum*, causador da Malária. Os autores utilizaram as pinças ópticas para analisar a deformação dos eritrócitos em diferentes fases de desenvolvimento do parasita, imprimindo forças de alongamento distintas e constantes (por exemplo, 68 pN e 151 pN) para deformar os eritrócitos. Foi observado que a rigidez dos eritrócitos é aumentada em até dez vezes em estágios avançados do desenvolvimento do parasita (esquizonte) em comparação com eritrócitos saudáveis (SURESH *et al.*, 2005). Mais aplicações da PO na biomecânica eritrocitária podem ser encontradas no capítulo ao final dessa dissertação (SILVA *et al.*, 2017).

Ademais, o desenvolvimento de técnicas experimentais baseadas em armadilhas ópticas (tais como as pinças ópticas) tem facilitado a deformação mecânica de células biológicas através de forças que variam de dezenas a centenas de piconewtons (pN). Com isso, a utilização de pinças ópticas apresenta algumas vantagens em relação aos métodos anteriormente propostos, tais como: (i) analisa a elasticidade do eritrócito como um todo; (ii) é reprodutível; (iii) possibilita análise individual da célula; (iv) exerce forças muito pequenas e por isso não danifica a célula e permite uma maior sensibilidade na detecção de pequenas alterações nas células (SILVA, 2014).

Portanto, quando o objetivo é o estudo de propriedades biomecânicas eritrocitárias, a PO tem se mostrado uma ferramenta bastante sensível que nos permite fazer estudos comparativos entre eritrócitos normais e eritrócitos que foram alterados por algum fator, como doenças hematológicas, fatores físicos ou químicos.

3.5 PONTOS QUÂNTICOS

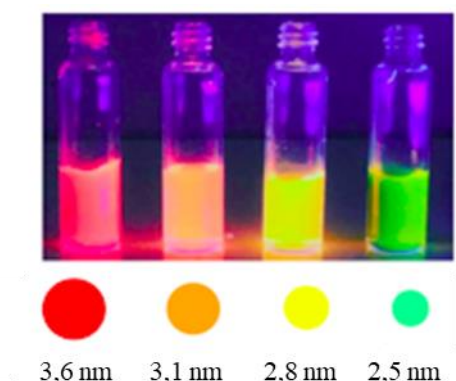
O ponto quântico (PQ) é uma outra ferramenta fotônica que merece destaque. Os PQs são nanocristais fluorescentes de semicondutores e constituem uma nova classe de marcadores fluorescentes. Desde o início da década de 90, os PQs vêm sendo aplicados como novos fluoróforos no diagnóstico e no entendimento de processos celulares em ciências da vida (CUNHA *et al.*, 2018).

Os PQs apresentam geralmente diâmetros entre 2 a 10 nm e podem ser feitos de vários tipos de materiais semicondutores. Geralmente são formados por dois elementos

químicos dos grupos IIB (grupo 12) e VIA (grupo 16) da tabela periódica, mas também podem ser compostos de mais de dois elementos e átomos de outras famílias químicas (PEREIRA *et al.*, 2016). Para exemplificar, tem-se por exemplo os nanocristais de CdTe (Telureto de Cádmio) e CdSe (Seleneto de Cádmio).

As vantagens que esses nanomateriais semicondutores apresentam quando comparados com corantes orgânicos são determinadas pelo tamanho das nanopartículas e não somente por sua composição química (MEDINTZ *et al.*, 2005; MICHALET *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2016). Como o PQ é um material semicondutor nanoestruturado, sua arquitetura é composta por uma banda de valência (BV), preenchida por elétrons, e uma banda de condução (BC), as quais são separadas por um *band gap* de energia (E_g). Quando o PQ absorve energia suficiente, um elétron da BV é promovido para a BC e ao retornar para BV é emitida a fluorescência característica desse nanocristal. Quando alguns materiais se encontram em escala nanométrica, eles exibem diferenciadas propriedades físico-químicas e isso ocorre também para os PQs. Por exemplo, há aumento do E_g com a diminuição do tamanho do nanocristal. Como quanto maior a energia, menor é o comprimento de onda associado, PQs menores emitem fluorescência mais para a região do azul (menores comprimentos de onda), enquanto as maiores fluorescem mais para a região do vermelho (maiores comprimentos de onda). Dessa forma, a emissão de luz por um PQ pode ser sintonizada de acordo com o tamanho da nanopartícula (Figura 12).

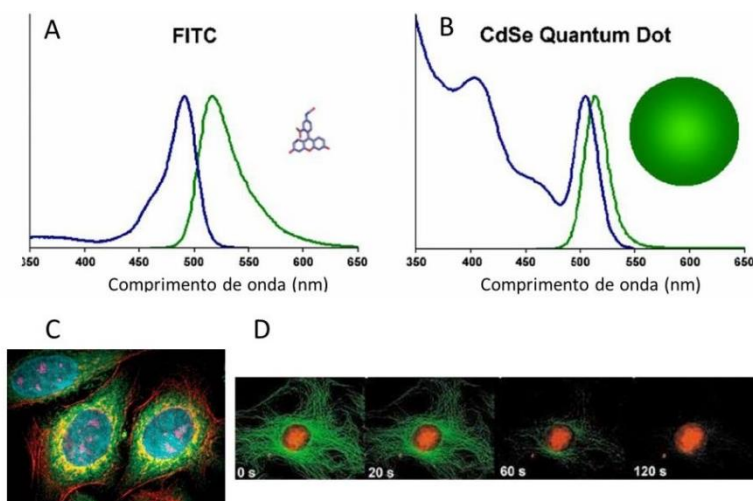
Figura 12. Destacando a relação entre tamanho e fluorescência dos PQs.



Fonte: Grupo de Nanobiotecnologia Biomédica – UFPE.

Figura 13. Características dos PQ para detecção biológica. A: espectros de absorção (azul) e emissão (verde) de um corante orgânico. B: espectros de absorção (azul) e emissão (verde) de um PQ. Nas imagens uma comparação entre esses fluoróforos. C: detecção de 5 alvos diferentes nas

células por PQs excitados por um único comprimento de onda. D: comparação entre a fotodegradação de um corante orgânico (verde – Alexa flúor) e PQs (vermelho).



Adaptada de MEDINTZ *et. al.* 2005.

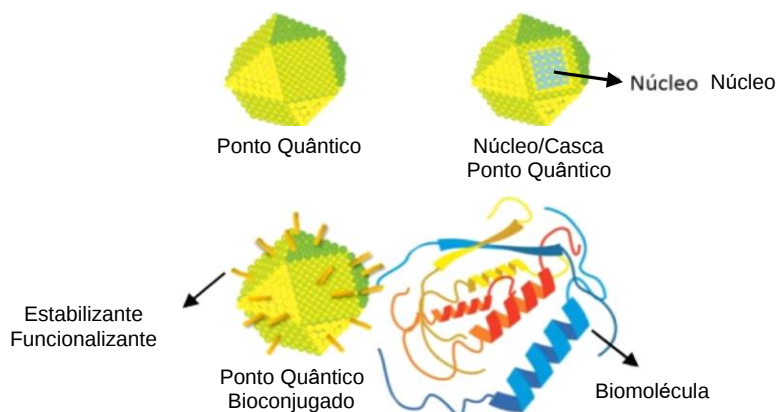
Os PQs vêm sendo empregados largamente como ferramenta alternativa ou complementar aos marcadores fluorescentes orgânicos comumente utilizados, especialmente como marcadores biológicos. Isso se deve ao fato dos PQs apresentarem propriedades físico-químicas que superam as características dos corantes convencionais. Entre essas vantagens estão: (i) largo espectro de absorção, fato que possibilita que vários tamanhos de PQs sejam excitados ao mesmo tempo usando somente um comprimento de onda (Figura 13 C); (ii) estreito espectro de emissão, que facilita marcações multicoloridas (Figura 13 A e B); (iii) alto rendimento quântico de fluorescência; (iv) alta fotoestabilidade (Figura 13 D) (MEDINTZ *et. al.* 2005) e (iv) superfície ativa para conjugação química e interação com o sistema biológico (PEREIRA *et al.*, 2016).

A principal forma de síntese de PQs é a abordagem *bottom-up*, também chamada de química coloidal para a qual se parte dos átomos para se formar uma estrutura maior que é a nanopartícula. Os métodos de síntese química de nanopartículas do tipo *bottom-up* são baseados numa reação de precipitação controlada feita em água ou solventes orgânicos. A síntese dos PQs em água pode ser descrita de forma simples através das etapas a seguir.

Na primeira etapa é feita uma solução aquosa com pH controlado, contendo um sal de um metal de transição e um agente estabilizante que tem o papel de controlar o crescimento do núcleo e também evitar a agregação das nanopartículas. Na segunda

etapa, em atmosfera inerte, acontece a redução de um calcogênio através da ação de um agente redutor. Na terceira etapa, o calcogênio reduzido é adicionado na solução da primeira etapa e a reação continua (em temperatura controlada) até que se tenha o tamanho desejado da nanopartícula (PEREIRA *et al.*, 2016).

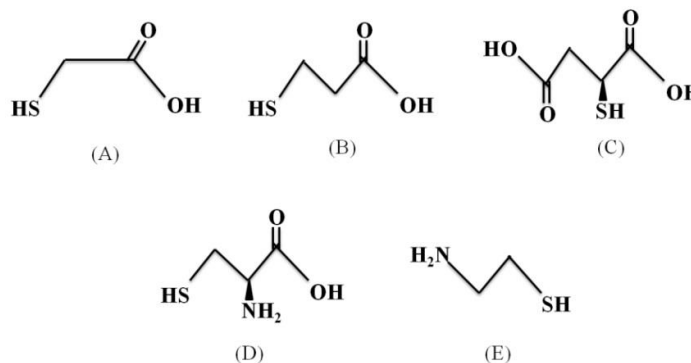
Figura 14. Estrutura de um PQ fluorescente conjugado a uma biomolécula.



Fonte: CESAR, 2014.

Em algumas sínteses, existe a necessidade de uma outra etapa para a passivação. Isso é necessário para se minimizar defeitos de superfície (átomos na superfície com ligações não compartilhadas) que diminuem a eficiência de luminescência dos nanocristais. O processo de passivação leva a formação de uma casca (também de um material semiconductor) ao redor do núcleo da partícula (Figura 14). A passivação é utilizada para refazer ligações não compartilhadas que possam existir na superfície do núcleo do nanocristal, as quais são capazes de reduzir a intensidade da fluorescência dessas nanopartículas (PEREIRA *et al.*, 2016). Este processo diminui os defeitos (que comprometeriam a qualidade da emissão desses nanocristais) e otimiza a eficiência da fluorescência (PEREIRA *et al.*, 2016).

Figura 15. Estrutura de alguns agentes estabilizantes. A: AMA, B: AMP, C: AMS, D: CIS, E: CISTM.



Fonte: O autor

Na síntese é importante a presença do agente estabilizante (como o ácido mercaptossuccínico - AMS), que se liga à superfície das partículas, no intuito de prevenir aglomeração de nanopartículas e precipitação e, desligam-se para não inibir o crescimento, ou seja, é um comportamento dinâmico (*on/off*) em torno dos nanocristais (SILVA *et al.*, 2010; MARTINS & TRINDADE, 2012). Os principais agentes estabilizantes utilizados em PQs coloidais apresentam o grupamento tiol (–SH) em sua estrutura, tais como: ácido mercaptoacético (AMA), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), ácido mercaptossuccínico (AMS), L-cisteína (CIS) e cisteamina (CISTM) (Figura 15). Componentes contendo esses grupamentos tióis são importantes estabilizantes de nanopartículas, pois o enxofre pode atuar como precursor na formação da camada de passivação.

Além disso, os estabilizantes também conferem cargas aos PQs por apresentarem grupos polares, mantendo as partículas afastadas em suspensão e ainda fornecem um grau de funcionalidade às mesmas, atuando como ponte química para interação dos PQs com biomoléculas. Sendo assim, o tipo de interação dos PQs com as biomoléculas depende dos grupos funcionais que estão disponíveis na sua superfície (ácidos carboxílicos ou amins), os quais são determinados pelo agente estabilizante/funcionalizante escolhido na síntese (ROGACH *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2012). Os PQs estabilizados com moléculas que contém grupos amina são positivamente carregados, enquanto que quando estabilizados por compostos carboxilados levam a formação de nanopartículas aniônicas, em pH próximo ao fisiológico.

PQs vêm sendo cada vez mais empregados como marcadores para a análise de propriedades biológicas (PEREIRA *et al.*, 2016). Embora os PQs carboxilados venham sendo mais utilizados que PQs aminados, esses últimos também vêm sendo explorados.

PQs aminados como os estabilizados com cisteamina podem ser promissores para estudos de interações de cargas elétricas, devido a facilidade que esse grupo tem de interagir com as membranas e biomoléculas negativamente carregadas, uma vez que esses PQs são positivamente carregados. Por exemplo, em 2008, Chen e colaboradores utilizaram PQs de CdTe estabilizados com cisteamina para conjugação direta com DNA de fita simples através da atração eletrostática entre grupos amino positivos na superfície dos PQs e a carga negativa do DNA (CHEN, YANG e XU, 2008). Já em

2011, Huang e colaboradores utilizaram PQs catiônicos de CdSe/ZnS para visualizar o decrescimento gradual da carga elétrica de membrana de hemácias ao longo do seu envelhecimento através de microscopia de fluorescência (HUANG, HU, MEHRISHI *et. al.*, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 ANÁLISES DA ELASTICIDADE E VISCOSIDADE DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

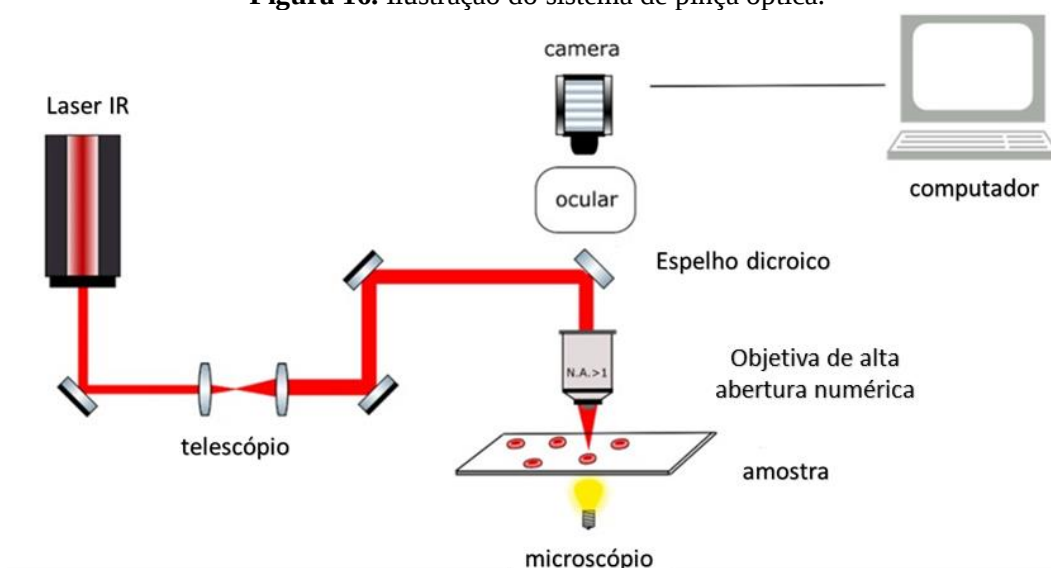
4.1.1 Amostras

As amostras de sangue dos grupos estudados foram coletadas em dois tubos de 3,5 mL a vácuo, um contendo anticoagulante EDTA e outro sem solução anticoagulante. Os eritrócitos, obtidos a partir do tubo de sangue com EDTA após centrifugação a 775 $\times g$, foram diluídos no soro do mesmo paciente na proporção (0,5 μL / 500 μL). Para as análises de elasticidade e viscosidade de membrana foram avaliados 8 pacientes e 8 controles, totalizando mais de 200 células mensuradas para cada condição.

4.1.2 Sistema de Pinça Óptica

O sistema de pinça óptica utilizado consistiu de um feixe de laser infravermelho ($\lambda = 1064 \text{ nm}$ – IPG Photonics) focalizado no material de análise por uma objetiva de 100x, NA = 1,25 de um microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss), como ilustrado na Figura 16. Ao sistema foram adaptadas uma câmera CCD (Samsung) para aquisição de imagens e uma platina motorizada (ProScan, Prior Scientific) para movimentação das células capturadas, ambas controladas por computador.

Figura 16. Ilustração do sistema de pinça óptica.



Fonte: SILVA *et al.*, 2017.

4.1.3 Procedimento Experimental

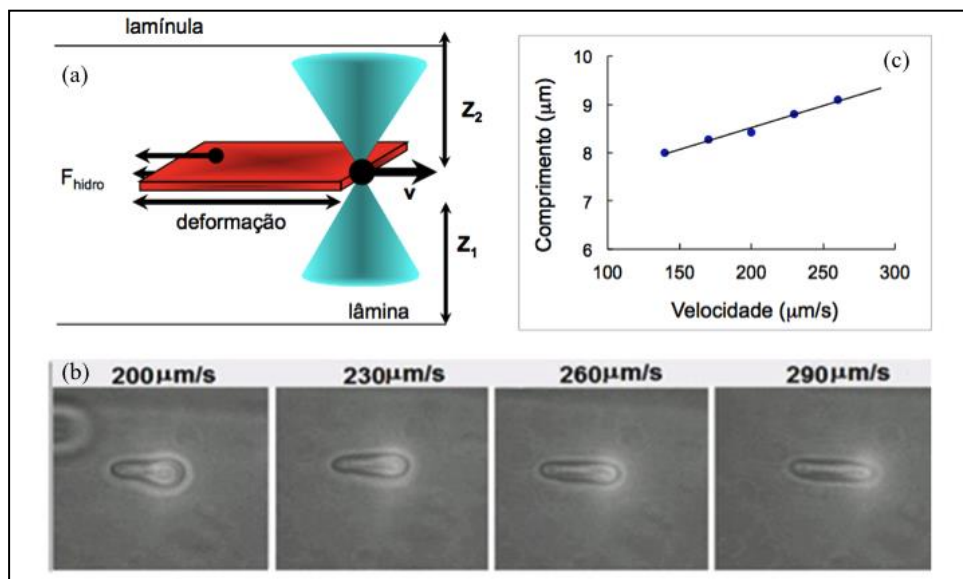
Para a avaliação da elasticidade/viscosidade da membrana eritrocitária, a pinça óptica e a videomicroscopia foram as ferramentas utilizadas. Os experimentos foram realizados em uma câmara de Neubauer (profundidade total de 100 μm) com o eritrócito localizado a uma profundidade Z_1 (50 μm) do fundo e Z_2 (50 μm) da lamínula (Figura 17 a), ajustadas com o foco graduado do microscópio óptico. Na câmara de Neubauer, os eritrócitos foram aprisionados pelo laser e arrastados em 6 velocidades (V) constantes (de 140 $\mu\text{m/s}$ a 315 $\mu\text{m/s}$) contra o soro sanguíneo com viscosidade η (1,65 cP – SILVA *et al.*, 2012), utilizando uma plataforma computacional *Labview* (National Instruments) desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa que sincronizadamente captura as imagens e movimenta a platina motorizada (MOURA *et al.*, 2015).

Quando os eritrócitos foram arrastados no soro, eles sofreram deformações devido a forças hidrodinâmica e elástica (Figura 17 b). A elasticidade foi obtida avaliando-se a alongação máxima (L) sofrida pelo eritrócito após arraste pelas velocidades (V), assim como ilustra a Figura 16 b, utilizando-se a equação (SILVA *et al.*, 2012):

$$L = L_0 + \frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} V \quad \text{Eq. 1}$$

que resulta do equilíbrio das forças hidrodinâmica e elástica que atuam no eritrócito, sendo μ a elasticidade eritrocitária, $1/Z_{eq} = 1/Z_1 + 1/Z_2$, L o comprimento do eritrócito em máxima deformação e L_0 o comprimento celular na ausência de qualquer força. Como L é proporcional à velocidade V (Figura 17 c), obtendo-se o coeficiente angular e L_0 através de ajuste linear, determinou-se a elasticidade μ .

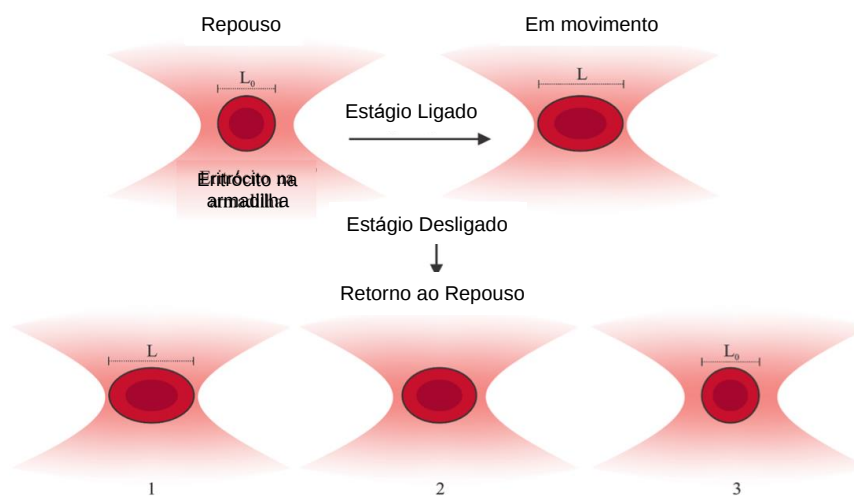
Figura 17. Esquema geral do experimento. (a) Deformação. (b) Elongação do eritrócito em função da velocidade de arraste. (c) Exemplo de gráfico da elongação L em função da velocidade V .



Fonte: SILVA *et al.*, 2012.

A viscosidade da membrana foi determinada utilizando-se o tempo de retorno (τ), tempo para o qual o eritrócito em máxima elongação, depois de arrastado por uma dada velocidade, leva para retornar a sua conformação original. Para a quantificação do tempo de retorno, analisou-se a sequência de imagens que começa então com a máxima deformação da célula e termina com a recuperação de sua morfologia inicial L_0 , assim como ilustra a Figura 18.

Figura 18. Esquema da mensuração do tempo de retorno do eritrócito.

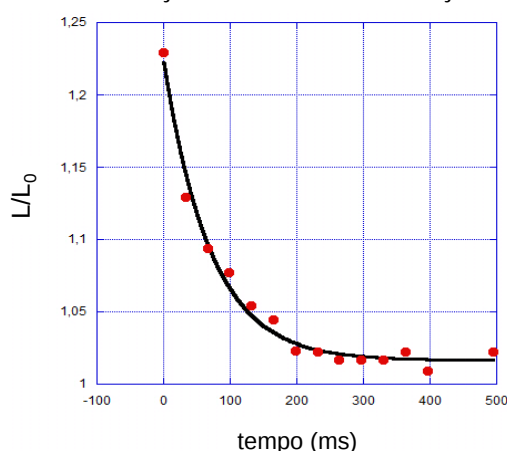


Fonte: o autor.

O gráfico da Figura 19 exemplifica o comportamento exponencial da deformação em função do tempo que foi estudado para as velocidades 210, 245 e 280 $\mu\text{m/s}$. Para o ajuste dos pontos e determinação do tempo de retorno (τ) foi utilizada uma equação do tipo, para a qual $m3 = \tau$:

$$m1 + m2. \exp\left(-\frac{x}{m3}\right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Figura 19. Deformação do eritrócito em função do tempo.

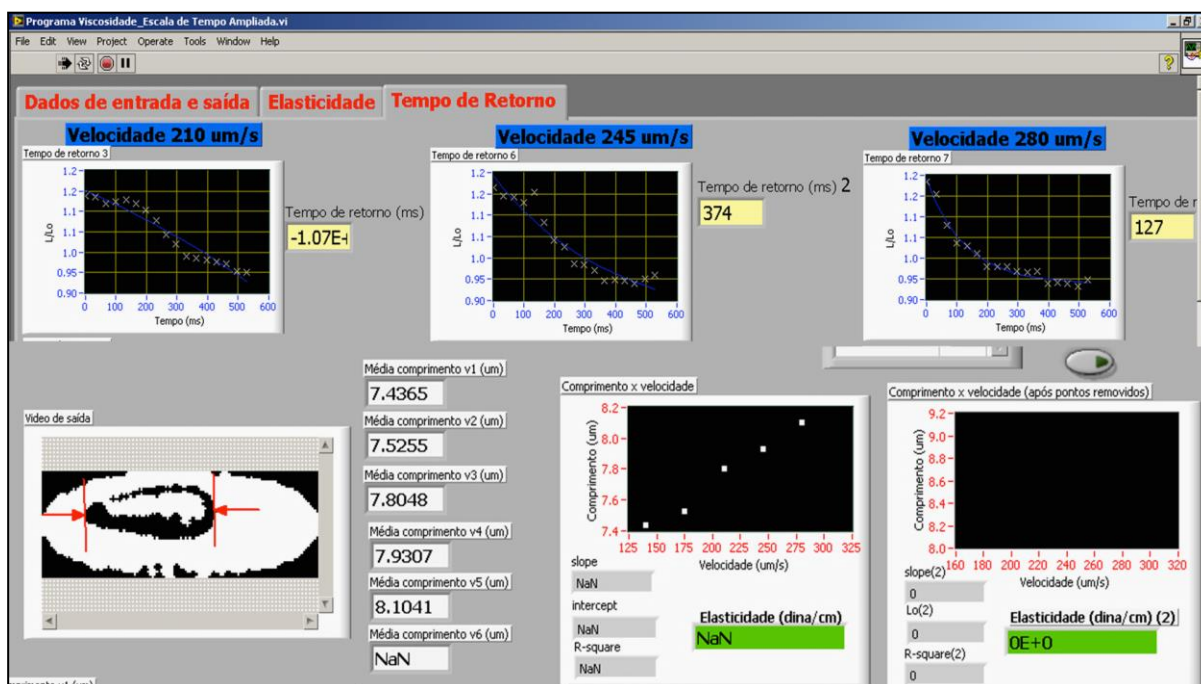


Fonte: o autor.

Uma vez que a elasticidade (μ) e o tempo de retorno (τ) foram mensurados utilizando-se a pinça óptica, a viscosidade da membrana ($\eta_{membrana}$) dos eritrócitos foi obtida pela equação, $\tau = \eta_{membrana}/\mu$, estabelecida por Evans *et al.* 1976 e adaptada para a metodologia aqui desenvolvida.

A elasticidade e a viscosidade da membrana foram determinadas com o auxílio de uma nova plataforma desenvolvida no *LabView*, com parte exemplificada na Figura 20, em uma construção conjunta do nosso grupo de pesquisa, através de modificações da plataforma construída para a elasticidade, anteriormente reportada (MOURA *et al.*, 2015). Essa nova plataforma permitiu determinar essas propriedades reológicas (elasticidade e viscosidade de membrana) a partir de um único experimento. Através desse novo programa foram automatizadas as medições das elongações em função do tempo e da velocidade e os cálculos da elasticidade e tempo de retorno. No entanto, a avaliação do tempo de retorno foi ainda refinada através de análise no programa KaleidaGraph (Synergy)

Figura 20. Representação de parte do painel de controle da plataforma Labview utilizada para mensuração da elasticidade/viscosidade.



Fonte: Grupo de Pesquisa de Óptica Biomédica e Imagens – UFPE.

Esse procedimento foi empregado tanto para indivíduos controle, como para os portadores da hemoglobinopatia.

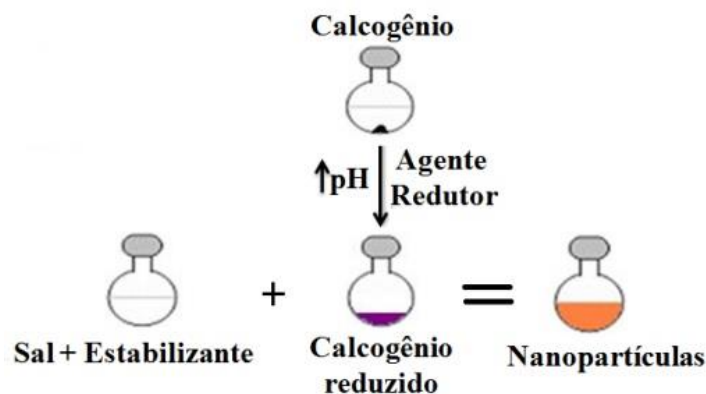
4.2 ANÁLISE DA CARGA ELÉTRICA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA COM PONTOS QUÂNTICOS

4.2.1 Síntese e Caracterização dos Pontos Quânticos

Utilizou-se PQs catiônicos de Telureto de Cádmio (CdTe) estabilizados com cisteamina sintetizado por metodologia estabelecida por nosso grupo (MATOS *et al.*, 2017) com pequenas modificações. A síntese foi realizada em duas etapas (Figura 21): primeiramente preparou-se uma solução contendo Perclorato de Cádmio (4,7 mmol – Sigma-Aldrich) diluída em água ultra-pura, juntamente com o agente estabilizante, a cisteamina (5,7 mmol – Sigma-Aldrich), em $\text{pH} \approx 5,8$. Na segunda etapa, o Telúrio metálico (0,46 mmol) foi reduzido sob a ação do Boridreto de Sódio (2,5 mmol – Sigma-Aldrich), em meio alcalino, com NaOH a 2 M e atmosfera inerte de nitrogênio. Após a redução total, o Te^{2-} foi adicionado à solução contendo o Cd^{+2} . O crescimento dos PQs procedeu-se em atmosfera inerte, sob agitação, a 90 °C, por 90 min. Os PQs foram

caracterizados por espectroscopia de absorção e emissão, utilizando os equipamentos 1800 UV-Vis (Shimadzu) e o fluorímetro LS 55 (Perkin Elmer), respectivamente.

Figura 21. Esquema da síntese dos PQs em meio aquoso.



Fonte: CABRAL FILHO, 2016.

A partir do primeiro máximo do espectro de absorção estimou-se o diâmetro médio dos PQs (d) através da equação (DAGTEPE *et al.*, 2007):

$$d = \frac{(1,38435 - 0,00066 \lambda)}{1 - 0,00121 \lambda} \quad \text{Eq. 3}$$

sendo λ o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção. Também estimou-se a concentração média dos PQs utilizando-se a lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon CL \quad \text{Eq. 4}$$

sendo A a absorvância no primeiro máximo de absorção da suspensão, ε é o coeficiente de extinção dos nanocristais (L/mol/cm) determinado por YU *et al.* 2003, C a concentração da amostra e L o comprimento do trajeto da luz na amostra (1 cm).

Pelo espectro de emissão, calculou-se a largura à meia altura (FWHM), a qual revela informações sobre os defeitos de superfície dos PQs. Além disso, obteve-se o comprimento de onda máximo de emissão dos PQs, o qual foi útil no ajuste dos parâmetros para análise na citometria de fluxo.

4.2.2 Amostras

As amostras de sangue dos grupos estudados foram coletadas em tubo de 3,5 mL a vácuo contendo anticoagulante EDTA. Para a análise da distribuição de carga, os eritrócitos foram diluídos em solução salina 0,9%, a fim de manter um hematócrito final de 1%. Para tanto, primeiramente, 1000 μ L de cada sangue total foram centrifugados a 775 xg, por 5 min. Em seguida, 200 μ L do precipitado de eritrócitos de cada amostra foram diluídos em 800 μ L de solução salina isotônica (NaCl 0,9%), totalizando 1000 μ L, os quais

foram centrifugados mais uma vez a 775 xg, por 2 min. Na terceira etapa, foi retirado o sobrenadante e, mais uma vez, o precipitado de eritrócitos foi diluído com 800 µL de salina e centrifugado novamente a 775 xg, por 2 min. Por fim, 10 µL do precipitado de eritrócitos de cada amostra foram diluídos em 990 µL de NaCl 0,9%, com um hematócrito final a 1%. Nesse estudo foram avaliados 7 pacientes Hbβ e 12 controles HbA.

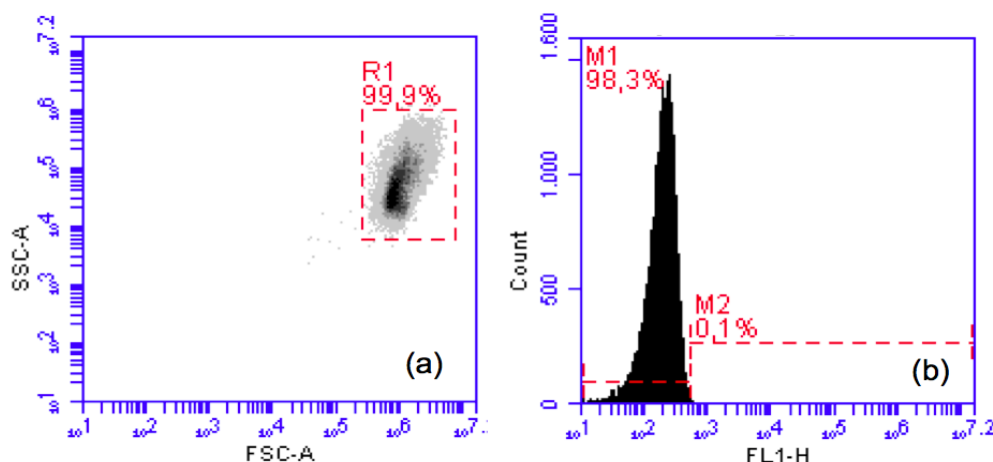
4.2.3 Procedimento Experimental

Os eritrócitos foram incubados com os PQs positivos (concentração final de 1,5 µM) por 5 min, explorando-se a interação eletrostática entre grupos amino da superfície dos PQs com a membrana negativamente carregada das células. Após a incubação, o sistema foi centrifugado (775 xg) por 30 s e ressuspensionado em 100 µL de salina a 0,9% antes da leitura. Como controle negativo foram utilizadas diluições dos eritrócitos a 1% sem incubação prévia com PQs para a avaliação da autofluorescência das células e delimitação da população de interesse na citometria de fluxo.

As amostras foram analisadas utilizando-se o citômetro e software Accuri C6 (Becton Dickinson). Para aquisição dos dados foi utilizado *dot plot*, correlacionando a fração FCS ("*Forward Scatter Cell*" – relativa ao tamanho) e a SSC ("*Side Scatter Cell*" – representa a complexidade celular ou granulosidade), em escala logarítmica, para delimitação da população, como indicado na Figura 22a pelo *gate* R1. Para análise da fluorescência, os eventos foram adquiridos em histograma e a população negativa que corresponde às células que não apresentaram marcação é localizada no M1 na Figura 22 b.

A fluorescência dos PQs foi excitada em 488 nm e detectada pelo filtro FL1 (530 nm/15 nm). Foram adquiridos 20.000 eventos. Foram analisadas tanto as porcentagens de marcação quanto as medianas de fluorescência. Quanto mais carregada negativamente estiver a superfície do eritrócito, mais PQs irão interagir com a membrana e maior será o sinal de fluorescência. Desse modo, através dessa análise pôde-se obter informações sobre a carga de membrana e o portanto o ζ eritrocitário. Essa metodologia foi empregada tanto para as amostras dos indivíduos controle como para dos portadores de Hbβ.

Figura 22. Citometria de fluxo. À esquerda a), o gráfico dot plot delimitando a população de interesse através do gate R1. À direita b), o perfil do histograma da população de células não marcadas, nesse caso controle negativo, indicada por M1.



Fonte: O autor.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PRINCÍPIOS ÉTICOS

As amostras de sangue foram coletadas na Fundação de pacientes/doadores previamente identificados como Hb β e HbA. O projeto foi apoiado pelo comitê de ética em pesquisa da Fundação Hemope (Parecer nº. 1.719.437), em anexo. Para analisar-se as diferenças ou semelhanças estatísticas apresentadas entre os grupos, foi utilizado o teste estatístico não pareado de Wilcoxon, pois os dados não seguem distribuição normal segundo teste de D'Agostino ou Shapiro-Wilk. Os grupos foram considerados significativamente diferentes para valores de p inferior a 0,05. Os dados de elasticidade e viscosidade da membrana foram também correlacionados pela análise de Pearson.

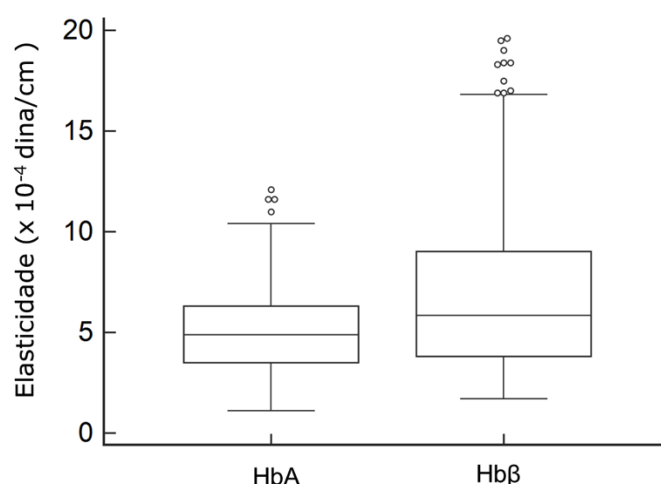
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MENSURAÇÃO DA ELASTICIDADE E VISCOSIDADE DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

Os valores para as elasticidades dos grupos HbA e Hb β estão apresentados na Figura 23. O valor da mediana da constante elástica eritrocitária dos controles foi de $4,9 \times 10^{-4}$ dina/cm. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MOURA *et al.*, 2015). Como também observado na Figura 23, os eritrócitos Hb β apresentaram uma mediana da constante elástica de $6,1 \times 10^{-4}$ dina/cm. As diferenças entre os grupos amostrais foram significativas ($p=0,0001$), indicando que as alterações reológicas decorrentes dessa hemoglobinopatia interferem na capacidade elástica dessas células.

Considerando que quanto maior for o valor da “elasticidade μ ” (constante elástica), mais a célula resiste à deformação, assim como se aplica para a constante de mola, observa-se que os eritrócitos dos portadores de β talassemia intermediária são mais rígidos que os HbA, sendo esta uma propriedade crítica para essas células na microcirculação, pois para transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, os eritrócitos precisam passar por vasos com diâmetros ainda menores que os seus.

Figura 23. Box Plot dos valores da elasticidade dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β ($p=0,0001$).

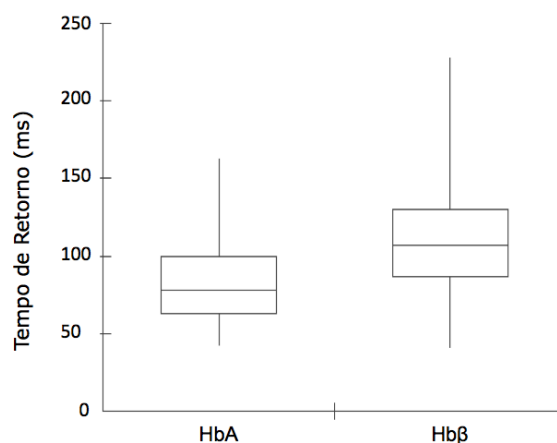


De acordo com os resultados, os eritrócitos Hb β apresentaram-se aproximadamente 25% mais rígidos, em comparação ao controle. No entanto pode-se notar que há desde eritrócitos Hb β cerca de 300% mais rígidos comparados à mediana

para HbA até 60 em relação aos menos elásticos encontrados para o controle. Esse resultado está próximo a valores encontrados na literatura. Um estudo anterior com eritrócitos β talassêmicos, realizado por aspiração com micropipeta, mostrou um módulo de constante elástica cerca de 30% maior em relação aos eritrócitos normais (ATHANASIOU *et al.*, 1991). Em 2008, De Luca e co-autores também estudaram a deformabilidade de eritrócitos em talassêmicos e normais usando uma pinça óptica dupla para esticar diretamente as células e, avaliando a máxima elongação celular em função da potência do laser, determinaram a rigidez dos eritrócitos. Foi observado que a rigidez da membrana de eritrócitos aumentou cerca de 40% para os pacientes com talassemia, quando comparados aos normais (DE LUCA *et al.*, 2008). Porém nesses trabalhos reportados na literatura não houve identificação do tipo de β talassemia estudada, podendo esta ser maior ou intermediária, por exemplo.

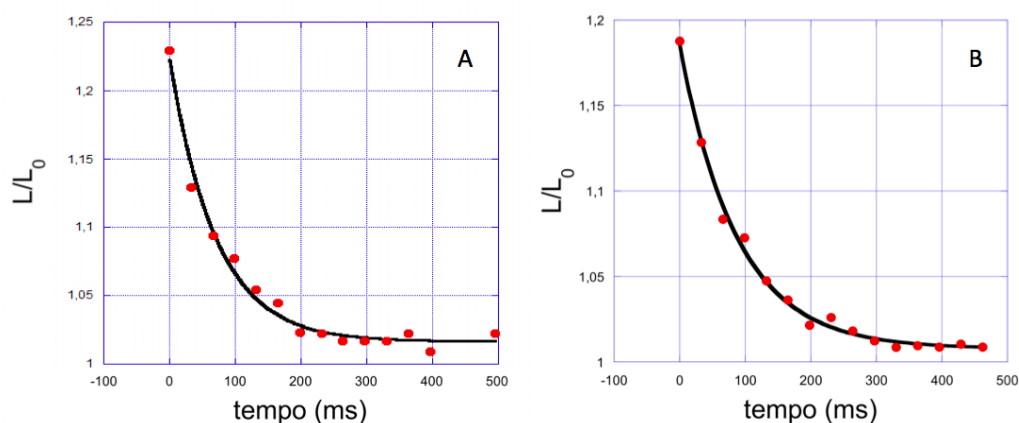
Já com relação à mensuração da $\eta_{membrana}$, os valores encontrados para o tempo de retorno estão apresentados no gráfico da Figura 24. A mediana do tempo de retorno para HbA foi de 80 ms, valor da mesma ordem de grandeza dos reportados na literatura utilizando o método da micropipeta (HOCHMUTH & BUXBAUM, 1980; KIM *et al.*, 2012). Para pacientes Hb β o valor médio do tempo de retorno foi de 110 ms. Dessa forma os eritrócitos Hb β apresentaram tempo de retorno maior quando comparado aos HbA em cerca de 37%. Aqui as diferenças entre os grupos amostrais também foram significativas ($p=0,0001$). As análises iniciais que retornaram as exponenciais mais características, com ajuste mais confiável aos pontos e para as quais o programa desenvolvido no *Labview* conseguiu registrar melhor as etapas de retorno dos eritrócitos à conformação original, foram as efetuadas para a velocidade de 280 $\mu\text{m/s}$, por isso essa foi a escolhida para as posteriores (e futuras) avaliações.

Figura 24. Box Plot dos valores do tempo de retorno dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β ($p=0,0001$).



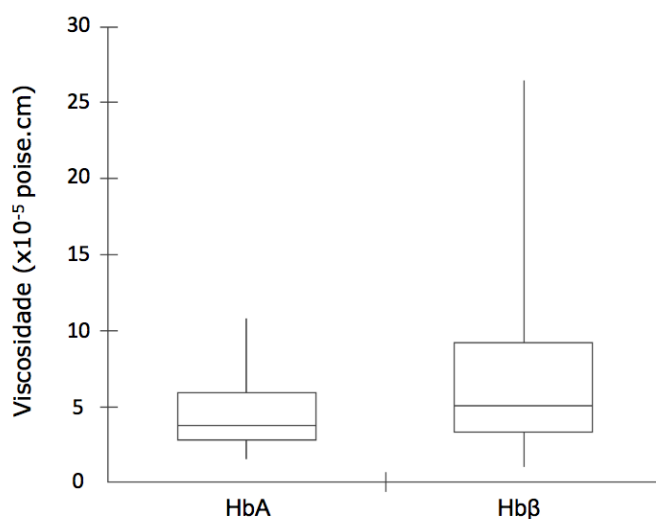
O gráfico da Figura 25 abaixo exemplifica resultados obtidos para um controle (87 ms) e para um paciente com Hb β (123 ms).

Figura 25. Deformação do eritrócito em função do tempo - HbA (A) e Hb β (B).



Uma vez que μ e τ foram obtidos através do experimento, pode-se calcular o valor da $\eta_{membrana}$. A mediana para $\eta_{membrana}$ dos controles foi de $3,8 \times 10^{-5} \text{ poise} \cdot \text{cm}$ e para Hb β de $5,0 \times 10^{-5} \text{ poise} \cdot \text{cm}$. Esses resultados indicam que os eritrócitos dos pacientes com β talassemia intermediária possuem a membrana mais viscosa (cerca de 32%) que o controle ($p = 0,0004$) (Figura 26). Novamente pode-se notar que alguns eritrócitos Hb β podem ter uma viscosidade de membrana cerca de 500% e 100% maior que a mediana e o maior valor encontrado para controle, respectivamente.

Figura 26. Box Plot dos valores da viscosidade dos eritrócitos de indivíduos HbA e Hb β ($p = 0,0004$).



Um estudo anterior, realizado pelo mesmo grupo de Athanasiou (também sem identificar o grau da talassemia) por aspiração com micropipeta, mostrou que os eritrócitos β talassêmicos apresentaram viscosidade de membrana consideravelmente maior que HbA (ATHANASIOU *et al.*, 1994), corroborando os resultados encontrados aqui através da PO. Em 2012 KIM *et al.* realizaram um estudo com FLTS (*Fourier Transform Light Scattering*) com outra hemoglobinopatia, a anemia falciforme, e também foram observadas alterações significativas tais como o aumento da viscosidade de membrana e diminuição da elasticidade dessas células quando comparadas com doadores saudáveis (KIM *et al.* 2012). Dos resultados pode-se observar que há uma distribuição nos valores das propriedades viscoelásticas estudadas, seja para indivíduos normais ou pacientes. Isso se deve tanto à variabilidade biológica, como ao fato de na circulação sanguínea existir eritrócitos de diferentes tempos de vida, os quais podem permanecer por aproximadamente 120 dias no organismo. Durante a medição pode se capturar tanto células mais senescentes, e consequentemente de uma forma geral menos deformáveis, como o inverso. Nos pacientes essa distribuição é ainda maior que no controle, pois os β talassêmicos possuem tanto eritrócitos próximos aos normais como afetados pela doença, em menor ou maior grau.

Esses resultados mostram que as propriedades biomecânicas dos eritrócitos são muito afetadas pelo defeito genético na estrutura da hemoglobina associada à doença da talassemia. As funções celulares e sua viscoelasticidade estão fortemente relacionadas à estrutura do citoesqueleto e sua interação com a bicamada lipídica (HOCHMUTH & WAUGH, 1987). Nos eritrócitos o citoesqueleto forma uma rede triangular bidimensional constituída por nós de actina, bordas de espectrina e outras proteínas.

Em β talassemia intermediárias mais graves, a relação espectrina/banda 3 é baixa. Essa relação aponta para a deficiência de espectrina no citoesqueleto, a qual leva a sua desestabilização. Existem várias causas para essa falha, incluindo deficiência da síntese de espectrina nos precursores eritroides; espectrina com função anormal em formar o complexo ternário e função anormal das proteínas que ligam o citoesqueleto de espectrina à membrana (YUAN *et al.*, 1995, (MEHRISHI & RISSO, 2016). Adicionalmente, na talassemia o desequilíbrio entre as cadeias α e β da hemoglobina, faz com que a cadeia que é produzida normalmente, se acumule e precipite na membrana eritrocitária e foi reportado que essa hemoglobina pode interagir de maneira efetiva com a espectrina. Estes desequilíbrios podem ser responsáveis pelas alterações

nas características viscoelásticas celulares encontradas na Hb β , e também levar a hemólise e a graus variados de anemia (YUAN *et al.*, 1995; DATTA *et al.*, 2003). Além disso, em pacientes com β talassemia existe uma quantidade detectável da hemoglobina fetal expressa na corrente sanguínea. Essa variante também apresenta alteração e instabilidade no citoesqueleto da membrana (YUAN *et al.*, 1995; WEATHERALL, 2006).

Por fim, observando-se os dados encontrados para as propriedades biomecânicas percebe-se também que apesar da mediana para os eritrócitos Hb β se diferenciar da mediana dos indivíduos normais, a assinatura da doença está relacionada a células mais rígidas e com a membrana mais viscosa que estão sendo representadas nos extremos dos gráficos. Dessa forma a PO oferece a vantagem de quantificar não só a tendência central dos dados como também as propriedades reológicas das células de forma individualizada. Com uma técnica que fornecesse somente a tendência central para as propriedades reológicas (tais como a ectacitometria), poderia não ser possível detectar assinaturas da doença, já que os pacientes podem apresentar vários eritrócitos normais.

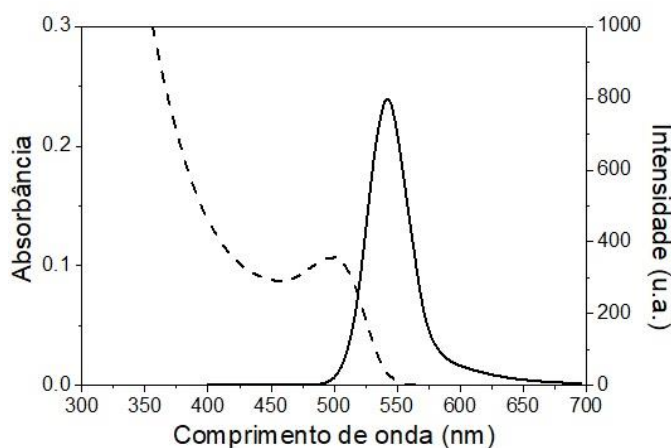
Também, a PO permitiu não só adquirir duas distintas propriedades biomecânicas de forma individualizada como também possibilitou correlacioná-las. A análise de Pearson indicou que a constante elástica (uma propriedade relacionada à rede de espectrina/citoesqueleto e à capacidade da célula resistir a uma deformação) e a viscosidade de membrana (a qual também pode ter contribuição adicional da bicamada lipídica e está relacionada a quão rápido a célula recupera sua forma original) (KIM *et al.*, 2012) estão correlacionadas de maneira direta ($r = 0,6$), corroborando assim a existência de uma arquitetura de interações intracelulares no eritrócito.

5.2 ANÁLISE DA CARGA ELÉTRICA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA COM PONTOS QUÂNTICOS

5.2.1 Caracterização dos Pontos Quânticos

A Figura 27 apresenta os espectros de absorção e emissão dos PQs utilizados nesse estudo. Os PQs apresentaram fluorescência na região espectral do verde, sendo a emissão máxima em 542 nm (FWHM = 38 nm). O diâmetro médio (d) e a concentração das nanopartículas foram estimados em $d \approx 2,7$ nm e 40 μ M.

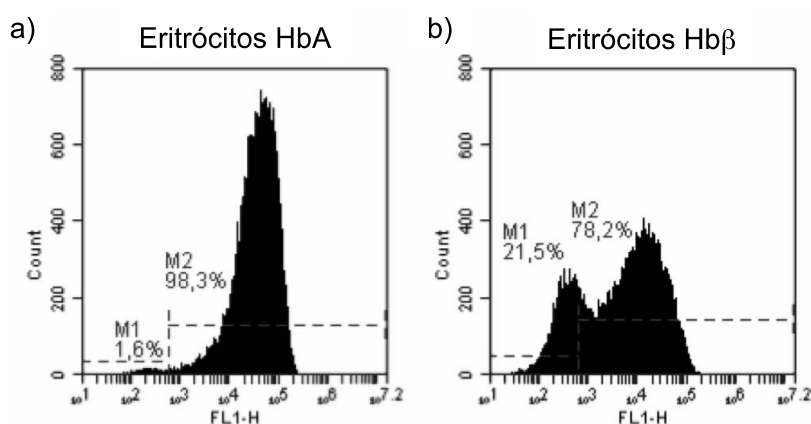
Figura 27. Emissão (linha sólida) e absorção (linha tracejada). Emissão no verde em 542 nm. Excitação em 365 nm.



5.2.2 Avaliação de Carga da Membrana Eritrocitária

As amostras de sangue de eritrócitos HbA e Hb β foram incubados com PQs de CdTe estabilizados com cisteamina para observação da interação eletrostática entre as células e as nanopartículas. Visando uma análise mais quantitativa, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo. A Figura 28 mostra um perfil típico de marcação das populações controle HbA (a) e β talassêmica intermediária (Hb β). Na Figura 28 (a), o histograma característico da população HbA sugere uma marcação intensa e homogênea dos grupos aniônicos da membrana, enquanto que para Hb β essa distribuição é heterogênea.

Figura 28. Histogramas de fluorescência característicos após marcação com PQs, obtidos através de citometria de fluxo, de eritrócitos HbA (a) e Hb β (b).

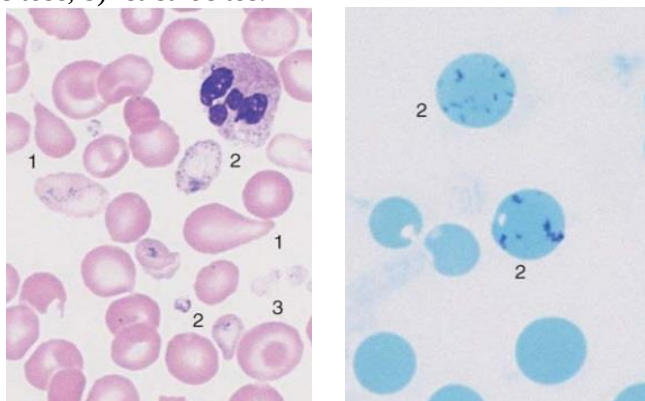


A heterogeneidade populacional de eritrócitos de Hb β reflete a hemólise severa sofrida por essas populações e a constante tentativa de compensação da anemia resultante

desse fator através da hiperplasia medular. Assim, uma população Hb β é caracterizada por uma grande variação da morfologia (poiquilocitose) e tamanhos (anisocitose), além de um aumento da fração de eritrócitos imaturos (policromasia), com uma presença significativa de reticulócitos e eritroblastos devido a uma hiperplasia medular muito proeminente (Figuras 29 e 30). Essas características serão mais severas ou mais brandas a depender do paciente (OLIVEIRA, 2013).

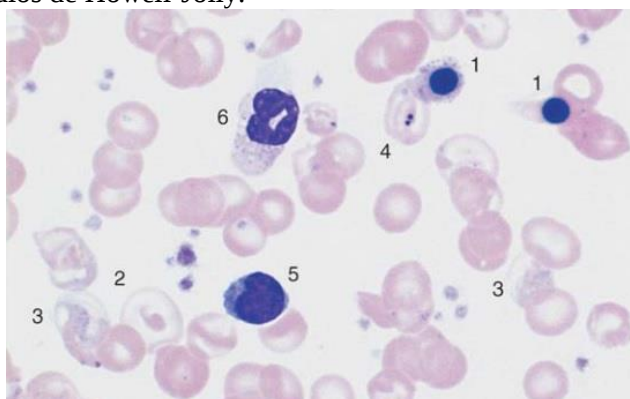
Dessa forma, essa heterogeneidade populacional, determinada tanto pela presença dos diversos tipos celulares decorrentes da hiperplasia medular, bem como das alterações consequentes da hemoglobinopatia, possivelmente determina o conteúdo de resíduos de ácido siálico disponível nas superfícies celulares, resultando nas diferenças encontradas para eritrócitos Hb β frente à população HbA.

Figura 29. Esfregaço de sangue total β talassemia. a) β talassemia intermediária com forte poiquilocitose e anisocitose, b) reticulócitos.



Fonte: HAFERLACH *et. al.*, 2004.

Figura 30. Esfregaço de sangue total β talassemia maior com poiquilocitose, eritroblasto, policromasia, corpúsculos de Howell-Jolly.

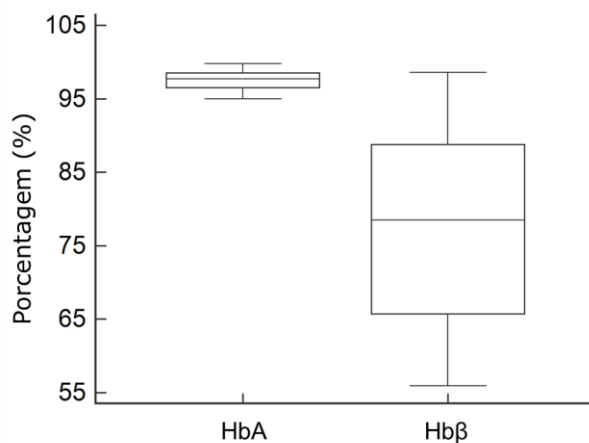


Fonte: HAFERLACH *et. al.*, 2004.

A Figura 31 apresenta box plot da porcentagem de marcação das populações de eritrócitos controle e talassêmicos analisadas. A mediana da porcentagem de marcação foi *ca.* 98% e 78% para os eritrócitos HbA e Hb β , respectivamente. Assim, os eritrócitos Hb β

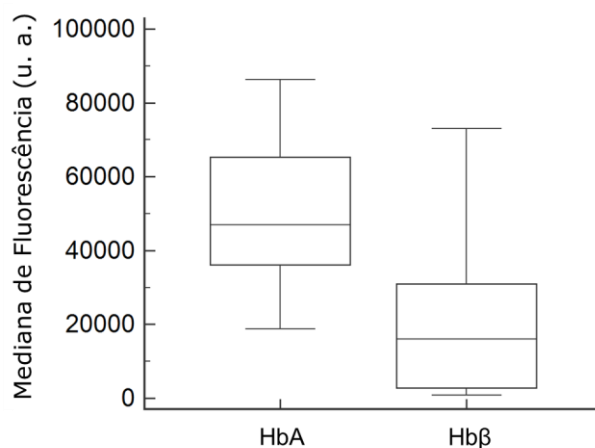
apresentaram uma diminuição na marcação de cerca de 20% quando se compara as medianas obtidas. O grupo Hb β foi estatisticamente significativo comparado ao controle, $p < 0,001$.

Figura 31. Box plot da porcentagem de marcação das populações de eritrócitos HbA e Hb β quando incubados com os PQs, $p < 0,001$.



Essa diferença entre eritrócitos HbA e Hb β foi também evidente quando observou-se as medianas da intensidade de fluorescência (MIF) das populações (Figura 30), tendo o controle (HbA) uma mediana de MIF ≈ 50000 , enquanto as populações Hb β tiveram uma mediana de MIF ≈ 20000 . Assim, observou-se uma diferença da mediana de MIF cerca de aproximadamente 60% menor para a população Hb β quando comparada ao controle. Nesse caso, o grupo Hb β também foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) frente ao controle. Analisando-se as Figuras 29 e 30 nota-se também que para a hemoglobinopatia há porcentagens de marcação e MIFs com valores bem menores que o controle, reforçando e acentuando as diferenças entre as populações HbA da Hb β .

Figura 32. Box plot da mediana da intensidade de fluorescência das populações de eritrócitos HbA e Hb β quando incubados com os PQs, $p < 0,001$.



De forma geral esses resultados indicam que os eritrócitos Hb β apresentam uma redução na carga elétrica membranar, a qual é conferida pelo conteúdo de ácido siálico. Os resultados para a porcentagem de marcação sugerem que há células Hb β que possuem muito pouco ácido siálico e provavelmente as células que têm ácido siálico possuem menos do que os controles, pois também observou-se valores de MIF menores. Os resíduos de ácido siálico na membrana celular são componentes bastante importantes que desempenham um papel na determinação da estrutura celular, sobrevivência, propriedades eletroquímicas, funções como reconhecimento e localização. O conteúdo de ácido siálico contribui com uma carga elétrica membranar substancial (~60%), que é um dos principais fatores físico-químicos que regem uma grande variedade de interações celulares (MEHRISHI & RISSO, 2016).

Nos eritrócitos β talassêmicos, o conteúdo de ácido siálico nas glicoforinas foi relatado como *ca.* 25% menor do que nos eritrócitos normais (KAHANE *et al.*, 1980). Em um estudo mais recente o ácido siálico presente na membrana de pacientes com β talassemia maior foi também cerca de 25% menor quando comparado a membranas de eritrócitos de pessoas saudáveis (DESOUKY *et al.*, 2009). Esses dados corroboram com as nossas mensurações de carga elétrica membranar encontrada para Hb β através da fluorescência dos PQs, fortalecendo a metodologia desenvolvida.

Em outro estudo Durocher e colaboradores evidenciaram que a perda de ácido siálico leva à alteração de carga de membrana em células senescentes, podendo determinar o sequestro prematuro das mesmas pelo sistema reticulo-endotelial e diminuir sua sobrevida na circulação (DUROCHER, 1975), assim como ocorre em hemoglobinopatias. Na talassemia β , o acúmulo das cadeias α livres, bem como a liberação do grupo heme e do ferro durante o processo hemolítico, ocasionam aumento de danos oxidativos nas membranas celulares, desnaturação de proteínas e oxidação da hemoglobina (ONDEI, 2009). Esse fato pode estar relacionado com a alteração de carga da membrana observada para pacientes talassêmicos. Silva *et al.*, (2012) sugeriu que a perda de ácido siálico da glicoforina A é um dos primeiros sinais de danos oxidativos em eritrócitos armazenados e que a sua interação com outra proteína do citoesqueleto, a banda 3, pode estar relacionada à perda de elasticidade encontrada também para essas células armazenadas (SILVA *et al.*, 2012). Além da distribuição de carga alterada, eritrócitos β talassêmicos apresentaram diminuição da deformabilidade. Todas essas mudanças são compatíveis com a

instabilidade do citoesqueleto e com os danos que são causados na membrana desses eritrócitos (HUANG *et al.*, 2011).

Assim de forma geral pode-se concluir que não só a viscoelasticidade, mas também a carga elétrica de membrana dos eritrócitos é uma propriedade importante e sensível que sofre alterações devido às mudanças que são provocadas nas células em consequência por exemplo da β talassemia intermediária. Vale ainda a pena ressaltar que a carga elétrica de membrana é a propriedade que induz o potencial zeta e que a metodologia utilizando PQs catiônicos pode e foi avaliada em um meio eletrolítico próximo ou igual ao biológico, o qual não é possível de ser realizado em equipamentos que avaliam o ζ por mobilidade eletroforética, tais como o *Zeta sizer* (Malvern).

6 CONCLUSÃO

- As metodologias propostas para a mensuração da carga elétrica de membrana eritrocitária utilizando PQs catiônicos e as propriedades reológicas através da PO foram eficientes, sensíveis e capazes de propiciar comparações entre eritrócitos controle (HbA) com aqueles que sofreram modificações por problemas patológicos, tais como os Hb β .
- Os eritrócitos Hb β apresentaram-se com a carga elétrica negativa de membrana diminuída, mais rígidos e com a membrana mais viscosa quando comparados ao controle HbA.
- PQs catiônicos e a PO mostram-se ser ferramentas fotônicas versáteis para elucidação alterações elétricas e biomecânicas essenciais à compreensão das mudanças fisiológicas resultantes das hemoglobinopatias. Essas características são fundamentais na homeostase celular e são importantes também para o entendimento da fisiopatologia e até mesmo da ação de fármacos utilizados.

7 PERSPECTIVAS

Como próximos passos pretende-se utilizar essas metodologias para avaliar outra variante da talassemia, a S/beta talassemia (interação da talassemia com anemia falciforme) e também para analisar a ação de fármacos, como a hidroxiureia, na reologia e carga da membrana eritrocitária. Com isso espera-se ter um conjunto de resultados que ajudem a fornecer um melhor entendimento sobre os efeitos dessas hemoglobinas variantes no funcionamento celular.

REFERÊNCIAS

- AKERMAN, M. E. et al. Nanocrystal Targeting In Vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12617-12621, 2002.
- AMINOFF D, WILLIAM F, VORDER B, WILLIAM CB, KEITH S, et al. Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74: 1521–1524. 1977
- ASHKIN, A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. **Phys. Rev. Lett.** v.24, p. 156 – 159, 1970.
- ASHKIN, J.; DZIEDZI, J. BJORKHOLM, S. CHU: Observation of a Single - Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. **Optics Lett.** 11, pg. 288, 1986.
- ASHKIN, A.; DZIEDZIC. Optical Trapping and Manipulation if Viruses and Bacteria. **Science**, vol. 235, pg. 1517 – 1520, 1987.
- ASHKIN, A. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Volume: 94 Issue: 10 Pages: 4853-4860 Published: MAY 13, 1997.
- ATHANASIOU, G.; ZOUBOS, N.; and MISSIRLIS, Y. “Erythrocyte membrane deformability in patients with thalassemia syndromes,” **Nouv. Rev. Fr. Hematol.** 33, 15–20 1991.
- ATHANASSIOU, G.; MEIER, W.; LERCHE, D.; MISSIRLIS, Y. “The viscosity of red blood cell membranes in patients with β -thalassaemia,” **Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie**, vol. 36, no. 3, pp. 229–233, 1994.
- BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. Blood reviews. **Elsevier Ltd**; Sep; 25(5):205–13, 2011.
- BARJAS-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; FONTES, A.; COSTA, F. F.; CESAR, C. L. Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers. **Transfusion**. v.42, p. 1196–1199, 2002.
- BAZONI, R. F.; LIMA, C. H.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments. **Soft Matter**. v.7, p.4306-14, 2015.

BESSIS, M.; MOHANDAS, N.; FEO, C. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. **Blood Cells**. v. 6, p. 315-327, 1980

BOAL, D. Mechanics of the cell. **Cambrigde University Press**. 2002.

BORN, G. V. R.; PALINSKI, W. Increased Microvascular Resistance To Blood-Flow In The Rat Hindlimb After Perfusion With Neuraminidase. **Journal of Physiology**. London; v. 419, p. 169-176.; 1989.

BRANDÃO, M.; M.; FONTES, A.; BARJAS-CASTRO, M. L.; BARBOSA, L. C.; COSTA F. F.; CESAR, C. L.; SAAD, S. T. O. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. **European Journal of Haematology**. v.70, p.207 - 211, 2003.

BRANDÃO, M. M.; CASTRO, M. L. B.; FONTES, A.; CESAR C. L.; COSTA, F. F & SAAD, S. T. O. - Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. **Clin. Hemorheol. And Microcirc**. v. 43, p. 217 – 221, 2009.

BRESNICK, E. H.; HEWITT K. J., MEHTA, C.; KELES, S. PAULSON, R. F.; JOHNSON, K. D. Mechanisms of erythrocyte development and regeneration: implications for regenerative medicine and beyond. **Development**. Jan 10;145(1). pii: dev151423. doi: 10.1242/dev.151423. 2018

BEZERRA, M. A. C. **Determinação das Propriedades Adesivas e Funcionais em Glóbulos Vermelhos, Neutrófilos e Plaquetas de Pacientes com Hemoglobinopatia SC, S/β Talassemia e Talassemia Intermediária**. 2009. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2009

CABRAL FILHO, P. E. **Investigação de antígenos eritrocitários do sistema abo utilizando quantum dots conjugados a anticorpos monoclonais e à lectina Ulex europaeus**. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

CESAR, C. L. “Quantum Dots as Biophotonics Tools” in Quantum Dots: Applications in biology, second edition. **Springer**, New York, editado por Adriana Fontes e Beate S. Santos., 2014.

CHEN, C. B.; WALLIS, R. Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases - Defining functional units for complement activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 25894-25902, 2001.

CHEN, Q.; YANG, D.; XU, S. Conjugations between Cysteamine-Stabilized CdTe Quantum Dots and Single Stranded DNA. **BIOANALYTICAL. Journal Analytical Letters** Volume 41, Issue 11; Pages 1964-1974, 2008

CRICK, A. J. et al. Quantitation of malaria parasite-erythrocyte cell-cell interactions using optical tweezers. **Biophysical Journal** 107, p. 846 – 853. 2014.

CUNHA, C. R. A.; ANDRADE, G. C.; PEREIRA, M. I. A.; CABRAL FILHO, P. E.; CARVALHO, L. B.; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS B. S.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Volume 178, Pages 85-91, ISSN 1011-1344, 2018.

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

DA CUNHA, A. F. et al. Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence Of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: LOGIE, C. **Point Mutation**. Intech, 352p, 2012.

DANON, D. MARIKOVSKY, Y. (1961) Difference de charge eletrique de surface entre erythrocytes jeunes et ages. **Comptes Rendus de l'Acade ´mie des Sciences** 253: 1271–1272. 1961.

DANON, D.; SKUTELSKY, E. Endothelial Surface-Charge And Its Possible Relationship To Thrombogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 275, n. 27, p. 47-63, 1976.

DAO, M. LIM, C. T. SURESH S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**. v. 51, p. 2259 – 2280, 2003.

DATTA, P.; CHAKRABARTY, S. B.; CHAKRABARTY, A.; CHAKRABARTI, A. **Interaction of erythroid spectrin with hemoglobin variants: implications in β -thalassemia**, **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, Volume 30, Issue 3, Pages 248-253, ISSN 1079-9796, 2003.

DE LUCA, A. C.; 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**; 16:7943-57. 2008

DESOUKY, O.S., SELIM, N.S., EL-BAKRAWY, E.M. et al. Biophysical Characterization of β Thalassemic Red Blood Cells. **Cell Biochem Biophys**; 55: 45. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9056-5>. Humana Press Inc. 2009

DICKERSON, R. E.; GEIS, I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology; **Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.**, Menlo Park CA, v. 68, p. 152, 1983.

DOBBE, J. G.; HARDEMAN, M. R.; STREEKSTRA, G. J.; STRACKEE, J.; INCE, C.; GRIMBERGEN, C. A. **Analyzing red blood cell-deformability distributions. Blood Cells Mol. Dis.** May. v. 28, p. 373-384, 2002.

DUROCHER, J. R.; PAYNE, R. C.; CONRAD, M. E. Role Of Sialic-Acid In Erythrocyte Survival. **Blood**, v. 45, n. 1, p. 11-20, 1975.

ENGLISH, S. W.; MCINTYRE, L. Is hemoglobin good for cerebral oxygenation and clinical outcome in acute brain injury? **Curr Opin Crit Care**. 2018 Feb 3. doi: 10.1097/MCC.0000000000000485. 2018

EVANS, E.A. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. **Biophys. J.** v. 13, p. 941–954, 1973.

EVANS, E. A. AND SKALAK, R.; Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes, **CRC Crit Rev Bioeng.** v.3, p. 181-330, 1979.

EYLAR, E. H. et al. Contribution Of Sialic Acid To Surface Charge Of Erythrocyte. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 6, p. 1992-&, 1962

FONTES, A. **Sistema de micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas**. 2004. 271 f. Tese (Doutorado em Física). Universidade Estadual de Campinas, 2004.

FONTES, A.; BARJAS CASTRO, M. L.; FERNANDES, H. P.; THOMAZ, A. A.; HURUTA, R. R; POZZO, L.; BARBOSA, L. C.; COSTA, F. F; SAAD, S. T. O.; CESAR, C. L. Red blood cells mechanical and electrical properties using optical tweezers. *Journal of Optics. A, Pure and Applied Optics* (Print), v. 13, p. 044012, 2011.

FONTES, A.- Optical Tweezers as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells. **Plos One**. v. 7, p. 1 – 6, 2012.

FORGET, B.G., BUNN, H. F., Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. v. 3, a011684. 2013

GHAFFARI, S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. **Antioxid Redox Signal**. v. 10, p. 1923-1940, 2008.

GIORDANO, P. C.; HARTEVELD, C. L.; BAKKER, E. Genetic Epidemiology and Preventive Healthcare in Multiethnic Societies: The Hemoglobinopathies. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. V. 11, P. 6136-6146, 2014.

GRIER, D. G., “A revolution in optical manipulation.” **Nature**. v. 424, p. 810–816, 2003.

GREENBERG, M. J.; LIN, T.; SHUMAN, H.; OSTAP, E. M. Mechanochemical tuning of myosin-I by the N-terminal region. **Proc Natl Acad Sci**. v.112, p. E3337-E3344, 2015.

GRONER, W.; MOHANDAS, N.; BESSIS, M. 1980. New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ektacytometer. **Clin. Chem.** v. 26, p. 1435-1442, 1980.

GROTTO, Helena Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [online]. v. 30, p390-397, 2008.

HAFERLACH. **Color Atlas of Hematology. Practical Microscopic and Clinical Diagnosis.** Harald Thöml, Heinz Diem, Torsten Haferlach. 2ª edição Stuttgart · New York, 2004

HAIDAR, R., MHAIDLI, H., TAHER, A. T., Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia. **Eur Spine J.**;19(6):871–8. 2010

HELMI, N.; BASHIR, M.; SHIREEN, A.; AHMED, IM. Thalassemia review: features, dental considerations and management. **Electronic Physician** ;9(3):4003-4008. doi:10.19082/4003. 2017

HOCHMUTH, R.M. MOHANDAS, N. BLACKSHEAR, P.L. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. **Biophys. J.** v. 8, p. 747–762, 1973

HOCHMUTH, R., K. BUXBAUM, et al. "Temperature dependence of the viscoelastic recovery of red cell membrane." **Biophysical Journal** 29 (1): 177-182. 1980

HOCHMUTH, R.M. WAUGH, R.E. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. **Ann. Rev. Physiol.** v. 49, p. 209–219, 1987.

HUANG, Y.-X., WU, Z.-J., MEHRISHI, J., BAO-TIAN HUANG, B.-T., CHEN, X.-Y., ZHENG, X.-J., LIU, W.-J. and LUO, M. Human Red Blood Cell Aging: Correlative Changes In Surface Charge And Cell Properties. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2634-2642, 2011.

HUNTER, R. J. Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications. **London Academic Press**, 1981.

JAROLIN, P. RUBIN, HL. ZAKOVA, D. STORRY, J. REID, ME. Characterization of seven low incidence blood group carried by erythrocyte band 3 protein. **Blood.** v. 92, p. 4836-43, 1998

JOHNSON, R. M. Ektacytometry of red blood cells. **Methods in Enzymology.** v. 173, p.35-54, 1989.

JOHNSON, R. M. **Ektacytometry of red blood cells. Methods in Enzymology.** v. 173, p.35-54, 1989. 1980.

KADRI, Z., LEFEVRE, C., GOUPILLE, O., PENGLONG, T., GRANGER-LOCATELLI, M., FUCHAROEN, S., CHRETIEN, S. Erythropoietin and IGF-1 signaling synchronize cell proliferation and maturation during erythropoiesis. **Genes & Development**, 29(24), 2603–2616. <http://doi.org/10.1101/gad.267633.115>. 2015

KAHANE, I. et al. The erythrocyte membranes in beta-thalassemia. Lower sialic acid levels in glycophorin. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 596, n. 1, p. 10-17. 1980

KIM, Y.; KIM, K.; and PARK, Y.; Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances, Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology. ISBN: 978-953-51-0753-8, **InTech**, DOI: 10.5772/ 50698, 2012.

KIM, Y., J. Jeong, et al. "Polarization holographic microscopy for extracting spatiotemporally resolved Jones matrix." **Optics Express** 20(9): 9948-9955. 2012

KUYPERS, F. A.; SCOTT, M. D.; SCHOTT, M. A.; LUBIN, B.; CHIU, D. T. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. **J. Lab. Clin. Med.** v. 116, p. 535-545, 1990.

LIUSONG WU¹, ZHIYU PENG, SEN LU, MEI TAN, YING RONG, RUNMEI TIAN, YUHANG YANG, YAN CHEN and JINDONG CHEN. B thalassemia caused by compound heterozygous mutations and cured by bone marrow transplantation: A case report. **MOLECULAR MEDICINE REPORTS**. DOI: 10.3892/mmr.2017.7476. 2017

LEHNINGER, A.L.; COX, N. **Princípios de Bioquímica.** 4 ed.Savier Ed., 2006

LIMA, C. N. **Análise da carga elétrica da membrana e da ligação da lectina ligadora de manose (MBL) em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme.** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) da Universidade de Pernambuco, Recife. 2014

LIRA, R. B. **Estudo da Interação de Quantum Dots com células e direcionamento intracelular mediado por lipossomas.** 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) da Universidade Federal de Pernambuco. 2011

LUNER, S. J. et al. Effects Of Proteases And Neuraminidase On Rbc Surface Charge And Agglutination - Klinetic Study. **Vox Sanguinis**, v. 28, n. 3, p. 184-199, 1975.

MAMEDOV, N. N. et al. Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: Preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. **Nano Letters**, v. 1, n. 6, p. 281-286, Jun 2001.

MARTINS, M.A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Quím. Nova**, v.35, n.7, p. 1434-1446, ISSN 0100-4042, 2012.

MATOS, A. L. L., PEREIRA, G., CABRAL FILHO, P. E., SANTOS, B. S. FONTES, A. Delivery of cationic quantum dots using fusogenic liposomes in living cells, In **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Volume 171, Pages 43-49, ISSN 1011-1344. 2017

MEDINTZ, I. L. et al. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. **Nature Materials**, v. 4, n. 6, p. 435-446, 2005

MEHRISHI, J. & RISSO, A. (2016). Revisting red blood cell heterogeneity, membrane molecules and surface charge changes in normal, anaemic and thalassaemic red blood cells for blood microsample test development. **Journal of Biological Physics and Chemistry**. 16 47–64. 47-64. 2016

MELO-REIS, P. R. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. vol.42, n.6, pp.425-430. ISSN 1678-4774. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442006000600004>. 2006

MEYERS, M.A., CHEN, P.Y. Biological Materials Science. (1st ed.). **Cambridge University Press**, New York, 2014.

MICHALET, F. F. PINAUD, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. SUNDARESAN, A. M. WU, S. S. GAMBHIR, S. WEISS. Quantum Dots for Live Cells, in **Vivo Imaging, and Diagnostics**. **Science** 30, 538 – 544, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Orientações para o diagnóstico e tratamento das Talassemias Beta. 1ª edição, 184 p. Brasília, Distrito Federal. 2016

MOURA, D. S.; SILVA D. C. N.; WILLIAMS, A. J; BEZERRA, M. A. C.; FONTES, A.; ARAUJO, R. E. Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. **Review of Scientific Instruments**. v. 86, p. 053702, 2015.

MURADOR, Priscila and DEFFUNE, Elenice. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [Online]. v. 29, p. 168-178. 2007

NAOUM, P.C. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Pathol. Clin.** v. 23, p. 68-79, 1987.

NAOUM, P.C., NAOUM, F.A. **Doenças das células falciforme**, 1.ed., SP: Sarvier Ed., 2004.

NAOUM, P. C.; DONINI-DOMINGOS, C. R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 29(3):226-228. 2007

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. Iniciativa: **Academia de Ciência e Tecnologia (AC&T) e CDA Laboratórios**. Hemoglobinopatias- Hemoglobinas Intáveis. Disponível em: <<http://www.hemoglobinopatias.com.br/hb-instaveis/hb-instaveis-index.htm>> Acesso em: 03 de outubro de 2017

NI, H.; AMME, R. C. Ion redistribution in a electric double layer. **Journal of Colloid and Interface Science**. 260: 344-348, 2003.

OLIVEIRA, J. B.; MORAES, K. C. M.; **Hemoglobinopatias: uma questão de saúde pública** (Revisão bibliográfica). XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. (2009)

OLIVEIRA, M.B.S.C. **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro. 2013

OLUMUYIWA-AKEREDOLU, O. O.; SOMA, P.; BUYS, A. V.; DEBUSHO, L. K.; PRETORIUS, E. Characterizing pathology in erythrocytes using morphological and biophysical membrane properties: Relation to impaired hemorheology and cardiovascular function in rheumatoid arthritis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1859, Issue 12, Pages 2381-2391, ISSN 0005-2736, 2017.

ONDEI, Luciana de Souza. **Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos heterozigotos e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase**. 2009. 135 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2009.

PEARSON, T. C. Hemorheology in the Erythrocytoses. *Mt Sinai J Med*. v.68, p. 182-91, 2001.

PEREIRA. M. I. A. **Quantum dots bioconjugados a proteínas para identificação de antígenos eritrocitários do sistema ABO por citometria de fluxo**. 2014. 75 f. Monografia (curso Biomedicina) da Universidade Federal de Pernambuco. 2014

PEREIRA, GORETI ; LEITE, E. S. ; PEREIRA, G. A. L. ; FONTES, A. ; SANTOS, B. S. . Quantum Dots. In: Margarita Sanchez-Dominguez, Carlos Rodriguez-Abreu. (Org.). *Nanocolloids - A Meeting Point for Scientists and Technologists*. 1ed.: **Elsevier**, v. 1, p. 131-158. 2016

PERREAULT, A. A.; VENTERS, B. J. Integrative view on how erythropoietin signaling controls transcription patterns in erythroid cells. **Curr Opin Hematol**. doi: 10.1097/MOH.0000000000000415. Jan 30, 2018

PRINCE, E. A.; SCHRIER, S. L. Hemoglobinopathies and Hemolytic Anemias. **ACP Medicine**. 1-34. 2008

POLLACK, W.; RECKEL, R. P. Reappraisal Of Forces Involved In Hemagglutination. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 54, n. 1, p. 29-42, 1977.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A.; "Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications". Handbook of Self Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics. **Elsevier**, Oxford, 2008

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, p. 3927-3938. 2008

SHAKED, N. T., L. L. SATTERWHITE, et al. "Quantitative microscopy and nanoscopy of sickle red blood cells performed by wide field digital interferometry." **Journal of Biomedical Optics** 16: 030506. 2011

SHAWKY, R. M., M. KAMAL, T. R. Thalassemia intermedia: An overview, **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, Volume 13, Issue 3, 2012, Pages 245-255, ISSN 1110-8630, <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.03.006>. 2012

SILVA, F.O.; VIOL, L.C.S.; FERREIRA, D.L.; ALVES, J.L.A.; SCHIAVON, M.A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933-1939, 2010.

SILVA, D. C. N. **Desenvolvimento de um Sistema de Pinças Ópticas para o Estudo de Interações Celulares- Aplicações em Hemoterapia**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

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

SILVA, D. C. N. **Propriedades biofísicas eritrocitárias analisadas por pinças ópticas – aplicações em hemoglobinopatias e hemácias estocadas em serviço de hemoterapia**. 2014. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, C. A. L.; LIMA, C. N.; SILVA, Y. S. S.; SILVA, D. C. N.; MOURA, P. M. M. F.; SANTOS, B. S.; PEREIRA, G.; FONTES, A. **Biophysical Properties of Red Blood Cells Using Optical Tweezers - Applications in Biomedicine. Biophysical Properties of Red Blood Cells Using Optical Tweezers - Applications in Biomedicine**. 7ed. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, v., p. 45-54. 2017

SPARKES I., WHITE R.R., COLES B., BOTCHWAY S.W., WARD A. (2018) Using Optical Tweezers Combined with Total Internal Reflection Microscopy to Study Interactions Between the ER and Golgi in Plant Cells. In: Hawes C., Kriechbaumer V. (eds) *The Plant Endoplasmic Reticulum. Methods in Molecular Biology*, vol 1691. Humana Press, New York, NY

STAMATOYANNOPOULOS, G. "Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation." **Exp Hemato.** v. 133, p. 259-71. 2005

STEINBERG MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* May; 129(4):465-81. 2005

STRATTON, F. et al. Role Of Zeta Potential In Rh Agglutination. **Vox Sanguinis**, v. 24, n. 3, p. 273-279, 1973.

SURESH, S.; SPATZ, J.; MILLS, J. P.; MICOULET, A.; DAO, M.; LIM, C. T.; BEIL, M.; SEUFFERLEIN, T. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria, **Acta Biomaterialia**. v. 1, p. 15-30, 2005.

SUTERA, S. P.; GARDNER, R. A.; BOYLAN, C. W.; CARROL, G. L.; CHANG, K. C.; MARVEL, J. S.; KILO, C.; GONEN, B.; WILLIAMSON, J. R. Age-related changes in deformability of human erythrocytes. **Blood**. v. 65, p. 275-282, 1985.

SILVA. C. A. L.; LIMA, C. N.; SILVA, Y. S. S.; SILVA, D. C. N.; MOURA, P.; SANTOS, B. S.; PEREIRA, G. FONTES, A. Biophysical Properties of Red Blood Cells Using Optical Tweezers – Applications in Biomedicine. IN: **Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education**. Espanha, A. Méndez-Vilas, Ed. 45-54. 2017

TAHER A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. **Blood Cells Mol Dis.**; 37(1):12-20. 2006

TANG, Y., HUANG, Y.; SHEN, W.; LIU, G.; WANG, Z.; TANG, X. B.; FENG, D.X.; LIU, D. P.; and LIANG, C. C. "Cluster specific regulation pattern of upstream regulatory elements in human alpha- and beta-globin gene clusters." **Exp Cell Res**. v. 314, p. 115-22, 2008.

TEIXEIRA, P. M. S. **Hemoglobinopatias: clínica, diagnóstico e terapêutica**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra. 2014

TOKUMASU, F.; NARDONE, G. A.; OSTERA, G. R.; FAIRHURST, R. M.; BEAUDRY, S. D.; HAYAKAWA, E.; DVORAK, J. A. Altered Membrane Structure and Surface Potential in Homozygous Hemoglobin C Erythrocytes. **Plos One**. v. 4, 2009.

WEATHERALL, D.J. The thalassemias disorders of globin synthesis: The thalassemias. In: **Williams Haematology** (eds M. Lichtman, E. Beutler, K. Kaushansky, T.J. Kipps, U. Seligshon and J.T. Prchal), 7th edn, pp. 633–708. New York: McGraw-Hill, 2006.

YAARI, A. Mobility of Human Red Blood Cells of Different Age Groups in an Electric Field. **Blood** 33: 159–163. 1969

YAWATA, Y. **The Red Blood Cell as a Model**. WILEY-VCH. Online ISBN: 9783527601530, DOI: 10.1002/3527601538, 2003.

YOON, D., YOU, D. Continuum modeling of deformation and aggregation of red blood cells. **Journal of Biomechanics**. 2015

YU, W.W. et al. 2003. Experimental determination of the extinction coefficient of the CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. **Chemical Materials**, v.15, n. 14, p. 2854 – 2860.

YUAN, Y.; TAM, M. F.; SIMPLACCEANU, V.; HO, C.; New Look at Hemoglobin Allostery. **Chemical Reviews**. v. 115, p. 1702–1724, 2015.

ZAGO, M. A.; CALADO, R. T. Eritropoese e eritropoetina. Produção e destruição de hemácias. In: Marco A. Zago; Roberto P. Falcão; Ricardo Pasquini. (Org.). **Tratado de Hematologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013, v. 1, p. 15-22.

ZHANG, H. U.; LIU, K. K. Optical tweezers for single cells. **J. R. Soc. Interface**. v.5, p.671–690, 2008.

ZHU, C.; BAO, G.; WANG, N. Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. **Annu Rev Biomed Eng**. v.2, p.189-226, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE - CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO MICROSCOPY AND IMAGING SCIENCE: PRACTICAL APPROACHES TO APPLIED RESEARCH AND EDUCATION

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

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

ANEXO A - TRABALHO APRESENTADO NO CONGRESSO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOFÍSICA (2016).



II Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica – SBBf
12 a 16 de Junho de 2016 – Acarajú, SE



Title: Pinças Ópticas para Avaliação da Elasticidade de Hemácias de Portadores de Beta-Talassemia Intermediária

Times new roman, 14, bold

Authors: Y. S. S. Silva¹, D. C. N. Silva², C. N. Lima¹, M. A. C. Bezerra¹, P. M. M. F. Moura³, B. S. Santos⁴, A. Fontes¹

Times new roman, 12

Affiliations: Departamento de Biofísica e Radiobiologia - Universidade Federal de Pernambuco¹, Colegiado de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Vale do São Francisco², Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco³, Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco⁴

Times new roman, 10

Abstract:

Times new roman, 12, justify, single spacing.

A pinça óptica (PO) é uma ferramenta biofotônica que vem sendo cada vez mais utilizada no estudo da biologia celular. A PO é baseada na luz e é constituída por um laser no infravermelho próximo fortemente focalizado pela objetiva de um microscópio óptico. Através da transferência de momento dos fótons, a PO é capaz de aprisionar pequenas partículas na região próxima ao foco do laser. Dessa forma essa técnica se torna uma vantajosa ferramenta capaz de capturar, manipular e extrair informações a nível celular sem que ocorra contato mecânico com a amostra. Por ser uma técnica bastante sensível, a PO permite a avaliação de propriedades biofísicas, tais como o estudo comparativo da elasticidade de eritrócitos normais e eritrócitos alterados por algum fator, como por exemplo as doenças hematológicas. A deformabilidade é um parâmetro bastante crítico para a função dessas células na corrente sanguínea, pois para fazer trocas gasosas e transporte de nutrientes, os eritrócitos precisam passar por capilares muitas vezes menores que seu diâmetro. Alterações fisiológicas, tais como modificações na constituição da hemoglobina podem gerar perda ou diminuição da deformabilidade e da funcionalidade do eritrócito que, consequentemente, pode levar a uma menor sobrevivência dessas células na circulação. Neste trabalho a PO foi usada para avaliar o comportamento biomecânico de eritrócitos normais e de eritrócitos de portadores de uma hemoglobinopatia, a beta-talassemia intermediária. Além disso, foi também analisada a ação da hidroxiureia (HU) na reologia dos eritrócitos dos portadores da beta-talassemia intermediária, uma vez que a HU é uma droga utilizada no tratamento. Para isso, através da PO, os eritrócitos foram capturados pelo laser e arrastados com velocidades constantes e controladas através do soro sanguíneo, o que promoveu a deformação dos mesmos nesse fluido. Do equilíbrio das forças hidrodinâmica e elástica, se correlacionou a elongação dessas células com as velocidades de arraste e obteve-se a elasticidade. Os valores encontrados para as médias das elasticidades mostraram que os eritrócitos de portadores de beta-talassemia intermediária são cerca de 33% mais rígidos, ou seja, as células se apresentam menos deformáveis em comparação aos controles. Já os resultados preliminares encontrados para a elasticidade eritrocitária média após o uso da HU, indicaram um valor mais próximo ao controle quando comparado aos pacientes que não fazem o uso da droga. Com esse estudo foi possível adquirir um maior conhecimento sobre os efeitos das alterações que ocorrem nessa doença hematológica e como eles atuam na reologia celular.

Acknowledgments: FACEPE, CAPES, CNPq e INCT de Fotônica

ANEXO B - TRABALHOS APRESENTADOS NO CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOFÍSICA 2017

P.201

OPTICAL TWEEZERS AND VIDEOMICROSCOPY TO EVALUATE RED BLOOD CELLS RHEOLOGY

Yandilla S. S. Silva¹, Diógenes S. Moura¹, Fabiano A. P. Crisafuli¹, Diego C. N. Silva², Marcos A. S. Oliveira¹, Jaqueline C. Peres³, Renato E. de Araujo¹, Adriana Fontes¹

¹Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, UFPE, Recife – PE, Brazil (email: yandillasuellen01@gmail.com); ²UNIVASF, Petrolina – PE, Brazil; ³Fundação Hemope, Recife – PE, Brazil.

In the present work, we explored the videomicroscopy and the optical tweezer as a biophotonic tool to characterize rheological properties of red blood cells (RBC). In particular, we have determined the RBC shear elasticity (μ) and membrane viscosity (η) using a homemade Labview subroutine that allows us to extract both parameters simultaneously. The elasticity was obtained by analyzing the RBC length when it was dragged with six constant velocities (from 140 to 315 $\mu\text{m/s}$). The membrane viscosity was evaluated by the recovery time, τ , that the elongated RBC takes to return to its original conformation after been dragged with the velocity 280 $\mu\text{m/s}$. RBC elasticity, viscosity and the recovery time are related by the equation, $\tau = \eta/\mu$. Once μ and τ were obtained experimentally, it was possible to find the RBC membrane viscosity. After establishing the methodology to normal RBCs, μ , η and, τ values for RBCs obtained from β thalassemia intermediate patients were also determined. Preliminary results suggest that β thalassemic intermediate RBCs are 29% less elastic and present a η and a τ about 80% and 43% higher than normal RBCs. Thus, we can conclude that the optical tweezer is a valuable tool to elucidate the RBC rheology that is essential to understand physiological changes resulting from intrinsic or extrinsic conditions, such as hemoglobinopathies.

This work was supported by CAPES, CNPq, FACEPE, HEMOPE, and INCT-INFo.

P.210

RED BLOOD CELL MEMBRANE CHARGE EVALUATION IN HEMOGLOBINOPATHIES USING CATIONIC QUANTUM DOTS

Tiago H. S. Souza¹, Carinna N. Lima^{1,5}, Yandilla S. S. Silva¹, Fabiano A. P. Crisafulli¹, Diego C. N. Silva², Jaqueline C. Peres³, Beate S. Santos⁴, Patricia Moura⁵, Adriana Fontes¹

¹Depto. de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife – PE, Brazil; ²UNIVASF, Petrolina – PE, Brazil; ³Fundação Hemope, Recife – PE, Brazil; ⁴Depto. de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife – PE, Brazil; ⁵Instituto de Ciências Biológicas, UPE, Recife – PE, Brazil.
(Email: thiago.phss@hotmail.com)

Hemoglobinopathies are a group of hematological diseases characterized by a set of alterations in red blood cell (RBC) globin chains that lead to changes in the function and/or stability of the hemoglobin molecule. It is presumed that these alterations may induce modifications in the RBC negative membrane charge, which prevents RBCs from aggregating not only with each other but also with endothelial cells. Thus, the aim of this work was to study the electrical charge modifications on the surface of sickled (HbSS) and β -thalassemia intermedia (Hb β) RBCs when compared with healthy (HbA) ones. The study was performed by flow cytometry exploring the electrostatic interaction of fluorescent cationic quantum dots (QDs) with the negative surface of RBCs. For this, CdTe QDs stabilized with cysteamine were synthesized and optically characterized. Results indicated a significant reduction in the negative membrane charge of HbSS and Hb β RBCs, since the labeling percentages were respectively 88.7% and 77.7%, when compared to healthy HbA RBCs (97.3% - $p < 0.01$). This difference was more noteworthy when observing the medians of the fluorescence intensity, for which HbSS and Hb β presented, respectively, a signal of about 50% and 55% lower than HbA ($p < 0.01$). Therefore, results suggest that the alterations suffered by HbSS and Hb β RBCs imply in the reduction of their negative membrane charge, acting negatively on the systemic homeostasis. Additionally, cationic QDs have proved to be a valuable tool for elucidating cell surface charges that are essential to understand physiological alterations resulting from hemoglobinopathies.

This work was supported by CAPES, CNPq, FACEPE, HEMOPE, and INCT-INFO.

ANEXO C - PARECER COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DE HEMOGLOBINOPATIAS E DA AÇÃO DA HIDROXIURÉIA SOBRE AS PROPRIEDADES ELÉTRICAS E BIOMECÂNICAS ERITROCITÁRIAS ATRAVÉS DE PINÇAS ÓPTICAS

Pesquisador: Diego César Nunes da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52781115.7.3001.5195

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.719.437

Apresentação do Projeto:

Resumo: A incorporação de lasers na microscopia óptica tem colaborado consideravelmente para as mais modernas pesquisas nas áreas biomédicas com propósitos de manipulação, medidas, diagnóstico e microanálise. Dentre estas técnicas, destacam-se as pinças ópticas (POs), ferramenta fotônica baseada na transferência de momento de fótons, capaz de capturar e manipular partículas com dimensões entre 50 nm a 50 m, faixa ideal para estudos celulares. Pode-se também dizer que uma grande contribuição das POs é sua habilidade de extrair a correlação existente entre o mundo mecânico e químico dos diversos sistemas biológicos. Para o estudo da biologia eritrocitária, pode-se dizer que a deformabilidade celular é uma propriedade crítica para que as hemácias possam desempenhar bem suas funções na microcirculação, sendo esta uma consequência da sua capacidade elástica ou simplesmente da sua elasticidade celular (). Por outro lado, as cargas da superfície eritrocitária originam um potencial repulsivo denominado potencial Zeta () que atua prevenindo à agregação entre as hemácias e consequentemente a oclusão dos vasos sanguíneos. A pode ser medida capturando as células através das POs e arrastando as mesmas a uma velocidade constante através do soro sanguíneo, simulando assim seu comportamento na microcirculação. Já o pode ser obtido através da mensuração da velocidade terminal atingida pelo eritrócito após ser liberado das POs sob ação de uma voltagem

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171

Bairro: Graças

CEP: 52.011-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3182-4771

Fax: (81)3182-4660

E-mail: cep.hemope@gmail.com