



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - CCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA/CCET

Maria do Socorro do Nascimento Amorim

Investigação ultraestrutural e nanomecânica de glóbulos vermelhos com alterações morfológicas precoces de portadores de anemias hemolíticas

São Luís

2021

Maria do Socorro do Nascimento Amorim

Investigação ultraestrutural e nanomecânica de glóbulos vermelhos com alterações morfológicas precoces de portadores de anemias hemolíticas



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

Coorientador: Prof. Dr. Jerias Alves Batista

São Luís

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Amorim, Maria do Socorro do Nascimento.

Investigação ultraestrutural e nanomecânica de glóbulos vermelhos com alterações morfológicas precoces de portadores de anemias hemolíticas / Maria do Socorro do Nascimento Amorim. – 2021.

99 p.

Coorientador: Jerias Alves Batista.

Orientadora: Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Física/CCET, Universidade Federal do Maranhão, Online (Plataforma Google Meet), 2021.

1. Biomecânica. 2. Eritrócitos. 3. Anemias Hemolíticas. 4. AFM.
I. Alencar, Luciana Magalhães Rebêlo. II. Batista, Jerias Alves. III. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Maria do Socorro do Nascimento Amorim

**INVESTIGAÇÃO ULTRAESTRUTURAL E NANOMECÂNICA DE GLÓBULOS
VERMELHOS COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PRECOSES DE
PORTADORES DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Aprovado em: 30/09/2021

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Luís

Prof. Ralph Santos Oliveira
Universidade Estadual da Zona Oeste - UEZO

Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Junior
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

Profª. Dra. Adriana Fontes
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

São Luís

2021

DEDICATÓRIA

*Ao meu avô Haroldo (in memoriam) e
ao meu anjinho Vinicius (in memoriam).
Vocês sempre estarão presentes em minha vida.*

*“Um dia, por trás de toda agonia,
entenderei que em tudo me guardou o
Teu amor”.*

Rosa de Saron

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo sustento e amparo em todo o caminho percorrido. O Seu amor sempre me sustentará;

À professora Dra. Luciana, pela orientação neste trabalho. Agradeço pela disponibilidade e acolhimento que sempre demonstrou. Obrigada pela paciência, amizade e por toda ajuda, principalmente nestes tempos de pandemia. Admiro sua garra e seu amor pela pesquisa, que serão exemplos para minha formação;

Ao professor Dr. Jerias, que desde o início da graduação me incentivou a buscar sempre mais conhecimento. Obrigada pela disponibilidade e amizade de sempre;

Aos professores Franciné, Mariana e Erivelton, por suas contribuições nesta pesquisa, sempre dispostos a ensinar e ajudar. Obrigada pela disponibilidade e seus ensinamentos;

À professora Ivone, amiga e incentivadora da minha jornada acadêmica;

À coordenação e ao corpo docente da Pós-Graduação em Física da UFMA;

Aos colegas do Laboratório de Biofísica e Nanosistemas, pelos momentos de conversas no laboratório e contribuições na pesquisa;

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR), na pessoa do Dr. Neto, pela concessão das amostras utilizadas neste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

Aos meus pais, Ana Maria e Manoel Carlos, pelo amor e apoio incondicional. Obrigada por não medirem esforços para que mais esta etapa fosse concluída. O conhecimento é a herança mais importante que vocês poderiam me dar;

Aos meus irmãos Carlos Natã e Carlos Adriano, pelos momentos fraternos. Obrigada pela compreensão;

À minha irmã Ramille Santana, minha pequena grande companheira. Obrigada por me ouvir e me apoiar nas ideias e sonhos mais confidenciais;

Ao meu primo Walbemário, pelo incentivo às minhas conquistas;

Às amigas queridas Inara, Beth, Gegê, Marina, Brenda e Lohanna. Vocês são fundamentais em minha vida;

Aos amigos Leonardo e Francisco, pelos momentos de confraternização e aprendizado.
Obrigada pela amizade e companheirismo;

Aos meus pequenos Heloísa, Helena, José, pela pureza e amor sincero;

Ao meu avô Haroldo (In memoriam), que sempre se referiu a mim como professora. Que o senhor sinta orgulho de sua neta de onde estiver;

Ao meu anjinho Vinicius (In memoriam), filho da minha primeira amiga, por me trazer apenas momentos de felicidades. Te amarei para sempre;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, contribuindo com palavras, gestos e orações.

Muito obrigada!

RESUMO

Há várias doenças caracterizadas por alterações nas propriedades biomecânicas de eritrócitos. As anemias hemolíticas são um exemplo clássico, configurando no cenário mundial como as doenças hereditárias de maior incidência. Anemia falciforme e talassemia são tipos de anemias hemolíticas causadas por alterações na estrutura da hemoglobina, molécula presente nos eritrócitos e responsável pela realização de sua função primordial: o transporte de oxigênio. As doenças falciformes têm origem patológica na síntese de uma hemoglobina anormal, a HbS, enquanto a talassemia resulta na extinção ou diminuição da síntese de cadeias α e β normais, que compõem a hemoglobina. Um estudo mais detalhado, em escala celular, pode trazer novas informações sobre a patogênese e evolução dessas doenças. Usando o potencial das técnicas advindas da Microscopia de Força Atômica para sondar propriedades físicas em nanoescala, neste trabalho foram investigadas as propriedades biofísicas de eritrócitos de doadores saudáveis e comparadas àquelas provenientes de indivíduos com diferentes mutações de anemia falciforme e talassemia. As amostras foram obtidas por meio de parceria estabelecida com o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão - HEMOMAR. Os resultados revelam que propriedades específicas, como rugosidade da membrana e rigidez celular, sofrem alterações mesmo em um estágio inicial das doenças. Destacam-se os resultados que envolvem o traço falciforme (HbAS), em que o portador deste tipo de hemoglobina é considerado saudável no entanto, alterações significativas observadas nas propriedades de membrana, como rigidez, adesão e rugosidade, trazem novas perspectivas para o entendimento desta mutação que podem auxiliar na elucidação, por exemplo, de eventos de morte subida associados a estes indivíduos. Este trabalho resultou na descrição biomolecular e nas assinaturas biomecânicas dos genótipos da anemia falciforme e talassemia, que, futuramente, poderão auxiliar na determinação de uma descrição biofísica mais precisa e no diagnóstico e prognóstico clínico dessas doenças.

Palavras-chave: Biomecânica. Eritrócitos. Anemias Hemolíticas. AFM.

ABSTRACT

Several diseases characterized by alterations in the biomechanical properties of erythrocytes are observed. Hemolytic anemia is a classic example, being the most prevalent hereditary disease in the world. Sickle Cell Anemia and Thalassemia are types of hemolytic anemia caused by alterations in the structure of hemoglobin, a molecule present in erythrocytes and responsible for carrying out its primary function: the transport of oxygen. Sickle cell diseases have a pathological origin in the synthesis of an abnormal hemoglobin, HbS, while thalassemia results in the extinction or decrease in the synthesis of normal α and β chains, which make up hemoglobin. A more detailed study, at the subcellular level, can bring new information about the pathogenesis and evolution of these diseases. Using the potential Atomic Force Microscopy techniques to probe physical properties at the nanoscale level, in this work, we investigated the biophysical properties of erythrocytes from healthy donors compared to those from individuals with different mutations of Sickle Cell Anemia and Thalassemia. Such samples were obtained through a partnership established with HEMOMAR. The results reveal that specific properties, such as membrane roughness and cell stiffness, undergo changes, even at an early stage of disease. The results obtained in samples of sickle cell trait (HbAS), particularly, are noteworthy, in which despite this type of hemoglobin is considered normal, however, significant changes in its membrane properties, such as stiffness, adhesion and roughness, bring new perspectives for understanding this mutation that may aid in elucidating, for example, rising death events associated with individuals that have this hemoglobin type. This work resulted in the biomolecular description and biomechanical signatures of the Sickle Cell Anemia and Thalassemia genotypes, which, in the future, may help in determining a more accurate biophysical description and in the diagnosis and clinical prognosis of these diseases.

Keywords: Biomechanics. Erythrocytes. Hemolytic Anemias. AFM.

LISTA DE FIGURAS

2.1	Célula humana e seus principais componentes.	6
2.2	Esquema de uma membrana celular composta de uma bicamada lipídica e proteínas.	7
2.3	Diagrama esquemático do desenvolvimento de células sanguíneas, desde células-tronco hematopoéticas até células maduras.	8
2.4	Estrutura de uma célula vermelha.	9
2.5	Figura esquemática da molécula de hemoglobina, evidenciando as duas cadeias alfa, duas cadeias beta, e o ferro presente nela.	10
2.6	Esquema ilustrando os tipos de hemoglobinas existentes nos eritrócitos.	10
2.7	Estrutura da membrana celular.	11
2.8	Representação química de resíduo de ácido siálico.	12
2.9	Representação dos corpúsculos de Heinz em eritrócitos.	17
2.10	Aspectos morfológicos dos eritrócitos em pacientes com beta-talassemia. (a) Variação de tamanho e formato das células. (b) Células em alvo e microcíticas.	17
2.11	Processo de polimerização, hemólise e vaso-oclusão na anemia falciforme.	20
2.12	Cristais Romboides em eritrócitos de hemoglobinopatia SC. As setas únicas indicam cristais extracelulares e a seta dupla indica cristal intracelular.	22
2.13	Imagem da estrutura de Si. Área varrida: 11,7 nm. Corrente de tunelamento: 0,74 nA.	25
2.14	Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica e seus componentes.	26
2.15	Descrição qualitativa para o potencial de Lennard-Jones $V(r)$ e para as forças atrativas de van der Waals e repulsivas de origem quântica.	32
2.16	Potencial de interação entre sonda-amostra e suas respectivas regiões nas quais os modos de operação do AFM atuam.	40
2.17	Figura esquemática de uma típica curva de deflexão/deslocamento adquirida em uma amostra macia.	42
2.18	Parâmetro R_a de rugosidade.	45

3.1	Preparação da amostra para as medidas. (a) Gota de sangue na lâmina. (b) Esfregaço do sangue. (c) Verificação do esfregaço no microscópio óptico. (d) Lâmina fixada no porta-amostra do AFM.	54
3.2	Preparação da amostra para as medidas no ghost eritrocitário. (a) Centrífuga com tubos eppendorf. (b) 1ª centrifugação. (c) 2ª centrifugação. (d) 3ª centrifugação.	55
3.3	Exposição da membrana eritrocitária interna. (a) Gota de poli-L-lisina na lâmina. (b) Esfregaço do sangue. (c) Lâmina lavada. (d) Jato de PBS nas células. (e) Lâmina com <i>ghost</i> eritrocitário.	56
3.4	Microscópio de Força Atômica Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA) localizado no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas da UFMA.	57
3.5	Curva de força mostrando as regiões de força a partir das quais cada uma das propriedades nanomecânicas foram calculada.	58
4.1	Perfil de células com morfologia alterada.(A) Eritrócito saudável. (B) Eritrócito em forma de lágrima (dacriócito). (C) Eritrócito com a membrana irregular apresentando espículas nas bordas (equinócito). (D) Eritrócito em alvo (codócito).	62
4.2	Membrana de eritrócitos (A) observada por esfregaço de sangue total e (B) observada após processo de lavagem por centrifugação.	63
4.3	Ultraestrutura da membrana celular. (A) Área celular de $10 \mu\text{m}^2$. (B) Mapa com zoom de $1 \mu\text{m}^2$ sobre a região central da célula.	64
4.4	Rugosidade da membrana. Gráfico dos valores médios da rugosidade com os respectivos erros-padrões.	64
4.5	Membrana eritrocitária com cargas negativas e ácido siálico em sua superfície (também representada por seu grupo químico).	65
4.6	Diferentes dimensões celulares. (A) Célula de amostra controle e (B) seção transversão mostrando seu perfil; (C) célula de anemia falciforme com maior dimensão e (D) seu respectivo perfil e (E) Célula de β -talassemia e (F) seu respectivo perfil.	68
4.7	Gráfico do parâmetro geométrico de área dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.	69
4.8	Gráfico do parâmetro geométrico de volume dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.	70

4.9	Gráfico da razão área/volume dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.	72
4.10	Gráfico de adesão para as amostras de hemoglobinopatias estudadas. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.	74
4.11	Gráfico de dureza para as amostras de anemias hemolíticas. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.	79
4.12	Cristal na hemoglobinopatia SC. (A) Cristal na face de um eritrócito indicado pela seta. (B) Cristal externo à célula. (C) enquadramento sobre a face do cristal evidenciando detalhes do plano cristalino. (D) Corte da secção transversal no plano cristalino.	81
4.13	Face interna de membranas eritrocitárias. (A) Amostra HbAA. (B) Amostra HbSS. (C) Amostra Hb β Tal.	83
4.14	Gráfico de rugosidade para a face interna das membranas eritrocitárias.	83
4.15	Imagem da face interna da membrana eritrocitária, com áreas de 10, 5 e 1 μm^2 , respectivamente, revelando detalhes de um canal de membrana.	84
4.16	Gráfico de adesão para a face interna da membrana eritrocitária. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.	85

LISTA DE TABELAS

2.1 Índices normais de hemoglobina. 14

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	5
2.1	Fundamentos de Biologia Celular	5
2.2	Eritrócito	8
2.3	Anemias Hemolíticas	13
2.3.1	Talassemia	15
2.3.2	Anemia Falciforme	18
2.3.3	Traço Falciforme	20
2.3.4	Hemoglobinopatias Associadas	21
2.4	Microscopia de Força Atômica	23
2.5	Forças em Nanoescala	27
2.5.1	Forças de van der Waals	27
2.5.2	Forças Eletrostáticas	35
2.5.3	Forças Iônicas	36
2.5.4	Forças entre Íons e Dipolos	37
2.5.5	Forças Capilares	37
2.5.6	Força de Dupla Camada em Fluidos	38
2.6	Modos de Operação do AFM	39
2.6.1	Espectroscopia de Força	41
2.6.2	PeakForce Quantitative NanoMechanics	43
2.7	Dados quantitativos a partir de mapas topográficos	43
2.8	Microscopia de Força Atômica no Estudo de Eritrócitos	46
3	Materiais e Métodos	53
3.1	Aquisição das amostras	53
3.2	Preparação das amostras	54
3.2.1	Preparação de amostra para investigação de membrana externa	54
3.2.2	Preparação de eritrócitos para investigação da região interna da membrana	55
3.3	Experimentos de Microscopia de Força Atômica	56
3.3.1	Parâmetros de varredura	56

3.3.2	Análises Ultraestruturais	57
3.3.3	Análises Nanomecânicas	58
4	Resultados e Discussões	61
4.1	Análise das propriedades ultraestruturais da face externa da membrana eritrocitária	61
4.2	Análise das propriedades físicas da face externa da membrana eritrocitária . . .	73
4.3	Análise das propriedades de superfície da face citoplasmática da membrana eritrocitária	82
5	Conclusões e Perspectivas	87
	REFERÊNCIAS	90
A	ANEXO	103

1. Introdução

O corpo humano é composto por uma grande quantidade de células que desempenham papel fundamental na saúde humana, com funções específicas, tais como: nutrição, proteção e produção de energia. Uma célula típica é composta por núcleo, citoplasma, organela e membrana plasmática. Dentre as células que compõem o corpo humano, podemos destacar as células vermelhas do sangue, denominadas de eritrócitos.

Os eritrócitos são células anucleadas responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos, através da hemoglobina. A hemoglobina é uma estrutura quaternária composta de quatro grupos hemes e dois pares de cadeias polipeptídicas de globina, cadeias α e β . Para que desempenhem sua função de forma eficaz no corpo humano, estas células são continuamente submetidas a deformações, seja distensão ou compressão, no processo de circulação sanguínea ^[1].

A membrana do eritrócito é formada por uma dupla camada lipídica, proteínas e o esqueleto da membrana. O citoesqueleto faz parte da estrutura celular e tem, em sua composição, polímeros filamentosos que lhes dão a forma de uma malha. Além de atuar na sustentação e manutenção da forma da membrana, o citoesqueleto participa de processos como contração e transporte celular, através da interação de proteínas ^[2]. Processos fisiológicos e patogênicos interferem nestas propriedades, de forma que se podem associar defeitos nos eritrócitos a várias doenças ^[2-6].

As anemias hemolíticas constituem um exemplo clássico de doenças caracterizadas por alterações na estrutura das células vermelhas ^[7]. A anemia falciforme e a talassemia são tipos de anemias hemolíticas causadas por alterações na estrutura da hemoglobina dos eritrócitos, sendo denominadas de hemoglobinopatias estruturais. A anemia falciforme tem origem patológica na síntese de uma hemoglobina anormal, HbS. A talassemia resulta na extinção ou diminuição da velocidade de síntese das cadeias normais α e β .

A estrutura celular está diretamente relacionada com as propriedades mecânicas das células. Por sua vez, as propriedades mecânicas celulares dependem diretamente da organização

do seu citoesqueleto, bem como das disfunções causadas pelas patologias. Assim, estudos que buscam o entendimento sobre como cada componente estrutural influencia no bom desempenho celular e como estes componentes são alterados em caso de doenças são fundamentais. Diante disso, muitas propriedades de eritrócitos (como sua característica de deformabilidade) atraíram, nos últimos anos, grande interesse no campo da Biologia e da Biofísica [8-10].

Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), esta última desenvolvida pelo físico alemão Ernst Ruska (1906-1988) [11], são técnicas comumente utilizadas para estudar a morfologia de células vermelhas. No entanto, a Microscopia Óptica é restrita por sua baixa resolução em comparação com a escala de comprimento celular. Quando observamos um objeto através de um microscópio óptico, seus contornos constituem um obstáculo à passagem das ondas luminosas, absorvendo algumas e permitindo o espalhamento de outras. O comprimento de onda da luz visível ocorre no intervalo de 400-760 nm, fazendo com que maiores detalhes visíveis sob um microscópio de luz tenham, no mínimo, uma separação de $0,2 \mu\text{m}$ [12]. Esta limitação é causada pela difração da luz nos contornos dos objetos. O MEV supera esse limite de resolução devido ao menor comprimento de onda dos feixes de elétrons; entretanto, esta técnica requer uma preparação extensa e em várias etapas das amostras, podendo incluir fixação química, dessecação e desidratação. Além disso, as células devem ser revestidas com uma fina camada de ouro-paládio antes de serem examinadas no MEV. Cada uma dessas etapas de preparação pode produzir artefatos que alteram as propriedades físicas das células e o tempo de aquisição de dados se torna maior. Entretanto, o ponto mais negativo desta importante ferramenta é o seu caráter destrutivo para amostras biológicas, por ter um feixe de elétrons altamente energético. Uma técnica mais direta e que requer menos etapas de preparação de amostra, oferecendo resolução semelhante ou superior, é preferível para o estudo de células vermelhas (hemácias).

Em 1986, o prêmio Nobel de Física [13] foi concedido a Ernst Ruska e aos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Heinrich Röhrer, pelo desenvolvimento do Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM - *Scanning Tunneling Microscope*) [14]. Este instrumento é capaz de obter imagens de superfícies em resolução atômica. Seu princípio de funcionamento baseia-se na utilização de uma sonda condutora que escaneia a superfície da amostra, medindo a corrente de tunelamento dos elétrons entre a sonda e a amostra causada por uma tensão aplicada entre elas. A corrente de elétrons é descrita por uma função que depende da distância sonda-amostra e da tensão aplicada, sendo posteriormente convertida em imagem de topografia [15].

A partir do desenvolvimento do STM, iniciou-se a produção de uma vasta classe de microscópios que não utilizam ondas como ferramenta para a obtenção das imagens. Estes equipamentos são genericamente denominados de Microscópios de Varredura por Sonda (SPM - *Scanning Probe Microscope*), sendo o Microscópio de Força Atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*) o mais importante deles. De forma geral, o AFM tem como princípio fundamental a medida das forças intermoleculares ou interatômicas entre uma ponta muito fina e a amostra e, posteriormente, sua transformação em um mapa topográfico que revele as características da superfície e informações de suas propriedades mecânicas ^[16]. Por meio da técnica de AFM, passou a ser possível estudar todos os tipos de materiais condutores e não condutores, já que esta técnica utiliza forças para aquisição de dados. O AFM ganhou popularidade para estudar materiais biológicos desde sua invenção, tendo capacidade de resolução atômica e permitindo análises em meio líquido ou em ar, além de fornecer mapas topográficos. Tudo isso com metodologia de preparo de amostras mais simples e sem danificar a estrutura do material ^[17-20].

A compreensão das funções celulares está diretamente ligada às informações acerca das suas propriedades mecânicas. O estudo e caracterização de células sadias e patológicas em caso de anemias hemolíticas, por exemplo, é fundamental para o entendimento de tais doenças. Esses sistemas apresentam particularmente as alterações nas propriedades mecânicas alteradas, como a dureza e a rugosidade ^[21,22]. A técnica de Microscopia de Força Atômica é uma ferramenta crucial para a investigação de tais propriedades físicas, possibilitando também dados quantitativos em nanoescala e contribuindo para a compreensão de como tais patologias afetam o sistema biológico ^[23].

Nesse contexto, o objetivo principal desse trabalho é a investigação das propriedades físicas e ultraestruturais de eritrócitos de portadores de anemias hemolíticas, como dureza e rugosidade a nível celular, identificando suas alterações por meio da comparação com eritrócitos de indivíduos saudáveis. Este tipo de análise é pioneira, contribuindo para novos conhecimentos acerca de anemias hemolíticas. Esse trabalho estrutura-se, primeiramente, com esta Introdução ¹. No capítulo seguinte, fazemos uma Revisão Bibliográfica ², na qual se descrevem conceitos de Biologia Celular, com foco especial nos eritrócitos, conceitos das anemias hemolíticas abordadas nesse trabalho, princípios da ferramenta central deste trabalho, o AFM, além de uma revisão sobre o emprego desse instrumento na investigação de eritrócitos. O capítulo seguinte descreve os Materiais e Métodos Empregados para investigação das amostras ³. Em seguida, apresentamos os Resultados e Discussões deste trabalho ⁴ e, por fim, as Conclusões e Perspectivas para

esta pesquisa ⁵, além das Referências Bibliográficas.

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, apresentamos a revisão bibliográfica sobre o sistema em estudo e as técnicas empregadas para desenvolvimento da pesquisa.

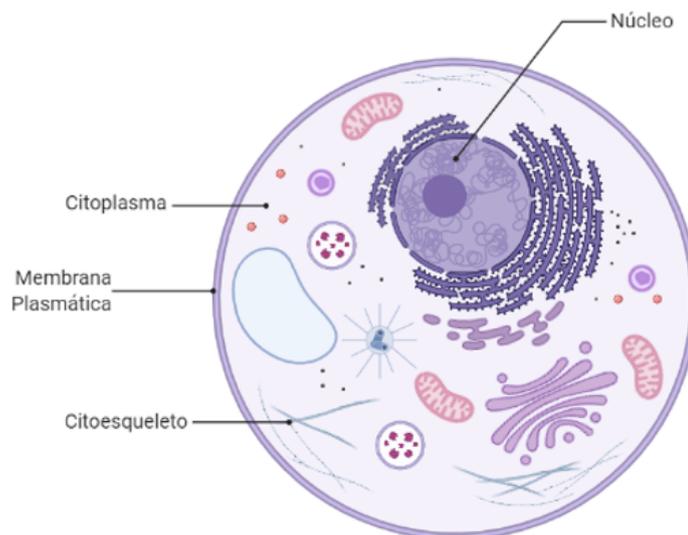
2.1 Fundamentos de Biologia Celular

A célula é a unidade fundamental em todos os organismos. No início, os biólogos enxergavam as células como simples sacos membranosos, contendo líquido com poucas partículas flutuantes. Sabemos, atualmente, que as células são infinitamente mais complexas. São muitos tipos, tamanhos e formas de células, cada uma exercendo funções únicas no corpo. O corpo humano é composto por uma grande quantidade de células que desempenham papel fundamental na saúde humana com funções específicas, tais como nutrição, proteção e produção de energia. Uma célula típica é composta pelo núcleo, citoplasma, organela e a membrana plasmática (Figura 2.1) ^[24].

Dentre as células que compõem o corpo humano, podemos citar as células da pele, dos ossos, dos músculos, as células epiteliais, os neurônios e as células do sangue. Em meio as semelhanças entre os vários tipos de células do corpo humano, salientamos que elas são continuamente submetidas a deformações, seja estiramento ou compressão, para que desempenhem seus papéis. Diante disso, a característica de deformabilidade das células atraiu, nos últimos anos, grande interesse no campo da Biologia e da Biofísica.

A estrutura celular está diretamente relacionada com as propriedades mecânicas das células. Por sua vez, as propriedades mecânicas das células dependem diretamente da organização do citoesqueleto celular. Assim, entender como cada componente influencia o bom desempenho celular é fundamental. Cada tipo de célula está inserida em um ambiente externo denominado matriz extracelular (MEC). A fronteira entre o interior da célula e a MEC constitui a membrana celular.

Figura 2.1: Célula humana e seus principais componentes.



Fonte: Adaptado da Ref. [25].

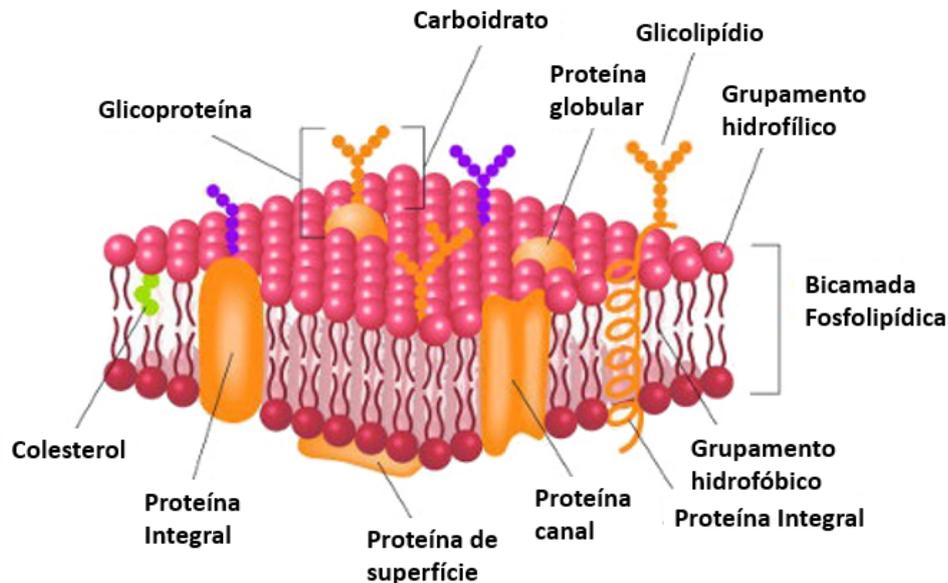
Uma das finalidades da MEC é fornecer estrutura física para células, assim como atuar no início de processos bioquímicos e biomecânicos [2]. Substâncias como água, proteínas e polissacarídeos compõem a MEC. Com sua estrutura bem organizada, atua na regulação das funções celulares, por exemplo: morfologia, adesão, migração, proliferação etc.

A membrana celular, que é uma bicamada lipídica, possui organização dinâmica multifuncional. Seu papel não é somente manter a integridade física da célula, mas também realizar, de forma satisfatória, uma série de funções fisiológicas importantes [26]. A membrana plasmática, com as suas proteínas embutidas, é o foco de todas as comunicações da célula com o ambiente externo. Ela age como sítio receptor, controla o transporte de moléculas para dentro e fora da célula e mantém o sinal de transferência entre células (por exemplo, do sistema nervoso). Quando disfuncionais, as membranas celulares podem ocasionar muitas doenças. Ou o contrário: muitas doenças podem alterar suas propriedades físicas (anemia falciforme, exemplificadamente) [2]. A Figura 2.2 mostra um exemplo de membrana celular.

Além de atuar como uma barreira entre o interior da célula e o ambiente externo, a membrana celular mantém a integridade da célula durante vários processos com sua alta flexibilidade. Isto é resultado de suas propriedades físicas que permitem uma agilidade para que ela se adequar diante da situação que a célula se encontra.

É importante destacar que as membranas celulares têm estrutura básica semelhante, assim como determinadas funções comuns; porém, de acordo com o tipo de célula, a sua membrana

Figura 2.2: Esquema de uma membrana celular composta de uma bicamada lipídica e proteínas.



Fonte: Adaptado da Ref. [27].

vai desempenhar certo papel distinto das outras. Isto se dá através das proteínas e lipídios que compõem aquele tipo de membrana celular. No caso dos neurônios, eles possuem a chamada bainha de mielina, que é uma membrana plasmática envolvida várias vezes em torno de uma célula. A bainha de mielina atua como um isolante elétrico passivo devido ao seu alto teor de lipídios. A composição distinta das membranas da mitocôndria é crucial para os processos catalisados por enzimas e, portanto, essas membranas têm mais proteínas do que lipídios [28].

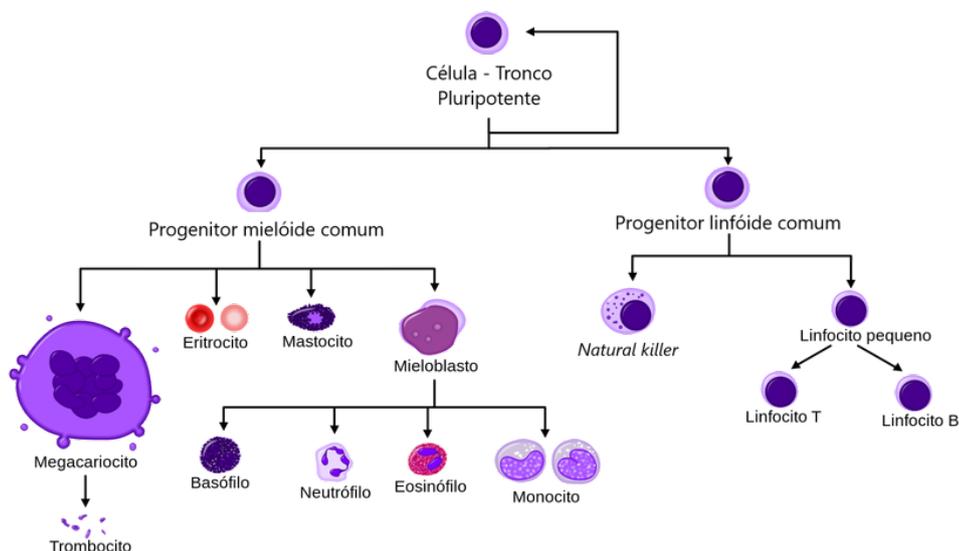
O citoplasma preenche o interior da célula e envolve duas partes: um citosol, que é a parte líquida, e uma rede de filamentos de proteínas denominada de citoesqueleto. O citoesqueleto faz parte da estrutura celular e tem em sua composição polímeros filamentosos que lhes dão a forma de uma malha. Juntamente com a membrana celular, atua no processo da forma e sustentação da célula.

As células possuem ainda capacidade de aderência por meio de interações moleculares específicas, o que também desempenha papel fundamental em vários processos biológicos, como prevenção de hemorragias (hemostasia), resposta imune e embriogênese inflamatória [29,30]. A perda de interações adesivas, bem como a estimulação da adesão, alterações na membrana e no citoesqueleto, podem resultar em estados de doenças [31].

2.2 Eritrócito

O sangue é um fluido corporal que fornece às células do corpo em que circula as substâncias necessárias para a manutenção da vida, como nutrientes e oxigênio, além de transportar resíduos metabólicos destas mesmas células. Na constituição do sangue periférico, temos três tipos de células: glóbulos vermelhos, também denominados eritrócitos ou hemácias; glóbulos brancos ou leucócitos e as plaquetas. O processo de formação de células sanguíneas é chamado de hematopoese ^[32]. A Figura 2.3 mostra um diagrama de desenvolvimento das células sanguíneas a partir da célula tronco hematopoiética.

Figura 2.3: Diagrama esquemático do desenvolvimento de células sanguíneas, desde células-tronco hematopoiéticas até células maduras.



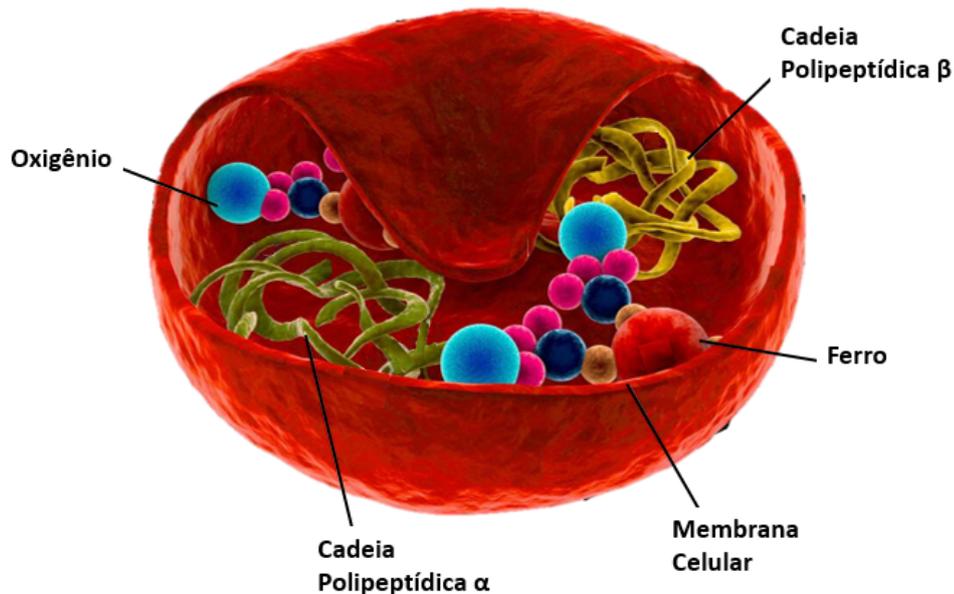
Fonte: Adaptado da Ref. [1].

Os eritrócitos estão presentes em maior quantidade no sangue e são responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos através da hemoglobina. Os glóbulos brancos são responsáveis pela defesa do organismo contra agentes infecciosos, tais como vírus ou bactérias. As plaquetas atuam na coagulação do sangue e são responsáveis pela formação do tampão plaquetário que age na prevenção de hemorragias.

Os eritrócitos são células anucleadas constituídas por membrana plasmática e citoplasma (Figura 2.4). Em condições normais, são produzidos em torno de 200 bilhões de novos eritrócitos por dia em um processo denominado eritropoese, que acontece na medula óssea. Os eritrócitos possuem formato circular bicôncavo e diâmetro médio de 6 a 8 μm . Sua altura, em média, é de

$2\ \mu\text{m}$, volume de $90\ \mu\text{m}^3$ e possui área superficial de aproximadamente $136\ \mu\text{m}^2$. Cerca de 95% das proteínas dos eritrócitos são constituídas de hemoglobina. Diante disso, a principal função dessas células é fornecer gás oxigênio (O_2) aos tecidos e retornar dióxido de carbono (CO_2) para os pulmões, através da hemoglobina [1].

Figura 2.4: Estrutura de uma célula vermelha.



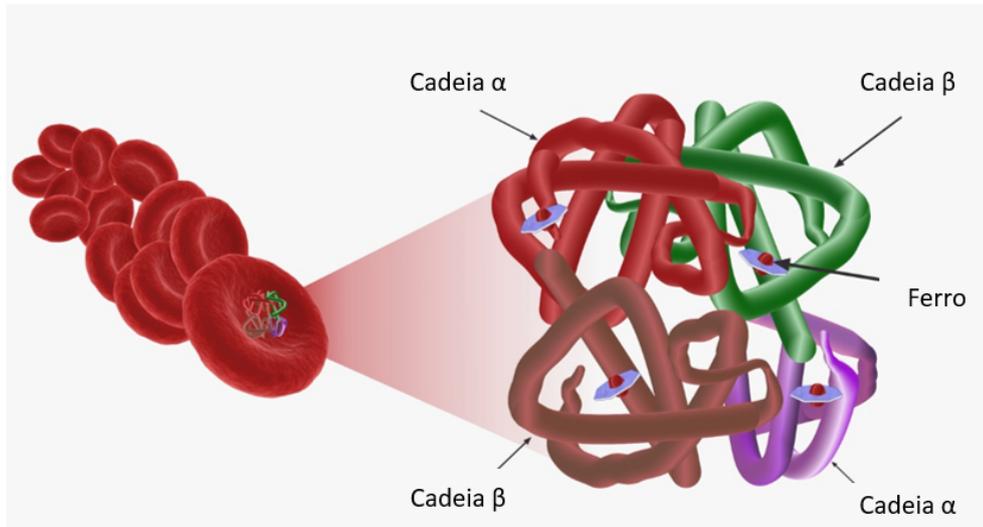
Fonte: Adaptado de [1].

A hemoglobina é uma estrutura quaternária e cada unidade contém um grupo heme e a globina. Além disso, cada grupo heme contém um átomo de ferro e uma molécula de oxigênio. A Figura 2.5 ilustra os pares de cadeias globinas α e β , junto com o ferro e a molécula de oxigênio contidos no grupo heme.

A hemoglobina predominantemente encontrada nos eritrócitos de um adulto é a hemoglobina A (HbA), constituída de duas cadeias α e duas cadeias β , cada uma com seu grupo heme. Em menor quantidade, são encontradas também a hemoglobina fetal (HbF) e a hemoglobina A_2 (HbA₂). As hemoglobinas HbF e HbA₂ contêm cadeias α , cadeias γ e δ , respectivamente, em vez de β . A troca da hemoglobina fetal ocorre geralmente no primeiro ano de vida. A Figura 2.6 mostra o esquema da composição das hemoglobinas existentes.

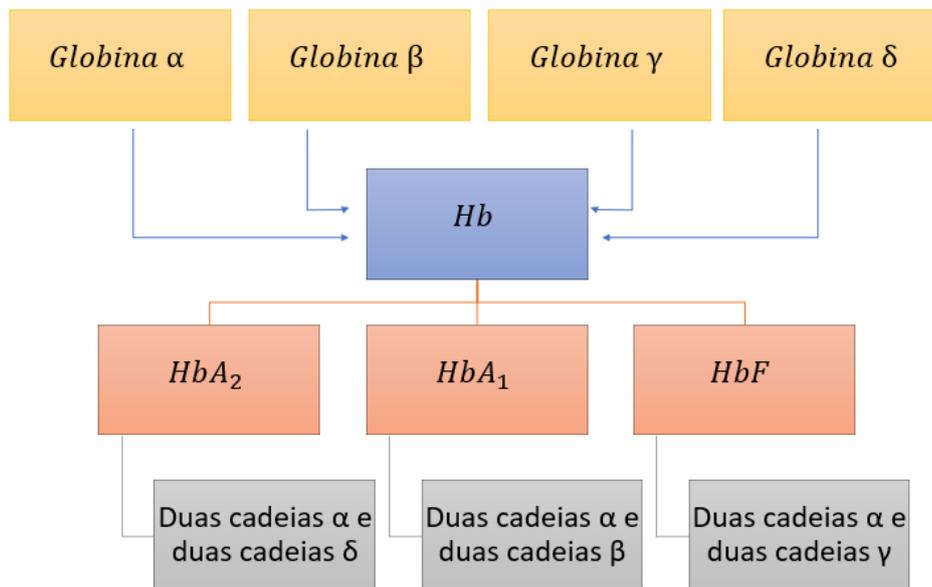
Para que a hemoglobina chegue de forma eficaz e entre em contato com os tecidos, ocorrendo assim as trocas gasosas, o eritrócito deve ser capaz de passar através de vasos sanguíneos com diâmetro menores que $3,5\ \mu\text{m}$. Para executar tal função, a membrana do eritrócito e suas propriedades elásticas atuam de forma direta, visto que é preciso ter uma grande deformabilidade

Figura 2.5: Figura esquemática da molécula de hemoglobina, evidenciando as duas cadeias alfa, duas cadeias beta, e o ferro presente nela.



Fonte: Gentilmente cedida por Prof. Erivelton Façanha.

Figura 2.6: Esquema ilustrando os tipos de hemoglobinas existentes nos eritrócitos.



Fonte: Própria autora.

e poder de restauração desta membrana, como mencionando anteriormente.

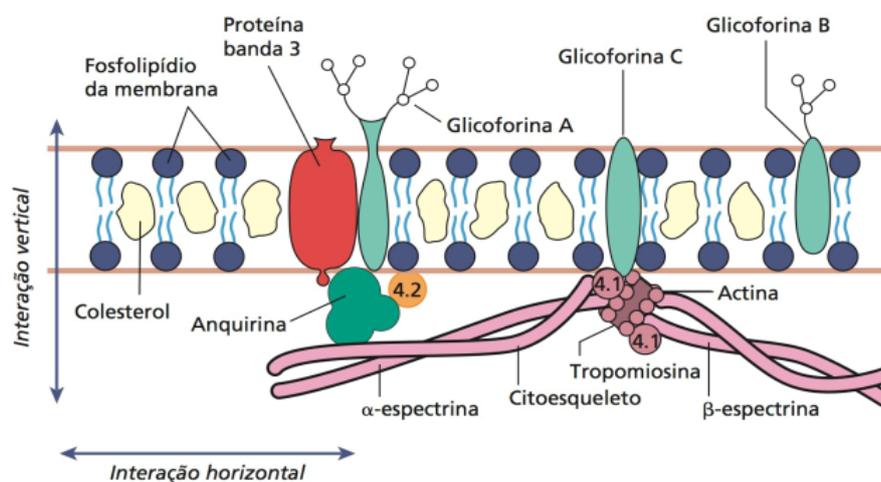
Dois elementos são fundamentais para o bom funcionamento dos eritrócitos: a membrana e o citoesqueleto. A composição da membrana plasmática do eritrócito contém 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídios e 5,8% de carboidratos. Os lipídios podem ser divididos em três classes: fosfolipídios, colesterol e glicolipídios. Os fosfolipídios são os mais abundantes e possuem partes hidrofílicas e hidrofóbicas. As partes hidrofílicas são expostas para fora, levando a

formação de uma bicamada lipídica. Nessa camada, as proteínas são dispostas em sua superfície ou podem se estender através da membrana e se ligarem ao citoesqueleto.

As proteínas são macromoléculas biológicas presentes em todas as células [33]. As proteínas presentes na membrana podem ser divididas em dois grupos: proteínas integrais e proteínas periféricas. As integrais são ligadas fortemente à membrana por meio de interações hidrofóbicas com os lipídios da bicamada. Exemplos destas proteínas que atravessam a membrana são as glicoforinas, que possuem receptores de membrana e antígenos que participam do reconhecimento célula–célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana, e a banda 3, denominada proteína transportadora de íons. As proteínas de membrana periféricas ficam localizadas na superfície citoplasmática e podem ser liberadas da membrana pela força iônica do meio ou por outras perturbações proteicas [7].

As proteínas periféricas formam o citoesqueleto da membrana, constituindo-se, principalmente, por espectrina, actina, anquirina, proteína 4.1 e 4.2. Mesmo após a extração das proteínas de membrana do eritrócito em presença de detergente, o esqueleto membranar conserva a forma da célula originária. Três das proteínas já mencionadas interferem essencialmente na estrutura: espectrina, actina e banda 4.1. A Figura 2.7 ilustra essas proteínas juntamente com a bicamada lipídica.

Figura 2.7: Estrutura da membrana celular.



Fonte: Retirado da Ref. 32 [32].

Além de atuar na sustentação e manutenção da forma da membrana, o citoesqueleto participa de processos como migração, divisão celular, contração e transporte celular, através

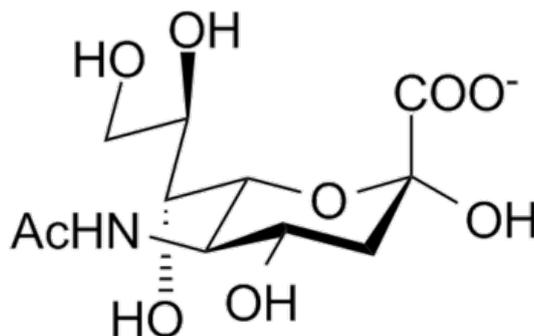
da interação de proteínas [2]. Dessa forma, é fundamental para manter a estabilidade da célula, pois é uma estrutura altamente dinâmica que passa por constante reestruturação, remodelação e modificação em resposta a sinais ambientais e intracelulares.

A espectrina é a proteína mais abundante na formação do esqueleto da membrana e consiste de duas cadeias α e β . Essas duas cadeias, enroladas, associam-se e formam tetrâmeros (esses, por sua vez, ligam-se com a actina e também com a proteína banda 4.1). A outra extremidade das cadeias beta-espectrina liga-se à anquirina, que está conectada à banda 3. Esta banda é a proteína transmembrana e age como canal iônico. A proteína 4.2 intensifica esta interação [32].

Os movimentos de interações verticais e horizontais entre estas proteínas controlam a deformabilidade e a elasticidade do eritrócito ao longo da circulação sanguínea. As interações verticais englobam as proteínas espectrina, anquirina e banda 3. Estas interações são responsáveis pela estabilização da dupla camada lipídica. As interações horizontais incluem a associação dos heterodímeros de espectrina e são responsáveis por manter a integridade estrutural da membrana após serem submetidos às tensões de cisalhamento [34,35].

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana, destacam-se os ácidos siálicos: uma família de carboidratos complexos de nove carbonos, ligados às glicoforinas A. Os resíduos de ácido siálico são abundantes na membrana plasmática do eritrócito e 60% da carga negativa presente em sua membrana são provenientes de sua presença. A manutenção da carga negativa nos eritrócitos é importante nas interações eritrócito–eritrócito e eritrócito–células sanguíneas. Um diagrama esquemático de uma molécula de ácido siálico é exibido na Figura 2.8

Figura 2.8: Representação química de resíduo de ácido siálico.



Fonte: Retirado da Ref. [36].

Exemplos do envolvimento dos ácidos siálicos em processos biológicos incluem as funções de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras. Um dos eventos biológicos que determinam a “idade” do eritrócito, cuja vida média é de aproximadamente 120 dias, é a perda dos resíduos de ácidos siálicos presentes em seus glicoconjugados de membrana. As unidades de ácidos siálicos encontradas nas extremidades protegem essas células da captação pelo fígado. Quando os eritrócitos estão velhos e prontos para a destruição e reposição, ocorre a remoção dos ácidos siálicos terminais pela enzima sialidase, expondo resíduos de galactose, que interagem com receptores dos hepatócitos ^[37].

As interações entre as células ou entre uma célula e a matriz extracelular necessitam da presença de moléculas na superfície, chamadas de receptores de superfície. Os receptores que participam dos fenômenos de adesão são denominados moléculas de adesão e são proteínas integrais da membrana. As interações adesivas entre as células e as interações das células com proteínas da matriz extracelular desempenham um papel no desenvolvimento embrionário e orgânico na defesa do hospedeiro e na manutenção da integridade vascular e epitelial. São exemplos de moléculas de adesão a integrina VLA-4 (integrina $\alpha_4 \beta_1$), CD36, ICAM-4 e BCAM/Lu. A alteração de adesão celular pode ser um evento decisivo para o aparecimento de numerosas doenças, tais como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, osteoartrite, doenças cardiovasculares e anemia falciforme ^[2].

O bom desempenho das funções celulares depende, entre outros fatores, do bom estado de sua estrutura. Assim, é necessário que as propriedades mecânicas das células estejam dentro dos padrões de normalidade. Processos fisiológicos e patogênicos interferem nestas propriedades, de forma que se podem associar defeitos nos eritrócitos a várias doenças ^[38]. As anemias hemolíticas constituem um exemplo clássico de doenças caracterizadas por alterações na estrutura dos eritrócitos ^[7].

2.3 Anemias Hemolíticas

As anemias hemolíticas compreendem um grupo de doenças em que o tempo de vida dos eritrócitos em circulação se torna muito reduzida e a medula óssea não é capaz de compensar esse problema, mesmo elevando sua produção. Como a quantidade de eritrócitos destruídos é maior do que aquela produzida, o volume de eritrócitos circulantes se torna menor, caracterizando o

estado anêmico ^[1].

Em condições normais, os eritrócitos humanos tem sobrevida média de 120 dias a partir da saída da medula óssea para o sangue. Desde quando deixam a medula óssea na forma de reticulócitos e completam sua maturação no baço, os eritrócitos começam a exercer suas funções. À medida que envelhecem, os eritrócitos perdem atividade enzimática, tornam-se densos e menos deformáveis, sofrendo alterações em sua superfície. Tais alterações são detectadas por certos tipos de leucócitos (macrófagos) que fagocitam e destroem os eritrócitos, retirando-os da circulação sanguínea ^[1].

Alguns fatores favorecem o encurtamento do tempo de vida dos eritrócitos. São eles: anormalidades da membrana eritrocitária na hemoglobina, nas enzimas de vias metabólicas e agressões diretas. Com o tempo de vida reduzido, os eritrócitos apresentam rigidez precoce e/ou substâncias em sua membrana que sinalizam positivamente a fagocitose aos macrófagos ^[1].

As anemias hemolíticas podem ser hereditárias ou adquiridas, crônicas ou de aparecimento abrupto. Tais anemias também podem ser classificadas segundo os dois tipos de defeitos estruturais: os intrínsecos e os extrínsecos. Os defeitos intrínsecos aos eritrócitos são: alterações da estrutura ou função da membrana, anormalidades da hemoglobina e anormalidades das enzima eritrocitárias. Já os defeitos extrínsecos se deve a processos de ruptura mecânica das hemácias, a agentes químicos, biológicos, a processos imunes e auto-imunes, por exemplo ^[1].

Anemia é o termo que designa uma síndrome caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina no sangue ou da concentração de eritrócitos por unidade de volume ^[1]. Em indivíduos sadios, de acordo com a idade, há índices que indicam a concentração normal de hemoglobina e de eritrócitos por unidade volume. Pessoas que possuem índices abaixo desses valores de referência são ditos portadores de anemia. Para um indivíduo homem, o número de eritrócitos está entre 4,5 a 6,5 milhões por μL . Para uma mulher, entre 3,9 a 5,6 milhões por μL ^[1]. A Tabela 2.1 ilustra os valores de referência para os índices de hemoglobina.

Tabela 2.1: Índices normais de hemoglobina.

Níveis normais de hemoglobina (g/dL)	
Homem	14 a 18
Mulher	12 a 16
Crianças até um ano	11 a 12
Recém nascidos	14 a 19

Fonte: Adaptado da Ref. ^[32].

Os pacientes diagnosticados com anemia apresentam sintomas como fadiga, dispneia, cefaleias, palpitações, palidez da pele, icterícia, entre outros sintomas que podem variar de acordo com o tipo de anemia e o histórico de saúde do paciente.

O termo hemólise está associado à destruição dos eritrócitos pela quebra da membrana plasmática e pode ser de dois tipos. Na hemólise extravascular, os eritrócitos anômalos ou defeituosos são removidos da circulação sanguínea por macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE) da medula óssea, do fígado e do baço. A hemólise intravascular acontece quando os eritrócitos têm suas membranas rompidas direto na circulação sanguínea, ocasionando o aumento da hemoglobina plasmática.

Anormalidades da membrana eritrocitária, defeito na produção de hemoglobina ou no metabolismo dos eritrócitos são alguns fatores que estão ligados ao aumento da hemólise e, conseqüentemente, ao desencadeamento de anemias hemolíticas. A anemia falciforme e a talassemia são tipos de anemia hemolítica causadas por alterações na estrutura da hemoglobina dos eritrócitos, sendo denominadas de hemoglobinopatias estruturais. As anomalias da hemoglobina podem resultar de dois fatos: síntese de uma hemoglobina anormal e a extinção ou diminuição da velocidade de síntese das cadeias normais α e β .

Além das alterações na estrutura, pode-se ter a presença de hemoglobinas variantes. A maioria das hemoglobinas variantes surge de uma única substituição de base, que resulta em uma substituição de aminoácido. Muitas dessas substituições são clinicamente silenciosas, incluindo algumas das que produzem propriedades físicas anormais na hemoglobina variante. As substituições de aminoácidos podem causar uma série de propriedades físicas anormais, como instabilidade do tetrâmero, deformidade da estrutura tridimensional, inibição da redução do ferro e alteração dos resíduos que interagem com o heme.

Nas próximas seções, serão detalhados os tipos de anemias hemolíticas abordadas neste trabalho.

2.3.1 Talassemia

A talassemia é um tipo de hemoglobinopatia que resulta da diminuição da velocidade de síntese, ou perda de cadeias α e β da hemoglobina. De acordo com as cadeias afetadas, surgem as classificações das talassemias: α -talassemia, síndrome comum na região do Extremo Oriente e β -talassemia, comum no Mediterrâneo.

α -Talassemia

Indivíduos normais possuem quatro genes α ativos. As α -talassemias se caracterizam como síndromes em que tais genes são atingidos de forma completa ou parcial. Na α -talassemia com deleção de um gene, os pacientes são chamados de portadores silenciosos, pois são geralmente assintomáticos e apresentam níveis normais de hemoglobina A e A₂.

Quando há deleção de dois genes, o quadro é denominado de traço α -talassêmico. Clinicamente, o paciente é considerado sadio, mas seus eritrócitos podem apresentar um tamanho menor que o considerado normal e hemácias em alvo e o pontilhado de basófilo.

No caso de deleção de três genes, a síndrome recebe o nome de doença de HbH. É considerada uma talassemia grave e o paciente apresenta anemia hemolítica crônica, aumento do baço e alterações ósseas. Quando os quatro genes alfa sofrem deleção, não há síntese de cadeias α e não há HbA nem HbF. Ocorre morte intrauterina ou em poucas horas após o nascimento. O diagnóstico pré-natal é sempre indicado devido às graves complicações maternas que podem ocorrer durante a gravidez.

β -Talassemia

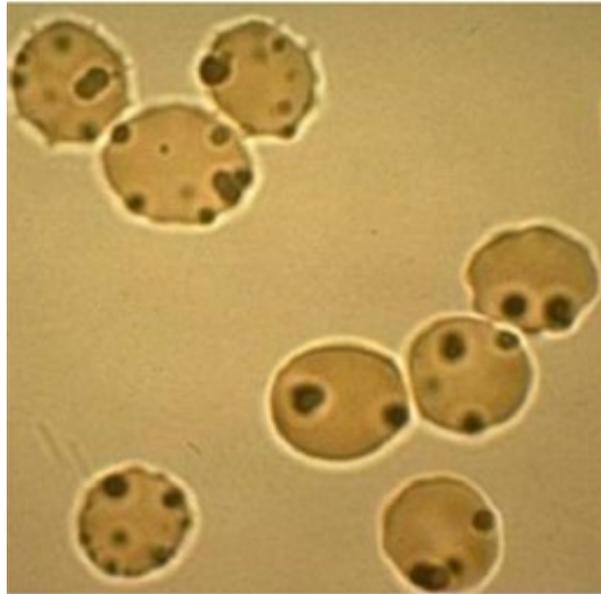
Nessa síndrome, a cadeia β é afetada e o paciente pode apresentar três tipos de anemias β -talassêmicas, de acordo com a quantidade de cadeias afetadas. A β -talassemia maior, com redução na produção de cadeia beta (β^+) ou extinção total (β^0), são consideradas formas mais graves da doença β -talassemia ^[1]. Caracteriza-se pela perda ou redução da HbA e, em alguns casos, pelo aumento na produção de HbF e HbA₂. O paciente apresenta séria eritropoese e intensa hemólise, anemia grave, eritrócitos com volume menor, menos hemoglobina em seu interior e aumento do baço e do fígado.

Com a ausência ou formação reduzida de cadeia beta, ocorre a produção de tetrâmeros instáveis da cadeia alfa que se precipitam e induzem a hemólise ^[32]. Quando em níveis avançados, a precipitação das cadeias instáveis no interior do eritrócito pode formar os corpúsculos de Heinz ¹. Conforme mostra a Figura 2.9, estes corpúsculos se fixam à membrana do eritrócito e contribuem para sua hemólise precoce.

Os eritrócitos que entram na circulação com essas inclusões causam lesões à medida que elas atravessam a microcirculação, ocasionando hemólise extravascular, principalmente no

¹ Também chamados de "corpos Heinz-Ehrlich", são inclusões dentro das hemácias compostas de hemoglobina desnaturada. Recebe este nome devido ao médico alemão Robert Heinz (1865-1924) que, em 1890, descreveu essas inclusões na conexão com casos de anemia hemolítica.

Figura 2.9: Representação dos corpúsculos de Heinz em eritrócitos.

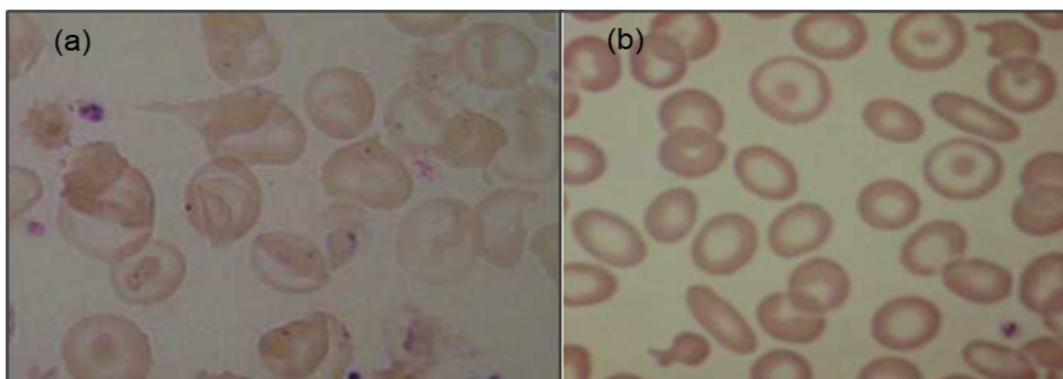


Fonte: Retirado da Ref. [39]

baço. Essas inclusões são majoritariamente constituídas de hemicromos formados pela oxidação das subunidades de cadeias α , que interagem na membrana com as proteínas 4.1, anquirina e espectrina [37].

As alterações na morfologia dos eritrócitos de portadores de β -talassemia maior se caracterizam pela variação de tamanho e formato dos glóbulos, exibidos na Figura 2.10 (a), células em alvo, que apresentam dupla biconcavidade e a hemoglobina é visualizada em uma pequena faixa periférica e, geralmente, na parte central, o que lhe dá o aspecto em alvo, mostrado na Figura 2.10 (b). Podem apresentar também pontilhado de basófilos, que são pontos roxos presentes no interior dos eritrócitos.

Figura 2.10: Aspectos morfológicos dos eritrócitos em pacientes com beta-talassemia. (a) Variação de tamanho e formato das células. (b) Células em alvo e microcíticas.



Fonte: Retirado da Ref. [39].

A β -talassemia intermediária se enquadra em um grau de anemia moderado, podendo haver mais produção de HbF ou defeitos leves na síntese da cadeia β . Os pacientes podem apresentar deformidade óssea e sobrecarga de ferro. O caso de β -talassemia menor é chamado de traço talassêmico, pois o paciente é geralmente assintomático ou apresenta anemia leve em relação às outras β -talassemias, contudo mais severa em relação ao traço α talassêmico. Os eritrócitos podem se tornar mais claros vistos sob a técnica da microscopia óptica.

2.3.2 Anemia Falciforme

A anemia falciforme é outro tipo de anemia hemolítica que decorre de uma alteração na estrutura da hemoglobina. Esta hemoglobinopatia é caracterizada pela presença de uma hemoglobina anormal chamada HbS. O princípio está em uma substituição de um nucleotídeo ou base nitrogenada na região do DNA responsável pela expressão da globina beta. A adenina que deveria constituir o códon 6 do gene da globina é substituída por uma timina. Como consequência disto, a globina passa a apresentar um resíduo valil, não-polar, ao invés do glutamyl, polar. Tal substituição resulta na hemoglobina anormal HbS com forte predisposição para se polimerizar [1].

O início da polimerização da HbS é conhecido como nucleação. A nucleação envolve a agregação de pequenas partículas de HbS na sua forma desoxidada. Uma vez constituído um núcleo catalisador, a propagação do polímero cresce de forma rápida. Existe um atraso entre a formação do núcleo e a polimerização completa. O resultado desse processo é um fibra composta por várias moléculas de HbS que, dependendo da orientação no interior celular, deformam a célula [40].

Tal evento é o fator fundamental na patogenia da anemia falciforme, pois como ele desencadeia a alteração na forma do eritrócito, conseqüentemente causa alterações em suas propriedades mecânicas, levando à hemólise. Após a reoxigenação, muitos eritrócitos podem voltar ao seu formato inicial. Mas, após várias repetições desse fenômeno, algumas células sofrem lesão em suas membranas ficando permanentemente em forma de foice ou alongadas.

Eritrócitos “*peculiarmente alongados e em forma de foice*” foram descritos pela primeira vez por Herrick, em 1910, no sangue de um indivíduo anêmico de origem africana. No Brasil, a primeira referência a um paciente com anemia falciforme se deve a Castro, em 1933. A migração internacional em decorrência do comércio de escravos introduziu o gene da HbS nas Américas, entre os séculos XVI e XVIII, e promoveu a distribuição da anemia falciforme para a África [41].

No Brasil, a prevalência de casos de anemia falciforme é maior nas regiões Norte e Nordeste, entre 6% e 10%, enquanto que, nas regiões Sul e Sudeste, entre 2% e 3% da população é atingida [42].

O diagnóstico clínico da anemia falciforme se dá através do exame de eletroforese de hemoglobina. Nesse exame, é possível identificar os diferentes tipos de hemoglobina que estão presentes no sangue do paciente. Uma eletroforese de hemoglobina considerada normal mostra um predomínio de HbA1 (96 a 98%), seguida por HbA₂ (2,5 a 3,5%) e HbF (0 a 1,0%). O diagnóstico de anemia falciforme na eletroforese é estabelecido pela predominância de HbS (80 a 99%) e ausência de HbA1. A HbF também pode aparecer e representar até 15% da hemoglobina total [40].

A deformação dos eritrócitos na anemia falciforme ocasiona um aumento de sua rigidez. Com o aumento de sua rigidez, a deformabilidade dos eritrócitos é diminuída e eles podem ocluir regiões da microcirculação ou até de grandes vasos, causando infarto de órgãos, isquemia de tecidos e resposta inflamatória aguda. O referido processo recebe o nome de vaso-oclusão e é uma característica marcante de portadores de anemia falciforme. Os locais mais afetados são ossos longos, articulações e região lombar, couro cabeludo, face, tórax e pelve.

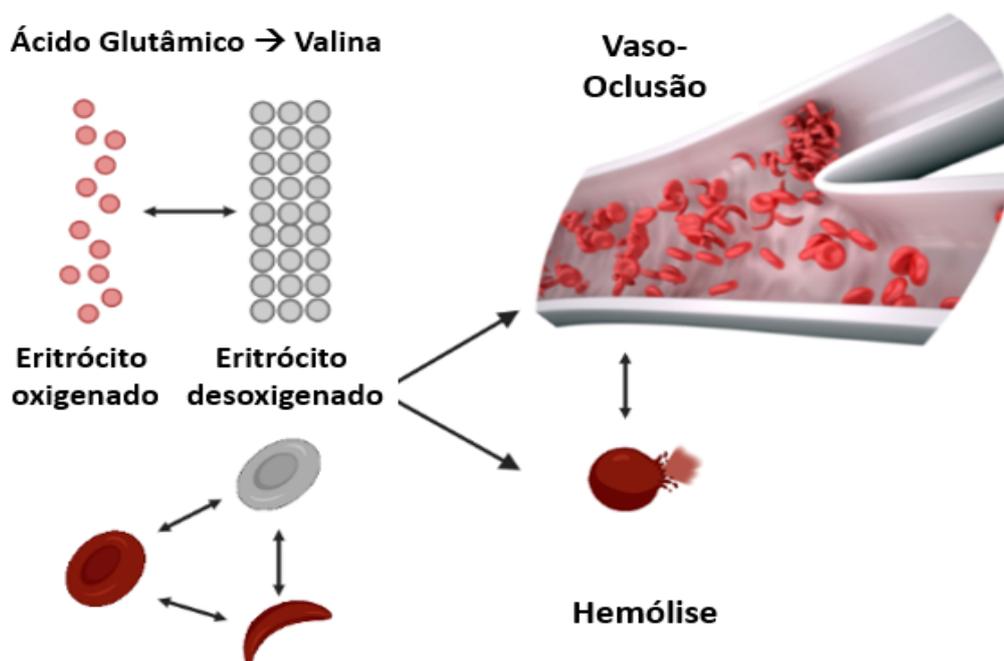
A Figura 2.11 ilustra o processo de polimerização e falcização dos eritrócitos, que resultam no processo de hemólise ou vaso-oclusão. Como dito, tudo isso tem início na substituição do ácido glutâmico pela valina.

A viscosidade do sangue falciforme oxigenado aumenta, principalmente por causa das células que alteram seu formato de forma irreversível, bem como por causa do aumento dos níveis de gamaglobulina no sangue quando este se torna desoxigenado [44].

Estudos de Gladwin e colaboradores [45] mostraram que a aderência aumentada dos eritrócitos ao endotélio poderia ser um fator que favorece as crises de vaso-oclusão. Uma possível causa deste aumento seria a alta viscosidade do sangue e elevação dos níveis de fibrinogênio, que é uma resposta natural a infecções visando manter a coagulação normal do sangue.

A liberação intravascular de hemoglobina pelos eritrócitos fragilizados, além da vaso-oclusão recorrente e dos processos de isquemia, leva a dano e ativação das células endoteliais da parede do vaso. Como consequência, há indução de uma resposta inflamatória vascular e a adesão de células brancas e vermelhas à parede dos vasos sanguíneos. Tal fato, associado a uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico no interior do vaso e ao estresse oxidativo, pode ocasionar, em alguns casos, uma redução no fluxo sanguíneo e, finalmente, a vaso-oclusão [2].

Figura 2.11: Processo de polimerização, hemólise e vaso-oclusão na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado da Ref. [43].

2.3.3 Traço Falciforme

Quando os indivíduos possuem o defeito genético da doença falciforme, mas com a presença da hemoglobina S na forma heterozigota (HbA/HbS ou AS), há o quadro de traço falciforme. Nesses casos, a concentração da HbS nas hemácias é inferior a 50%. Assim, o paciente não apresenta alterações de saúde evidentes e são considerados saudáveis, sem anemia e com aspecto normal de eritrócitos [1]. O traço falciforme ocorre quando o indivíduo recebe um gene com a hemoglobina S de um dos pais. Caso essa pessoa tenha filhos com uma pessoa sadia, eles também podem apresentar traço falciforme. Porém, se tiver filhos com outro portador do traço, há 25% de chance de ter filhos com anemia falciforme, 50% com traço e há 25% de chance de os filhos nascerem sem alterações na hemoglobina.

O risco de falcização diminui muito, mas ainda é possível encontrar eritrócitos em forma de foice no esfregaço sanguíneo. Na anemia falciforme, o processo falciforme pode começar quando a saturação de oxigênio da HbS diminui para 85%, mas não ocorre nos heterozigotos (AS) até que a saturação de oxigênio da hemoglobina diminua para 40%. O nível de hemoglobina, o número de leucócitos e plaquetas são normais. Estima-se que no mundo todo existam 30 milhões de heterozigotos AS e, no Brasil, esse número provavelmente se situam próximo de 2 milhões [1].

Ainda que os pacientes sejam considerados sadios, há relatos de morte súbita e complicações clínicas em portadores do traço falcêmico (embolismo pulmonar e infarto esplênico, por exemplo), quando os portadores são expostos a condições extremas de baixa tensão de oxigênio como ocorre em esforços físicos, despressurização da cabine de voo e em grandes altitudes [46].

2.3.4 Hemoglobinopatias Associadas

Nesta seção serão examinadas em detalhes as hemoglobinopatias associadas com a hemoglobina HbS, que vão além do traço falcêmico (HbA/HbS ou AS) ou da anemia falciforme propriamente dita (SS).

Anemia Falciforme e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal

Nessa situação, além de portar a anemia falciforme, o paciente tem persistência hereditária da hemoglobina fetal (HbS/HbF ou SF). A falcização não ocorre facilmente, pois a HbF exerce, em cada célula, uma ação protetiva contra a desoxigenação e a polimerização. Os pacientes não têm infartos recorrentes e se tornam clinicamente parecidos com os portadores de AS.

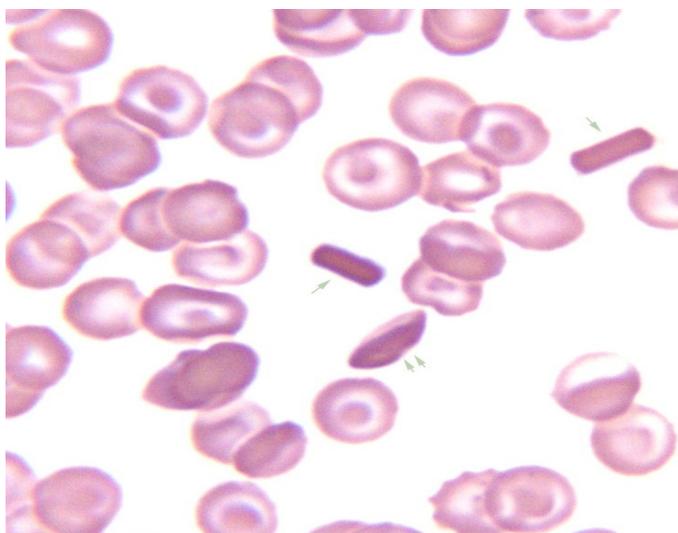
A constatação de que pacientes com anemia falciforme e com persistência hereditária de HbF tendem a ser assintomáticos demonstra o potencial que o aumento dos níveis de HbF têm no melhoramento do quadro clínico das doenças falciformes. Várias drogas, como a 5-azacitidina, o butirato de sódio e a hidroxíureia (HU), têm, por mecanismos diferenciados, a capacidade de reativar os genes γ e elevar a produção de HbF [47]. A toxicidade dessas drogas, no entanto, limita sua utilização. A HU é a única indutora de HbF aprovada para uso em pacientes com anemia falciforme, enquanto as demais drogas estão em fase de investigação.

Hemoglobinopatia SC

A hemoglobina C é uma hemoglobina anormal, que resulta da substituição do resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de lisina na sexta posição da beta-globina, o mesmo códon na cadeia beta como na hemoglobina S [1]. Tal defeito genético é muito comum na África Ocidental. A HbC tende a formar cristais romboidais nos eritrócitos em seu estado R oxigenado, conforme ilustra a Figura 2.12, em que é possível observar cristais nos eritrócitos com hemoglobinopatia SC. As setas únicas indicam cristais extracelulares e as setas duplas indicam cristais intracelulares. Isso se deve ao fato de que a hemoglobina C é menos solúvel em relação às outras e se

cristaliza.

Figura 2.12: Cristais Romboides em eritrócitos de hemoglobinopatia SC. As setas únicas indicam cristais extracelulares e a seta dupla indica cristal intracelular.



Fonte: Retirado de [48].

Indivíduos heterozigotos com doença por HbC, ou seja, HbA/HbC ou AC, são assintomáticos e sem doença aparente. Indivíduos homozigotos, HbC/HbC ou CC, têm cerca de 95% de HbC e, neste caso, apresentam anemia hemolítica crônica e crises de dor. Há ainda indivíduos que são heterozigotos com hemoglobina C e hemoglobina S, portadores de anemia falciforme. A hemoglobinopatia SC é a segunda variante mais comum de anemia falciforme. Porém, a HbC não participa de maneira efetiva da polimerização da HbS e os pacientes com hemoglobinopatia SC têm evolução clínica mais benigna que pacientes SS.

O estado de oxigenação favorece a cristalização da HbC e o estado de desoxigenação favorece a polimerização da HbS. Ainda assim, os pacientes apresentam quase todas as complicações da anemia falciforme: maior suscetibilidade a infecções e fenômenos vaso-oclusivos. Em razão dos níveis de hemoglobina mais elevados e maior viscosidade sanguínea, algumas complicações como as oftalmológicas e as osteonecroses de cabeça femoral e umeral são mais frequentes na hemoglobinopatia SC do que na anemia falciforme.

Nas próximas seções, serão abordados os princípios físicos da técnica utilizada nesse trabalho para investigação das propriedades estruturais e mecânicas de eritrócitos: a Microscopia de Força Atômica.

2.4 Microscopia de Força Atômica

Os fenômenos físicos podem ser classificados em várias categorias diferentes. Considerando uma primeira classificação, esses fenômenos podem ser agrupados por suas características macroscópicas e microscópicas, ou seja, segundo as dimensões espaciais do fenômeno observado em relação à escala do observador ^[49]. Independentemente da escala escolhida, um fenômeno é definido como a resposta de uma amostra (uma partícula material ou um campo) a um estímulo externo, de cuja análise resultam grandezas mensuráveis, tais como as propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas, térmicas, ópticas, ou combinações destas.

O escopo deste trabalho reside no estudo de fenômenos que ocorrem em uma região muito próxima da superfície analisada, e, portanto, fazem parte de um conjunto de metodologias denominadas microscopias. Será mostrado que as propriedades adesão e rugosidade da superfície das células vermelhas do sangue (escala microscópica) alteram radicalmente o estado de saúde de um paciente (escala macroscópica).

Com o objetivo de auxiliar o estudo dos fenômenos de superfícies, várias metodologias e instrumentações foram desenvolvidas. Algumas delas (grupo das microscopias ópticas) usam luz como método de sondagem das propriedades desejadas. Mas as microscopias ópticas sofrem de uma limitação imposta pelo fenômeno da difração, o que as impedia de sondar propriedades na escala de átomos e moléculas ^[50]. A única maneira de reduzir esta limitação é pelo uso de comprimentos de onda seja muito pequeno, o que exige energias muito elevadas, podendo comprometer a integridade das amostras biológicas.

Os fenômenos físicos que ocorrem nas fronteiras dos objetos da natureza determinam o comportamento geral deles, sobretudo quando se trata do cenário da pequena escala, como em sistemas moleculares, atômicos e subatômicos. O conhecimento das propriedades físicas nas fronteiras, ou propriedades de superfícies, é tão fundamental que uma área inteira da Física é dedicada exclusivamente ao seu estudo - a Física de Superfícies ^[51].

O grande avanço nas metodologias microscópicas ocorreu como o desenvolvimento da teoria quântica da matéria, no início do Século XX. Como exemplo, para o mapeamento de pequenas superfícies, em vez ondas de luz, passou-se a usar ondas de partículas, tais como feixes de elétrons, nêutrons e de íons. Dentre essas técnicas, estão a Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM (*Transmission Electron Microscope*), desenvolvida na Universidade Técnica de Berlim em 1931, e a Microscopia Eletrônica de Varredura – SEM (*Scanning Electron Microscope*).

Cerca de 50 anos se passaram até o desenvolvimento de técnicas mais aprimoradas, as quais não usavam ondas de partículas para a sondagem dos materiais, mas forças atômicas e/ou correntes de tunelamento de elétrons entre moléculas ou átomos. A Microscopia de Varredura por Sonda – SPM consiste em um grupo de instrumentos utilizados para gerar imagens varrendo a superfície da amostra com uma sonda. Em sua composição, tem-se sondas, cerâmicas piezoelétricas (escâneres), para posicionar a amostra e realizar varreduras, circuitos elétricos de realimentação para controlar a posição vertical e horizontal da sonda e um computador para mover os escâneres de varredura, armazenar dados e os converter em imagens por meio de um software específico para esse fim ^[52].

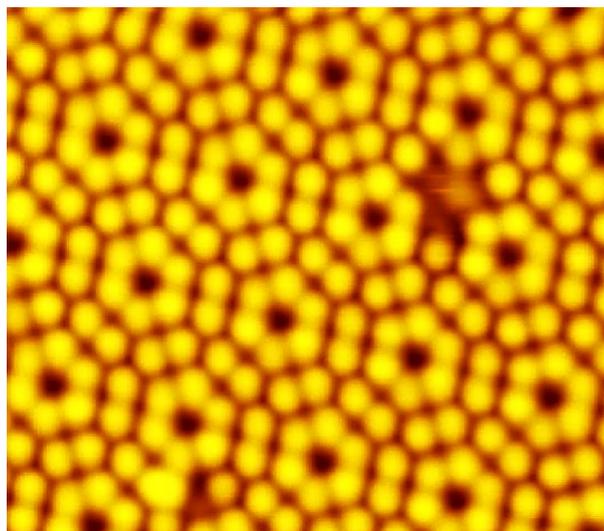
Da classe das microscopias de varredura por sonda, a Microscopia de Tunelamento Quântico – STM (*Scanning Tunneling Microscope*) foi a precursora, desenvolvida, em 1981, por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, o qual rendeu aos dois o Prêmio Nobel de Física de 1986 ^[13], tendo como princípio de funcionamento o efeito túnel. De acordo com a Mecânica Quântica, o efeito túnel surge como consequência da natureza ondulatória do elétron. Classicamente, para uma partícula transpor uma barreira de potencial, é necessário que ela tenha um mínimo de energia cinética, não sendo possível a transposição para energias com valor abaixo deste mínimo. A partir de uma perspectiva quântica, uma partícula tem uma probabilidade não nula de atravessar uma região classicamente proibida (barreira de potencial) que separa duas regiões classicamente permitidas, fenômeno comumente denominado de tunelamento quântico.

Nessa técnica, a ponta é condutora e quando ela se aproxima da superfície da amostra, uma diferencial de potencial é aplicada entre ambas, de modo a permitir a passagem dos elétrons pelo espaçamento entre elas. Surge então a corrente de tunelamento, que é uma função da distância ponta-amostra, do potencial aplicado e da densidade local dos estados de energia. As variações de corrente elétrica durante a varredura são detectadas e processadas através de um sistema de retroalimentação da eletrônica que compõe o equipamento e enviadas para um computador onde a topografia (imagem digital) da superfície da amostra é construída.

Para ilustrar a enorme capacidade do STM, a Figura abaixo mostra o resultado de uma varredura sobre uma amostra de Silício (Si). Pode-se observar nitidamente os contornos dos átomos, bem como suas disposições espaciais, formando a estrutura hexagonal típica das ligações do Si. Entretanto, por medir corrente elétrica, o STM apresenta a desvantagem natural de fazer imagens apenas de materiais condutores de eletricidade.

A técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) também faz parte das metodologias

Figura 2.13: Imagem da estrutura de Si. Área varrida: 11,7 nm. Corrente de tunelamento: 0,74 nA.



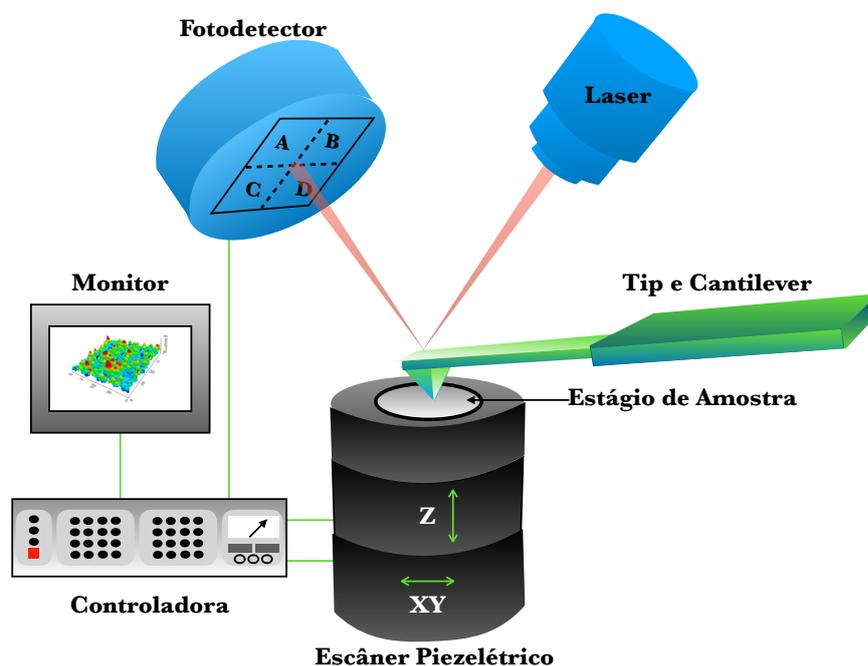
Fonte: Retirado da Ref. [53].

de varredura por sonda e foi derivada diretamente do STM. O AFM foi desenvolvido, em 1986, por Binnig e colaboradores [14]. Esta metodologia, de forma geral, tem como princípio fundamental a medida das forças intermoleculares ou interatômicas entre uma ponta muito fina (sonda) e a amostra e, posteriormente, sua transformação em uma imagem que revele as características topográficas da superfície. Com o AFM, tornou-se possível estudar todos os tipos de materiais, já que ele não utiliza corrente de tunelamento, mas sim forças. Como toda microscopia, o objetivo do AFM é obter imagens fidedignas de superfícies em pequena escala, sem danificar a estrutura do material.

Os principais componentes que formam um AFM são: sonda (cantiléver + ponta); escâner piezoelétrico; laser diodo; fotodetector e computador para controle do sistema, armazenamento dos dados produzidos pelo fotodetector e conversão desses dados em mapas topográficos tridimensionais, dos quais se podem obter propriedades mecânicas, elétricas e magnéticas. A Figura 2.14 mostra os componentes do AFM e sua disposição no equipamento.

Os princípios físicos gerais sob os quais está baseado o AFM estão descritos a seguir. Inicialmente, uma ponta de prova (sonda) é colocada nas proximidades da superfície da amostra. Quando a distância é pequena o suficiente para que dipolos elétricos sejam induzidos ou para que dipolos já existentes interajam, forças elétricas atrativas entre os átomos da sonda e da amostra (forças de van der Waals) se manifestam. A atração aumenta até atingir um limite máximo, o que ocorre quando a sonda se aproxima muito da amostra. A partir de uma determinada distância, uma força repulsiva proveniente da superposição eletrônica dos átomos da sonda-amostra passa a

Figura 2.14: Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica e seus componentes.



Fonte: Gentilmente cedido por Luciana Alencar.

atuar, evitando a superposição espacial dos átomos destas superfícies. A repulsão é consequência do Princípio de Exclusão de Pauli, fenômeno físico que impede que dois elétrons possam ocupar o mesmo estado quântico simultaneamente.

Por meio do método de detecção óptica, medem-se as reflexões de um laser em diferentes direções a partir de superfície refletora na extremidade livre no dorso do cantiléver. A ponta é fixa na parte inferior do cantiléver, no lado oposto da superfície refletora. Sob ação de forças atrativas e repulsivas, o cantiléver se deforma, alterando o ângulo da superfície espelhada e, conseqüentemente, o ângulo de reflexão do laser. Um detector de quatro fotocélulas independentes capta a luz do laser, produzindo uma diferença de potencial (DDP), via efeito fotovoltaico. Por fim, um computador produz uma imagem cujos detalhes são proporcionais à intensidade da relativa entre as quatro fotocélulas.

Além de produzir imagens topográficas, o AFM também investiga propriedades mecânicas, tais como: adesão, elasticidade, interações de forças magnéticas e eletrostáticas. As forças de adesão microscópicas (melhor detalhada nas próximas seções) influenciam em diversos eventos, desde a replicação de DNA até a ação de drogas no corpo humano^[54]. Propriedades elásticas possuem uma importância similar, afetando a estrutura e dinâmica de sistemas biológicos^[9].

O AFM opera medindo as forças entre o par sonda-amostra. Essas forças dependem da

natureza desse par, da distância entre eles, da geometria da ponta e de qualquer contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Durante o processo de varredura, os átomos localizados na extremidade da ponta interagem com os da superfície da amostra, que estão imediatamente abaixo dela ou nas vizinhanças ^[55,56].

Na próxima seção, detalharemos mais sobre essas forças.

2.5 Forças em Nanoescala

Quando dois objetos são aproximados, surgem forças com diferentes ordens de magnitude e dependências com a distância. Em certas circunstâncias, essas propriedades podem ser usadas para separar suas respectivas contribuições. Algumas dessas forças, por exemplo, magnéticas e eletrostáticas, podem ser manipuladas por campos externos ou por aplicação de voltagem. Assim, muitas propriedades físicas da amostra podem ser medidas com grande resolução espacial. A imagem da topografia é apenas uma das possibilidades. Nesta seção, as forças relevantes para a microscopia de força atômica serão discutidas. Na análise dessas forças, será evidenciada a origem física de cada uma delas, bem como os aspectos matemáticos, de forma simplificada. Algumas forças serão descritas em termos dos potenciais envolvidos. Para se obter a expressão da força, basta usar a definição $F(r) = -dV/dr$.

2.5.1 Forças de van der Waals

Um passo importante no estudo de forças intermoleculares foi dado em 1802, quando Jacques Charles e Joseph Gay-Lussac publicaram a equação de estado para um gás ideal. A partir disto, Johannes Diderik van der Waals seguiu a ideia de forças atrativas entre moléculas em gases na tentativa de explicar porquê os gases não obedeciam a equação de Charles e Gay-Lussac ^[57].

A interação de van der Waals descreve a interação eletromagnética de dipolos induzidos nas superfícies (como exemplo, na extremidade da ponta e superfície da amostra, no caso do AFM) e manifestam uma dependência com r^{-6} . Em razão das flutuações inerentes ao ambiente quântico, mesmo em um orbital eletrônico totalmente ocupado, existe um deslocamento entre as cargas positivas e negativas, de modo a criar um dipolo elétrico dentro de uma escala de tempo mensurável. Esses dipolos apresentam valores médios nulos sob uma inspeção em tempos suficientemente longos. No entanto, momentos de dipolos induzidos analisados em escalas

de tempo menores podem polarizar átomos vizinhos. Este mecanismo leva a um potencial de interação atrativo, conforme será visto mais adiante.

Quando a distância é reduzida até um determinado valor, um fenômeno repulsivo de natureza puramente quântica, associado à denominada força de troca e descrita pelo Princípio de Exclusão de Pauli, entra em ação e passa a dominar atração de van der Waals. Como um fenômeno quântico, não há como o descrever teoricamente em termos de uma distância no espaço de coordenadas. Contudo, por causa do comportamento da curva experimental do potencial, geralmente se atribui na literatura uma dependência do tipo r^{-12} apenas para melhor ajuste e por ser o dobro da dependência com r^{-6} . A soma dos potenciais associados às forças é chamada de potencial de Lennard-Jones e descreve a interação entre dois átomos separados pela distância r , que será abordado posteriormente^[58].

Em comparação com as outras forças presentes em nível atômico, a força de van der Waals possui uma das menores intensidades. Ela se fundamenta em três componentes^[52]. Para átomos neutros, os dipolos são criados instantaneamente devido às flutuações na densidade de carga do elétron que, por sua vez, induzem dipolos em outros átomos. A interação entre esses dipolos instantâneos é chamada de força de dispersão, também conhecido como força de London. Em moléculas polares, os dipolos permanentes podem induzir dipolos em outros átomos; sua interação é chamada de força de indução, também denominada força de Debye. Por fim, a interação entre dipolos permanentes em moléculas polares é determinada por sua orientação e é nomeada de força de orientação, também chamada força de Keesom.

A interação de van der Waals é quase sempre atrativa e as pequenas interações entre os átomos individuais da ponta e da amostra formam uma força resultante da ordem de nanonewtons (nN)^[59]. Embora essa força seja pequena para os padrões macroscópicos, ela excede as forças químicas e, em muitos casos, domina a interação ponta-amostra. A interação de van der Waals não varia muito em função do tipo de elemento químico, atuando como uma força macroscópica de longo alcance, quando comparada com as forças de ligação entre os átomos e moléculas dos materiais envolvidos.

Na ponta usada em AFM há bilhões de átomos e é impossível conhecer em detalhes todas as interações presentes nela. Portanto, uma aproximação deve ser feita com base no material e na estrutura da ponta. Supondo que o potencial $U(r)$ entre dois átomos separados por uma distância r seja conhecido, a força entre eles é definida pelo gradiente desse potencial:

$$F(r) = -\nabla U(r). \quad (2.1)$$

Para a interação de van der Waals, o potencial tem a forma:

$$U_{vdW}(r) = -\frac{C}{r^6}, \quad (2.2)$$

em que C é a constante de interação específica para o par partícula-partícula, definido por London.

Hamaker ^[59] então realizou a integração do potencial de interação para calcular a interação total entre dois corpos macroscópicos. Para isso, ele usou algumas hipóteses em sua derivação. A condição de aditividade foi usada para que a interação total pudesse ser obtida pela soma dos pares das contribuições individuais. O meio foi considerado contínuo. Assim, a soma pôde ser substituída por uma integração sobre os volumes dos corpos interagentes, assumindo que cada átomo ocupa um volume dV com uma densidade ρ . Por fim, as propriedades ρ e C_6 do material foram consideradas uniformes sobre o volume dos corpos. Tudo isso permite que a força total entre a ponta e a amostra seja dada por ^[58]:

$$F_{vdW} = \rho_1 \rho_2 \int_{V_2} \int_{V_1} f(r) dV_1 dV_2, \quad (2.3)$$

em que ρ_1 e ρ_2 são as densidades de massa, $f(r)$ é a densidade de força e V_1 e V_2 são os volumes dos corpos 1 e 2, respectivamente.

Forças de Dispersão de London

A interação de dispersão de London tem origem no fato de que todo átomo forma um dipolo instantâneo e, portanto, somente o valor médio da distribuição de carga é esféricamente simétrica. Com isto, mesmo átomos neutros podem interagir entre si de forma atrativa ou repulsiva. Cada átomo tem um dipolo que interage com os vizinhos por meio da polarizabilidade eletrônica $\alpha_0 = 4\pi\epsilon a_0^3$, sendo $a_0=0,53 \text{ \AA}$ o raio de Bohr e ϵ é a constante de permissividade elétrica relativa. Para um material com o mesmo tipo de átomo, tem-se ^[60]:

$$U(r) = \frac{\alpha_0^2 h\nu}{(4\pi\epsilon)^2 r^6} \quad (2.4)$$

onde h é a constante de Planck e o termo $h\nu$ é o potencial de primeira ionização. Esta interação

tem a mesma dependência em r que aquela produzida por dipolos permanentes.

Forças entre Dipolo Permanente e Dipolo Induzido

Existem situações nas quais as amostras possuem dipolos permanentes e estes podem induzir dipolos na ponta da sonda. As interações entre um dipolo permanente e um dipolo induzido podem ser calculadas a partir do campo elétrico $E(r)$ de um dipolo ^[52]:

$$E(r) = \frac{p\sqrt{1 + 3 \cos^2 \theta}}{4\pi\epsilon r^3}. \quad (2.5)$$

A energia potencial de interação pode ser escrita em termos do campo elétrico $E(r)$ e da polarizabilidade α_0 , usando a definição $V(r) = \alpha_0 E(r)^2/2$. Tomando o valor médio sobre todos os ângulos θ , encontra-se:

$$V(r) = -\frac{p^2\alpha_0}{(4\pi\epsilon)^2 r^6}. \quad (2.6)$$

Observa-se que esta dependência em r é muito mais forte, o que implica em uma interação de alcance muito mais curto, típico das forças dipolares de van der Waals.

Potencial de Lennard-Jones

De forma geral, as principais forças que envolvem a interação entre dois átomos surgem:

1. das forças de polarização, nas quais as cargas em um átomo induzem dipolos nos átomos vizinhos;
2. das forças provenientes de efeitos quânticos, que dão origem a ligações covalentes e forças repulsivas devido à simetria de troca entre as partículas.

Essa última advém do Princípio de Exclusão de Pauli, que proíbe que elétrons de diferentes átomos possam ter os mesmos números quânticos. Como consequência deste tipo de interação, os elétrons migram para níveis de maior energia, o que pode ser interpretado como uma força de repulsão entre eles. Experimentalmente, observa-se que tais forças repulsivas caem a zero para distâncias superiores a 3Å , enquanto que, para distâncias maiores, as componentes atrativas predominam.

O potencial de Lennard-Jones é um modelo empírico que combina as forças atrativa e repulsiva. Na literatura, ele é descrito de várias maneiras diferentes, sendo uma das mais usadas

a seguinte:

$$V_{LJ}(r) = V_0 \left[\left(\frac{r_{min}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{min}}{r} \right)^6 \right], \quad (2.7)$$

sendo r_{min} a distância na qual o potencial assume o menor valor possível, no caso $-V_0$. Este é o resultado individual mais importante quando se trata da análise de AFM de um material, pois todas as interações estão contempladas nele. A força associada a este potencial pode ser escrita na forma:

$$F(r) = 12V_0 \left[\frac{r_{min}^{12}}{r^{13}} - \frac{r_{min}^6}{r^7} \right]. \quad (2.8)$$

Quando a distância sonda-amostra atinge o valor r_{min} , as duas forças atingem a mesma intensidade e o sistema entra em equilíbrio, caso não haja força externa sobre ele. Em busca da posição de equilíbrio das forças, a sonda montada sob um cantiléver flexível se aproxima ou se afasta da superfície da amostra à medida que se move sobre ela. A essência do AFM está exatamente em monitorar essas distâncias r_{min} localmente sobre a amostra, a partir das quais se podem obter informações acerca das forças. Com as informações do perfil das forças encontram-se as propriedades desejadas da amostra em estudo.

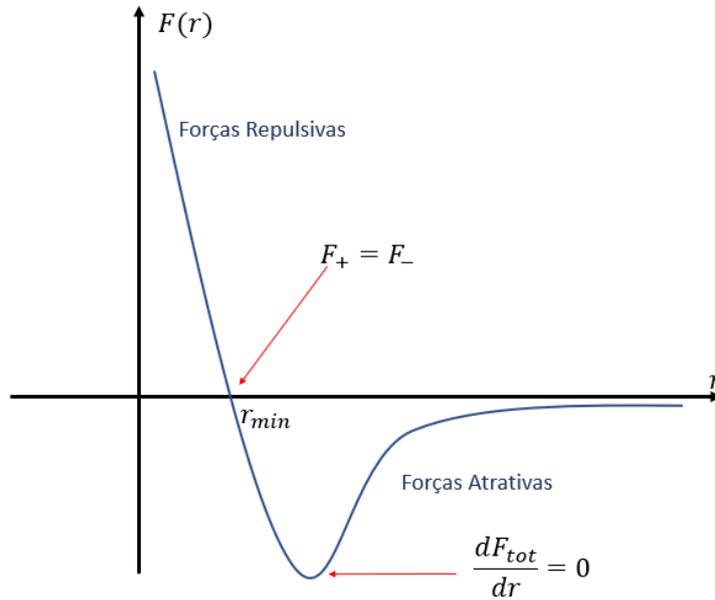
A Figura 2.15 ilustra o perfil espacial das forças de atração ($F_- \propto r^{-7}$) e repulsão ($F_+ \propto r^{-13}$), assim como da força total $F(r)$ e do potencial de Lennard-Jones V_{LJ} . A dependência espacial de F_- é obtida a partir do conhecimento do arranjo das cargas elétricas, enquanto a dependência de F_+ é usada empiricamente para obter o melhor ajuste para a curva de força. Por se tratar de um fenômeno puramente quântico originado na interação de troca, não há como prever teoricamente a dependência de F_+ por princípios físicos gerais. Para distâncias acima de r_{min} , a força atrativa predomina, enquanto que, para valores abaixo de r_{min} , a força repulsiva domina.

O padrão da imagem da superfície do material obtido pelo microscópio deve refletir esta dependência entre as forças, uma vez que a deflexão do laser no cantiléver depende essencialmente da somatória de todas elas.

Forças de Adesão

A partir das medidas de AFM, é possível obter as forças de adesão entre a sonda e a amostra; para tanto, é preciso se aprofundar sobre a mecânica de contato, descrevendo o contato entre uma ponta de AFM que indenta a superfície da uma amostra.

Figura 2.15: Descrição qualitativa para o potencial de Lennard-Jones $V(r)$ e para as forças atrativas de van der Waals e repulsivas de origem quântica.



Fonte: Própria autora.

Uma vez que o cantiléver funciona como uma mola, a força aplicada por ele obedece à lei de Hooke:

$$F = k \cdot d, \quad (2.9)$$

onde k é a constante elástica do cantiléver e d é a sua deflexão.

A lei de Hooke é aplicada de forma satisfatória para amostras que apresentam comportamento linear, ou seja, superfícies rígidas. No entanto, para amostras que apresentam comportamento viscoelástico, a força não é descrita adequadamente com esta equação. Superfícies "macias" (como as observadas na maioria dos materiais biológicos) se deformam de maneira não linear durante a indentação. Assim, este tipo de sistema passa a ser melhor descrito por uma relação do tipo ^[61]:

$$F \propto \delta^n, \quad (2.10)$$

onde F é em força externa, δ é a deformação do sistema e n é um expoente relacionado à geometria do indentador. A constante de proporcionalidade descreve, além de fatores geométricos, as propriedades elásticas do material. Trata-se, portanto, de um problema de contato mecânico entre duas superfícies.

O primeiro trabalho a abordar o problema do contato entre duas superfícies foi o de Heinrich Hertz ^[62], pesquisador pioneiro do campo da mecânica de contato. Uma relação por ele determinada foi o contato entre uma superfície plana e uma esfera, pressionadas entre si, com uma carga normal P . Esse contato ocorria dentro de uma área circular, com raio de contato a , de acordo com a seguinte equação:

$$a = \left(\frac{PR}{K} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.11)$$

onde R é o raio da esfera e K é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície (E_1 , E_2), considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície (ν_1 , ν_2), respectivamente. O parâmetro K é descrito por:

$$K = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right). \quad (2.12)$$

Na literatura, o modelo de Hertz tem sido amplamente utilizado no estudo das propriedades mecânicas de superfícies macias, como, por exemplo, as células humanas ^[54], tendo como base ensaios de força com o AFM. Essa teoria descreve a área de contatos macroscópicos suaves, sendo aplicada somente em materiais elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e que não apresentam forças de superfície atrativas (adesão). A teoria de Hertz também presume que o raio de contato é muito menor que o raio da esfera, de modo que a esfera pode ser aproximada como um parabolóide ^[63].

Os pesquisadores Johnson, Kendall e Roberts propuseram, em 1971, uma nova teoria, denominada JKR ^[64], que explicava a adesão entre dois corpos elásticos. O modelo JKR considera experimentos cujas áreas de contato são maiores do que as previstas pela teoria de Hertz. A equação 2.13 descreve o raio de contato entre uma esfera e uma superfície, considerando a ação da força de adesão entre elas:

$$a = \left(\frac{R}{K} (P + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi RP + (3\gamma\pi R)^2}) \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.13)$$

onde γ é o trabalho das forças de adesão, realizado em separar completamente o indentador da superfície. Essa teoria inclui a tensão de tração na área de contato, com carga normal mínima e com uma área de contato diferente de zero. Essa carga mínima pode ser chamada de força de *pull-off* ou força de adesão, dada por:

$$F_{ad}^{(JKR)} = -\frac{3}{2}\pi\gamma R. \quad (2.14)$$

Derjaguin, Muller e Toporov ^[65] elaboraram um modelo, chamado de DMT, que considerava a contribuição das forças adesivas no contato entre corpos elásticos. Para o mencionado modelo, considera-se que o perfil de contato permanece o mesmo da teoria de Hertz; no entanto, considera-se uma carga total maior devido à força de adesão. Esse fato equivale à interações atrativas entre uma esfera e a superfície. Para esse modelo, o raio de contato a é dado por:

$$a = \left(\frac{R}{K} (P + 2\pi\gamma R) \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (2.15)$$

Assim, a força de adesão é descrita por:

$$F_{ad}^{(DMT)} = -2\pi\gamma R. \quad (2.16)$$

Quando as forças de superfície são de curto alcance em comparação com as deformações elásticas resultantes, o modelo JKR descreve a área de contato com precisão. Para o limite oposto (isto é, materiais rígidos, pequenos raios esféricos e forças de adesão fracas e de longo alcance), o modelo DMT é mais adequado ^[66].

No processo de retração da ponta para longe da superfície da amostra, a ponta permanece em contato com a superfície até que a força do cantiléver supere a interação entre o par ponta-amostra. A força sentida pelo cantiléver é medida através da sua deflexão e a força de *pull-off force* ou adesão é definida como a força máxima de atração durante a retração da ponta saindo do contato com a superfície. De forma geral, as forças de adesão F_{ad} são uma combinação de forças eletrostáticas F_{el} , forças de van der Waals F_{vdW} , forças de capilaridade F_{cap} e forças devido a ligações químicas F_{quim} ^[67], de acordo com a equação:

$$F_{ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{cap} + F_{quim}. \quad (2.17)$$

É importante explicar sobre a contribuição das forças de ligação químicas (F_{quim}) para a força de adesão. Dependendo dos grupos químicos presentes na extremidade da ponta e na superfície do substrato, ligações químicas podem se formar durante o contato ou outras interações químicas específicas (por exemplo, receptor-ligante) podem ocorrer e, em seguida, muitas vezes, dominam a força adesão resultante. Esse tipo de interação ocorre em pontas funcionalizadas

com grupamentos químicos específicos ^[67].

2.5.2 Forças Eletrostáticas

As forças do tipo coulombianas sempre estão presentes entre duas distribuições de cargas pontuais ou esféricas. É uma força de longo alcance, que em geral segue a lei do inverso do quadrado. Depende da distribuição espacial das cargas nos objetos interagentes e pode ser repulsiva ou atrativa, dependendo se as cargas interagentes têm o mesmo sinal ou não.

Para o caso específico de cargas pontuais $q_1 = q_2 = e$ isoladas dentro de um meio com permissividade elétrica ϵ , mantidas à uma distância r uma da outra, o potencial pode ser escrita na forma:

$$U(r) = \frac{e^2}{4\pi\epsilon r}. \quad (2.18)$$

Para se ter ideia do valor da energia associada a este potencial, pode-se compará-la com a energia térmica $K_B T$ em temperatura ambiente, um padrão muito utilizado na literatura científica. O símbolo K_B representa a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. Para distâncias interatômicas típicas ($r=2 \text{ \AA}$) e usando o valor $e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$, a energia da interação coulombiana é de aproximadamente $278 K_B T$. Esse resultado mostra que a interação coulombiana é muito forte em experimentos realizados em temperatura ambiente. A equação acima vale para cargas elétricas isoladas, o que, quase sempre, não é o caso da força entre sonda e amostra. Em situações mais realísticas, uma carga elétrica não está isolada, mas envolvida por outras cargas. O resultado disso é a redução do alcance das forças envolvidas, causadas pelo efeito de blindagem eletrostática.

A medida das forças de Coulomb pode ser empregada para estudar o formato da ponta. Hao *et. al.*^[68] estudaram as forças de Coulomb modelando o sistema ponta-amostra como uma esfera em uma superfície plana e como uma ponta cônica com extremidade esférica em uma amostra plana. No primeiro caso, a força é dada por ^[58]:

$$F_0 = \pi\epsilon_0 V^2 \frac{R}{r}, \quad (2.19)$$

para $R/r \gg 1$, e por:

$$F_\infty = \pi\epsilon_0 V^2 \left(\frac{R}{D} \right)^2, \quad (2.20)$$

para $R/D \ll 1$. Aqui, V é a diferença de potencial entre a ponta e a amostra, R o raio da esfera e r é a distância ponta-amostra.

No caso de um cone com extremidade esférica em uma superfície plana, a força pode ser calculada substituindo as superfícies condutoras equipotenciais por suas cargas imagem equivalentes. Para ângulos de abertura pequenos ($\theta \leq \pi/9$), o cone pode ser aproximado por uma linha carregada de densidade de carga constante λ_0 dada por:

$$\lambda = 4\pi\epsilon_0 V \left[\ln \left(\frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} \right) \right]^{-1} \quad (2.21)$$

Isso resulta em uma força dada pela equação:

$$F_k \cong \frac{\lambda_0^2}{4\pi\epsilon_0} \ln \frac{L}{4D}, \quad (2.22)$$

em que L é o comprimento do cone e $L \ll r \ll R$.

As Equações 2.5, 2.7 e 2.9 representam um cenário em que uma partícula ou um corpo extenso exerce forças sobre outra partícula ou outro corpo extenso carregados eletricamente, sem a presença de demais partículas no mesmo ambiente. Na próxima seção será descrita a influência das demais cargas elétricas do ambiente sobre a partícula (corpo) em análise.

2.5.3 Forças Iônicas

Quando a amostra e a sonda possuem íons, as forças se tornam muito intensas, e a energia de interação entre os átomos da sonda e da superfície do material pode ser escrita como ^[52]:

$$U(r) = \pm M \frac{e^2}{4\pi\epsilon r}, \quad (2.23)$$

onde M representa a constante de Madelung ($|M| > 1$). Essa constante quantifica o efeito eletrostático líquido de todos os íons da rede cristalina, positivos e negativos, sobre uma determinada carga elétrica. Esse não é um potencial do tipo coulombiano simples entre duas partículas de carga e , no presente caso, um elétron está sob a interação de vários portadores de cargas positivas e negativas que se encontram na sua vizinhança. Essa contribuição entra no cálculo através do parâmetro M e o parâmetro r é a distância média entre as cargas elétricas da superfície do material e da ponta de prova.

Quando a amostra e a sonda possuem íons, a força envolvida tem um alcance maior do que as outras contribuições que serão estudadas a seguir. Para distâncias interatômicas típicas

($r=2 \text{ \AA}$) e assumindo $q=e$, a energia da interação iônica é de aproximadamente $278 \text{ MK}_B\text{T}$, ou seja, a força iônica é maior que a força coulombiana pelo fator M .

2.5.4 Forças entre Íons e Dipolos

Em muitos casos, as amostras a serem estudadas no AFM são íons e esses podem induzir dipolos na sonda (ou vice-versa). Sem entrar em detalhes do cálculo, a energia de interação entre um átomo ionizado e um átomo neutro polarizado pode ser escrita como^[67]:

$$U(r) = \frac{qp \cos \theta}{4\pi\epsilon r^2}, \quad (2.24)$$

sendo q a carga do íon, p o momento de dipolo elétrico e θ o ângulo entre a direção do eixo do dipolo e o íon. Para esse tipo de material, a força envolvida tem uma dependência mais forte com a distância entre a ponta de prova e a amostra ($F \sim r^{-3}$). Para distâncias interatômicas típicas, as forças provenientes destas interações são no máximo equivalentes à do tipo coulombiana, pois a função $\cos \theta$ tem valor máximo igual a 1.

2.5.5 Forças Capilares

Os experimentos de SPM no ar também devem considerar o papel que a umidade atmosférica desempenha na interação ponta-superfície. A presença de camadas de água líquida na ponta ou superfície pode introduzir algum comportamento descontínuo em sua interação. Além de reduzir a intensidade de todas as outras interações por um fator k (constante dielétrica), as camadas de líquido formarão menisco entre as superfícies e surgem forças capilares. Embora tenha um nome diferente, a origem das forças de capilaridade é a atração de van der Waals entre as moléculas do líquido e os átomos do sólido, que neste contexto são denominadas de forças de adesão. Essa camada será então comprimida até o contato máximo entre a ponta e a superfície. O movimento adicional da ponta vai pressionar o menisco até que se rompa, com o ponto de ruptura determinado pela espessura da camada original^[58].

As forças capilares podem ser mais fortes do que outros efeitos, como forças de ligações eletrostáticas ou químicas, além das forças de Van der Waals, com as quais podem ser comparáveis em escala nano. Se a espessura da camada de líquido for irrelevante, os efeitos serão mais sutis. Para um sistema de superfície e ponta considerado seco, por exemplo, em vácuo ou em vapor de nitrogênio, a força de adesão será devida principalmente às forças de dispersão, de

acordo com a equação:

$$F_{ad} = 4\pi R\gamma_s, \quad (2.25)$$

em que γ_s é a energia superficial dos sólidos. Se algum vapor for introduzido, a energia da superfície será modificada por adsorção e em alguma pressão de vapor relativa ocorrerá condensação capilar. A força entre a ponta e a superfície é então dada por ^[58]:

$$F_{ad} = 4\pi R\gamma_{lv} \cos \theta + 4\pi R\gamma_{sl}, \quad (2.26)$$

em que s , l e v denotam sólido, líquido, vapor. γ_{lv} é a tensão superficial do líquido-vapor, θ é o ângulo de contato do líquido e γ_{sl} é a tensão interfacial sólido-líquido. O primeiro termo é devido à pressão capilar na parte líquida e o segundo termo está associado à interação sólido-sólido.

2.5.6 Força de Dupla Camada em Fluidos

A maioria das superfícies imersas em uma solução eletrolítica apresenta uma carga superficial. Com essas cargas superficiais, surge um gradiente de concentração no eletrólito chamado de camada dupla elétrica (EDL). Quando as superfícies se aproximam, ocorre uma interação devido à sobreposição de seus EDLs correspondentes. A interação EDL desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos devido ao seu caráter de longo alcance. Exemplos desses processos são a adesão celular ^[69] e estabilidade da estrutura da proteína ^[70].

No cenário do AFM, a ponta e a amostra sofrerão uma força de dupla camada elétrica (EDL) quando colocadas em proximidade. A abordagem mais comum para calcular essa força é resolver a equação de Poisson-Boltzmann para o potencial eletrostático. Essa é uma equação diferencial não linear de segunda ordem que não pode ser resolvida analiticamente. No entanto, diferentes conjuntos de aproximações podem ser aplicados para obter expressões fáceis de manusear. Uma dessas aproximações é baseada na seguinte expressão, para a energia de interação EDL por unidade de área de dois meios-espacos paralelos e planos ^[71]:

$$W_{EDL}(r) = \frac{2\sigma_1\sigma_2\lambda_D}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{r}{\lambda_D}}, \quad (2.27)$$

em que ε é a constante dielétrica do meio, ε_0 permissividade do vácuo, σ_1 e σ_2 são as densidades de carga da superfície de ambas as superfícies, r é a separação e λ_D , conhecido como comprimento de Debye, é o comprimento de decaimento da interação, definido como:

$$\lambda_D = \left(\frac{\varepsilon\varepsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.28)$$

em que $K_B T$ é o fator Boltzmann; c_i e z_i são os valores de concentração e valência do i -ésimo, tipo de íon presente na solução. A energia de interação por unidade de área de dois meios-espacos paralelos planos, W , que é dada pela equação 2.16, pode ser relacionado à força entre duas superficies curvas, F , pela aproximação de Derjaguin ^[71], como:

$$F(r) = \left[\frac{2\pi R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right] W(r), \quad (2.29)$$

em que R_1 e R_2 são os raios de curvatura das respectivas superficies. Se um desses raios for muito maior que o outro, a equação se reduz a:

$$F(r) = 2\pi R W(r). \quad (2.30)$$

Na maioria dos experimentos de AFM, a amostra é considerada plana e homogênea quando comparada com a ponta (uma esfera de raio R_t). Portanto, a força EDL entre uma ponta de AFM e uma superfície plana separada por uma distância r , com densidades de carga superficial σ_t e σ_s , respectivamente, pode ser expressa como:

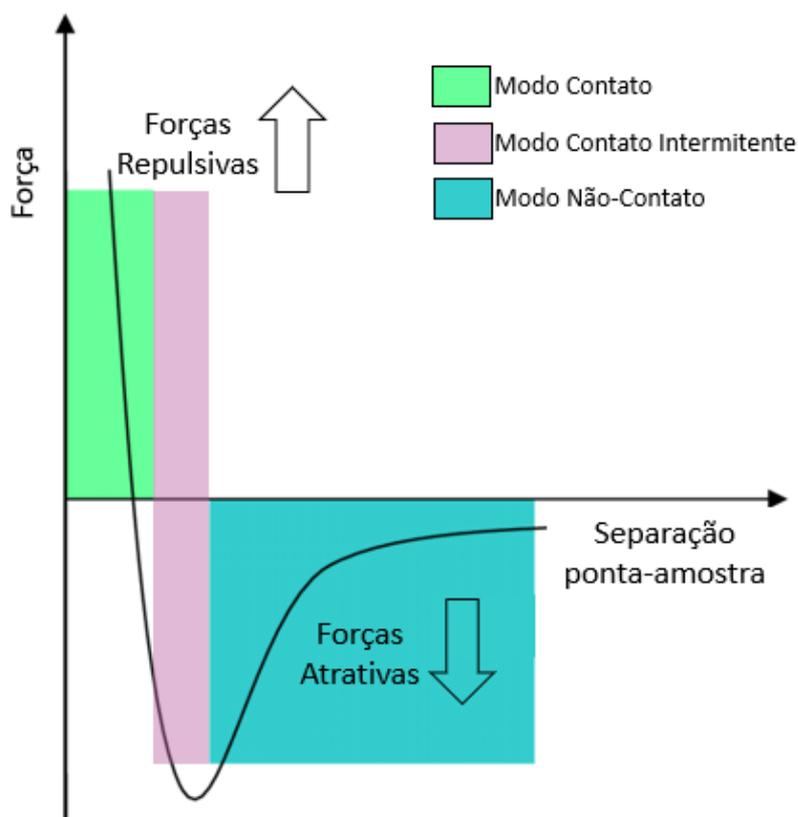
$$F_{EDL}(r) = \frac{4\pi R_t \sigma_t \sigma_s \lambda_r}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{D}{\lambda_r}}. \quad (2.31)$$

2.6 Modos de Operação do AFM

Como as interações entre a sonda de AFM e a superfície da amostra podem ter natureza repulsiva ou atrativa, o AFM pode operar em diferentes modos, cada um atuando em uma região do seu potencial de interação (Figura 2.16). Os modos de operação (ou varredura) mais comuns no AFM são: modo contato, modo não-contato, contato intermitente (*tapping mode*) e espectroscopia de força.

No modo contato (indicado para amostras mais rígidas), a varredura é feita sempre com a ponta em contato físico com a superfície da amostra; portanto, nesse regime, as forças resultantes são predominantemente repulsivas, causando deflexão positiva no cantiléver, que aplica uma força sobre a amostra. À medida que a ponta percorre a amostra, o cantiléver se deflexiona, medindo as alterações de topografia da superfície por meio da alteração do sinal do laser

Figura 2.16: Potencial de interação entre sonda-amostra e suas respectivas regiões nas quais os modos de operação do AFM atuam.



Fonte: Própria autora.

(posicionado no dorso da extremidade livre do cantiléver) no fotodetector. Para que a ponta não danifique a amostra, é necessário que o cantiléver tenha uma constante de mola menor que a constante de mola da amostra, a fim de se deflexionar sem a deformar.

No modo de contato intermitente (*tapping mode*), o cantiléver oscila em uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, enquanto varre a amostra. A sonda é aproximada até que começa a realizar contato intermitente com a amostra (realizando pequenas batidas), eliminando as forças de arraste laterais da sonda com a amostra, permitindo a varredura em amostra macias e com pouca adesão ao substrato. A amplitude de oscilação da sonda durante a varredura é suficiente para que o cantiléver tenha força restauradora que impede que a sonda fique presa na camada de contaminação devido a forças de menisco ou eletrostáticas que estão presentes na superfície da amostra, especialmente em medidas feitas em ar ^[72].

No modo de não-contato, a sonda não toca a superfície da amostra. Na microscopia de contato, as forças interatômicas de curto alcance são estudadas medindo as deflexões quase estáticas do cantiléver, que possui uma constante de mola conhecida. Apesar de as forças de van

der Waals de longo alcance estarem também presentes no modo de contato, elas não contribuem para obtenção a imagem em escala atômica. Aumentando a separação entre a sonda (aproximadamente 100 nm), somente contribuirão para a deflexão do cantiléver as forças de interação de longo alcance, como forças eletrostáticas e forças dipolares magnéticas ^[73].

O método de detecção das forças de interação no modo de operação de não-contato é diferente do contato. Assim como no modo de contato intermitente, o cantiléver vibra perto de sua frequência de ressonância (por meio de um piezelétrico posicionado do suporte da sonda), porém, ao invés de medir suas deflexões quase estáticas, medem-se as variações na frequência de ressonância que resultam da interação das forças entre a ponteira e a amostra.

Para falar do modo de espectroscopia de força, precisamos detalhar o processo de obtenção das curvas de força *versus* deflexão do AFM, crucial para aquisição de informações que vão além da topografia, especialmente as propriedades mecânicas em nanoescala. Na próxima seção, detalharemos os conceitos de espectroscopia de força.

2.6.1 Espectroscopia de Força

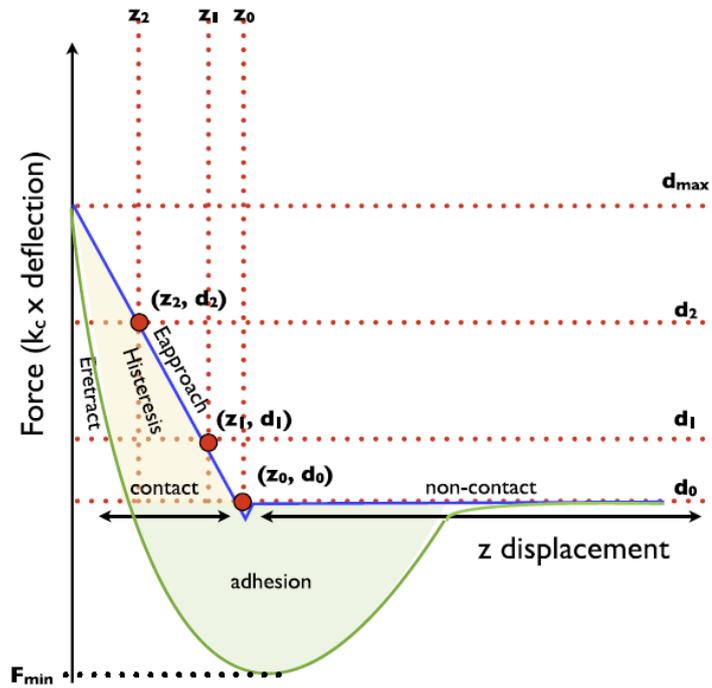
Diversas informações podem ser obtidas a partir da relação entre a distância entre a sonda e a amostra e as forças medidas nessas distâncias. O estudo da relação entre força *versus* distância é chamado de espectroscopia de força.

Conceitos das Propriedades Nanomecânicas obtidas por medidas de AFM

As curvas de força-distância $F(z)$ obtidas através de uma medida de espectroscopia de força por AFM nos mostram o comportamento da interação ponta-amostra. A Figura 2.17 apresenta um gráfico de curva de força mostrando o movimento relativo da sonda de AFM para cada ponto desta curva. O eixo horizontal traça o movimento da sonda em relação à amostra. Enquanto a sonda desce para a amostra, a distância sonda-amostra diminui. A deflexão do cantiléver é traçada no eixo vertical do mesmo gráfico. O ciclo de aproximação e retração exibe uma histerese entre as curvas, uma consequência da resposta viscoelástica do material. O ajuste dessas curvas em um dado intervalo de deflexão (d_1, d_2), com modelo de Hertz, proporciona um valor estimado do módulo elástico da amostra. A partir da histerese, emprega-se um modelo específico para determinar a viscosidade aparente das amostras.

A partir dessas curvas, propriedades como elasticidade, viscosidade aparente e adesividade são calculadas, fornecendo mapas quantitativos dessas grandezas, além da análise desses

Figura 2.17: Figura esquemática de uma típica curva de deflexão/deslocamento adquirida em uma amostra macia.



Fonte: Gentilmente cedida por Luciana Alencar.

parâmetros em curvas de força individuais.

Para a análise do módulo elástico das curvas de força, consideramos a teoria de contato de Hertz, cuja relação força-indentação para um indentador cônico, como a sonda de AFM, é dada por ^[54]:

$$F_{cone} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan\theta \delta^2, \quad (2.32)$$

onde E e ν representam o módulo de elasticidade e a razão de Poisson do material, respectivamente. A quantidade θ representa o ângulo de abertura da ponta cônica.

Para as amostras viscoelásticas, a resposta da força que atua no cantiléver é composta por uma componente elástica e uma viscosa ($F_T = F_{el} + F_v$), de tal forma que o trabalho realizado pelo cantiléver é parcialmente perdido por atrito interno do próprio material, gerando uma histerese no ciclo de aproximação/retração da curva de força (Figura 2.17).

Na obtenção do valor das forças de adesão das amostras, observa-se que durante a retração do cantiléver ele sofre uma deflexão negativa até que sua força total supere as forças de adesão, perdendo o contato com a superfície da amostra. O ponto em que a força de adesão entre a ponta e a amostra atinge o seu valor máximo é aquele que corresponde ao ponto de mínimo de deflexão. Usando essas características gerais, a adesividade das amostras pode ser deduzida

qualitativamente de duas diferentes formas: i) tomando-se o valor de força máxima de adesão entre a ponta e a amostra (valor mais negativo de deflexão) e ii) calculando o trabalho realizado pelas forças adesivas. O trabalho é obtido calculando a área da curva de deflexão/deslocamento em sua porção negativa de deflexão (porção que corresponde às forças adesivas) (Figura 2.17).

Indentações sucessivas podem resultar em deformações plásticas da superfície se o *stress* (pressão) aplicado exceder o ponto de máxima carga do material. No entanto, o modelo de Oliver e Pharr^[74] considera que, durante o processo de retração da sonda, apenas a parte elástica da deformação retorna ao seu estado inicial, enquanto a parte plástica permanece inalterada. Portanto, de maneira distinta ao modelo de Hertz, esta abordagem considera apenas o processo de alívio da carga de força sobre a superfície.

Um parâmetro definido nesta abordagem é a dureza da superfície S , cujo valor é dado por:

$$S = \frac{dF}{dh}, \quad (2.33)$$

onde $\frac{dF}{dh}$ é a derivada da força aplicada à superfície em relação à distância percorrida pela sonda h durante a retração e aproximação da sonda. De posse do valor de S para vários pontos da superfície da amostra, monta-se um mapa dessa grandeza ao longo da área analisada.

2.6.2 PeakForce Quantitative NanoMechanics

O modo de operação *PeakForce Quantitative NanoMechanics* (QNM) é uma extensão do modo de contato intermitente, que permite a aquisição de curvas de força em cada pixel da imagem obtida, em altas frequências (0,5-2 kHz), possibilitando a medição quantitativa das propriedades das amostras, em nanoescala, gerando mapas de alta resolução (com resoluções compatíveis as das imagens topográficas). Como o modo QMN controla a força aplicada à amostra pela ponta, as indentações na superfície da amostra são extremamente precisas, evitando contribuições nos valores, por exemplo, de módulo de Young, devido a influência do substrato.

2.7 Dados quantitativos a partir de mapas topográficos

Em sistemas biológicos, a rugosidade da superfície está relacionada com o funcionamento adequado de eritrócitos. Em células com alterações funcionais, devido a patologias, é observada uma diminuição na rugosidade da membrana^[75]. A presença de uma variedade de

asperezas, de diferentes tamanhos e formas na superfície de diversos sistemas biológicos, desempenha um papel importante na interação, célula-célula e célula com substrato celular. Além disso, a organização dessas asperezas está diretamente relacionada aos elementos da estrutura analisada, como arranjo de citoesqueleto, matriz de colágeno, proteínas de membrana, dentre outros [76].

Uma superfície, independentemente do seu processo de formação, possui irregularidades em sua forma geométrica. Tais irregularidades podem se manifestar a nível macro e microscópico [77]. Quando são observadas a níveis em micro e nanoescala, começamos a definir uma propriedade chamada rugosidade. Todas as superfícies encontradas na natureza apresentam rugosidade quando observadas em escala microscópica. A rugosidade pode ser definida como as irregularidades na textura da superfície.

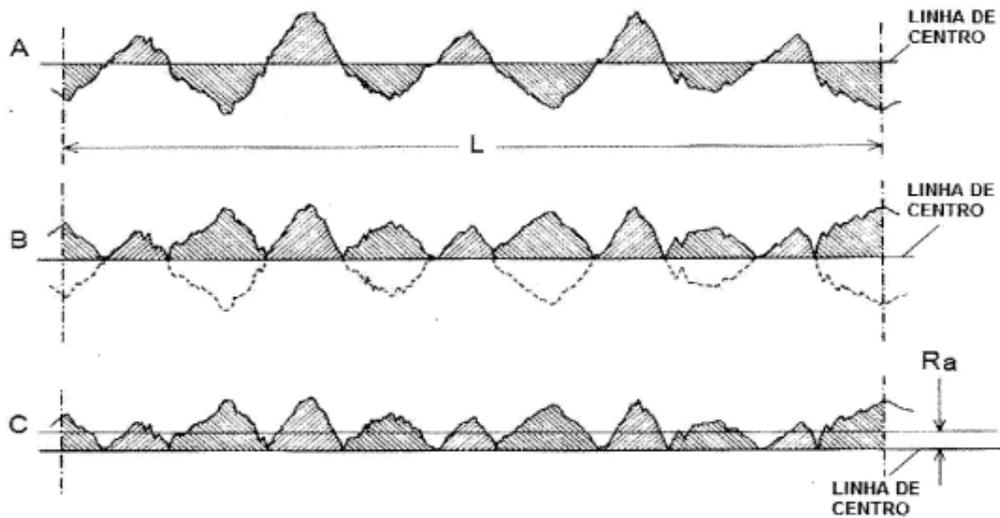
Quantitativamente, a rugosidade pode ser medida a partir de três parâmetros obtidos da observação da superfície: de amplitude, de espaço e híbridos. Os parâmetros de amplitude levam em conta apenas as quantidades verticais, ou seja, altura dos picos e profundidade dos vales. Dentre os parâmetros de amplitude, destacam-se a rugosidade média e a rugosidade média quadrática [78].

A rugosidade média (R_a) é o parâmetro mais utilizado para controle de qualidade geral de rugosidade. Esse parâmetro é definido matematicamente como o desvio médio absoluto das irregularidades da rugosidade da linha média ao longo de um comprimento de amostragem. A Figura 2.18 mostra como podemos mensurar esse parâmetro, que é medido definindo uma linha central na superfície, de modo que a área acima da linha central seja igual a área abaixo da linha central (Figura 2.18A). Conforme visto na Figura 2.18B, a área abaixo é projetada para cima e, por fim, é calculada a média aritmética das alturas de todos os pontos no eixo vertical em relação à linha média. Esse parâmetro é fácil de definir e medir e fornece uma boa descrição geral das variações de altura.

A definição matemática para a rugosidade média é:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|, \quad (2.34)$$

em que n é o número de pontos (pixels) no cursor da caixa (espaço escolhido para medir R_a) e y_i a distância vertical máxima entre os pontos de dados mais alto e mais baixo na imagem antes do ajuste do plano. Os valores obtidos por R_a não definem as irregularidades do perfil, podendo assim ter o mesmo valor para perfis com distribuição de picos e vales diferentes; para

Figura 2.18: Parâmetro R_a de rugosidade.

Fonte: retirado de [79].

tal distinção é necessário a utilização de outros parâmetros.

A rugosidade média quadrática (RMS), ou R_q , representa o desvio padrão da distribuição das alturas na superfície, ou seja, ela é semelhante ao parâmetro R_a , porém a média medida é quadrática. Este é um importante parâmetro para descrever a rugosidade por métodos estatísticos, sendo mais sensível do que R_a para grandes flutuações da altura da superfície em relação à linha central.

A expressão matemática que descreve R_q é:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}, \quad (2.35)$$

ou ainda

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_{i=1}^n y(x)^2}. \quad (2.36)$$

O fenômeno da rugosidade pode ser observado desde escalas macroscópicas até a escalas microscópicas. Desta forma, teorias podem ser desenvolvidas de modo a descrever o sistema em estudo conforme suas características de escala. Essas teorias utilizam dados estatísticos para descrever o sistema e modelar a mecânica de contato entre superfícies [77]. Algo que deve ser

levado em consideração é a escala na qual está sendo analisada a superfície. Em alguns materiais, suas características variam, dependendo da ampliação da imagem. Já outras, preservam suas características, mesmo quando a escala de observação varia. Como as equações que definem os parâmetros de rugosidade levam em consideração o número de pixels de uma imagem, além das alturas correspondentes a cada pixel, é conveniente adotar, para medidas de AFM, tamanhos de varredura e resolução padronizados.

Na próxima seção, algumas aplicações do uso da técnica de AFM em eritrócitos serão mostradas.

2.8 Microscopia de Força Atômica no Estudo de Eritrócitos

Nas últimas décadas, muitas evidências bioquímicas e biofísicas vêm sendo acumuladas produzindo uma complexa e detalhada representação sobre a composição da membrana, a microestrutura e a deformabilidade de células. Apesar do grau de detalhamento, tal representação ainda possui alguns elementos conflitantes e muitos trabalhos estão consolidando uma ponte entre o que se sabe sobre a bioquímica da membrana e o conhecimento de propriedades físicas *in situ* [7]. Dentre as propriedades físicas utilizadas no estudo de células, destacam-se as propriedades mecânicas.

As propriedades mecânicas de células vivas são de grande importância para um bom funcionamento fisiológico dos organismos, porém o conhecimento acerca delas ainda é considerado limitado. Nikova e colaboradores [80] justificam tal limitação afirmando que não há um total entendimento sobre o processo de resposta estrutural da célula a tensões externas, bem como do papel que a micromecânica exerce em várias condições fisiológicas e patológicas e sobre como a elasticidade de um certo tipo de células se altera em processos patológicos.

Durante muito tempo, existiam duas abordagens para o estudo de propriedades mecânicas celulares. Na primeira delas, estuda-se a mecânica considerando a célula como um todo. Na segunda abordagem, a mecânica dos componentes estruturais da célula foram estudadas de forma individual [81].

Em ambas as abordagens, a mecânica celular tem sido estudada por várias técnicas. Dentre elas, encontra-se o procedimento de *cell poker*, onde se estuda a deformabilidade celular baseada na sua resistência à indentação com uma fibra de vidro de extremidade achatada [82, 83]. Outras técnicas incluem: a aspiração por micropipeta, como observado nos trabalhos de Young

e Evans^[84] e Shao e Hochmuth^[85], a espectroscopia *flicker*^[86,87], a microscopia de varredura acústica^[88,89], pinças óticas^[90-92] e microscopia de desfocalização^[93,94].

Com o advento da técnica de AFM, foi possível estudar as propriedades mecânicas em níveis macro e microscópicos da estrutura celular, bem como a distribuição espacial dessas propriedades em uma única célula. Informações topográficas e investigações de estruturas intracelulares utilizando esta técnica são relatadas na literatura^[95]. Essa poderosa técnica é também usada para caracterização qualitativa e quantitativa de propriedades mecânicas de materiais biológicos^[81].

Em AFM, as propriedades micromecânicas da superfície celular e de camadas subjacentes podem ser detectadas tanto no modo contato de operação quanto no modo *tapping* ou contato intermitente. O procedimento básico de operação em modo contato para estudos das características mecânicas de células e tecidos é a espectroscopia de força. A curva de força contém informações sobre as interações sonda/amostra de curto e longo alcance em um determinado ponto da amostra, enquanto o *Force Volume* é uma coleção de curvas de força ao longo de uma determinada área de varredura. Ambas representam uma base para a estimativa de propriedades nanomecânicas^[81].

Verifica-se um grande número de publicações que estudam a mecânica de células do sangue via AFM. Mais especificamente, observa-se um grande interesse pelas células vermelhas^[8,96-99].

Há uma associação entre muitos processos fisiológicos/patológicos e a estrutura da célula, mais especificamente com suas propriedades mecânicas. Em nível histológico, tal fato é observado em tradicionais análises de elasticidade, como nos exames de toque empregados clinicamente na detecção de nódulos duros associados às neoplasias. No entanto, observa-se que recentes trabalhos estão correlacionando alterações de propriedades mecânicas em nível celular com doenças, tais como: câncer, artrite, doenças cardiovasculares e anemias^[54].

Dulinska e colaboradores^[8] estudaram as propriedades elásticas de eritrócitos de pacientes com anemias hemolíticas e as comparou com aquelas de eritrócitos de pacientes saudáveis. Dentre outros resultados obtidos nesse trabalho, os autores observaram um aumento no módulo de Young das células vermelhas de pacientes portadores de esferocitose hereditária em relação às de pacientes saudáveis. Os autores associaram a forma anômala da célula (chamada esferócito) ao aumento do módulo de Young.

As propriedades elásticas da membrana de eritrócitos influenciam tanto o formato dessa

célula quanto na sua resposta a várias tensões, ou seja, na sua deformabilidade ^[100]. Segundo Murador e colaboradores ^[101], a membrana das células vermelhas consiste de uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas integrais, que é suportada por um citoesqueleto proteico subjacente. A estrutura composta pelo citoesqueleto e pela bicamada lipídica é responsável por propriedades singulares da membrana dos eritrócitos. Para a membrana se deformar normalmente, a rede de proteínas do citoesqueleto deve ser capaz de ser submetida a um rearranjo conformacional em que as moléculas de espectrina se dobram e desdobram. Se as associações inter e intramoleculares de espectrina aumentam, as mudanças conformacionais serão dificultadas e a deformabilidade diminuirá. A proximidade entre a rede de proteínas e a bicamada também exerce um papel determinante na deformabilidade da membrana eritrocitária ^[7].

A banda 3 é considerada a principal proteína integral da membrana do eritrócito, representando cerca de 25% - 30% do total do conteúdo proteico da membrana. Por interação com lipídeos e outras proteínas, a banda 3 une o complexo proteico do citoesqueleto e confere aos eritrócitos propriedades elásticas. A forte concentração de resíduos carregados negativamente no domínio citoplasmático dessa proteína tem papel importante na sua interação com as demais macromoléculas e na fixação de algumas delas, tais como a 4.1, 4.2 e anquirina ^[101].

Segundo Murador ^[101], mutações da banda 3 (principal proteína integral da membrana do eritrócito) têm sido associadas à doenças como esferocitose e eliptocitose hereditárias, onde se verificam o aumento da rigidez do eritrócito e resistência à infecção por malária. De acordo com os autores, há um caso registrado na literatura relatando a ausência da banda 3 em eritrócitos de pacientes portadores de esferocitose.

Outra proteína relevante presente na membrana eritrocitária é a glicoforina (GPA). A GPA é a maior glicoproteína transmembrana dos eritrócitos, correspondendo a 2% - 4% do conteúdo proteico membranar. A concentração de GPA sobre os eritrócitos é responsável por 80% da carga negativa dessas células. Essa superfície celular negativa ajuda a minimizar a interação célula-célula e prevenir a aglutinação eritrocitária. Além disso, a associação da GPA com a banda 3 contribui para propriedades mecânicas da membrana ^[101].

Essa distribuição de cargas negativas sobre o eritrócito é relatada no trabalho de Akaki e colaboradores ^[102]. Nesse trabalho, a técnica de Potencial de Superfície do AFM (*Surface Potential* - SP) foi utilizada para detectar o potencial elétrico originado por essas cargas sobre a membrana. A técnica de SP pode ser utilizada em conjunto com AFM para a obtenção de imagens, associando o potencial elétrico de superfície com a topografia da mesma.

A membrana eritrocitária é uma das membranas celulares mais estudadas. Acredita-se que ela seja a responsável pela manutenção da forma e da capacidade de deformação dos eritrócitos, proporcionando uma resistência a repetidas passagens através de capilares cujos diâmetros são menores que o dessas células. Seu formato bicôncavo resulta de uma variedade de interações entre a célula e o meio em que se encontra, podendo ser alterado *in vitro* e *in vivo* [22].

A forma do eritrócito é fortemente determinada pelas propriedades mecânicas do citoesqueleto e pela atividade das moléculas de adenosina trifosfática (ATP) [97]. A forma do eritrócito vem sendo investigada em trabalhos como o de Mesquita e colaboradores [103]. Nesse trabalho, os autores utilizam a microscopia de desfocalização para obter a forma/flutuações, tamanho, curvatura, índice de refração e a viscosidade citoplasmática de eritrócitos.

No trabalho de Girasole e colaboradores [22], as medidas de AFM foram utilizadas para caracterizar a rugosidade da membrana eritrocitária numa tentativa de relacionar esse parâmetro com a forma do eritrócito. Girasole e seus colaboradores concluíram que a rugosidade independe do formato do eritrócito e que ela pode ser utilizada para fornecer informações morfológicas adicionais a respeito dessa célula.

Para se estudar isoladamente a membrana e o citoesqueleto, faz-se necessária a preparação de fragmentos membranares (*ghosts*). O *ghost* consiste no eritrócito sem a presença da hemoglobina. Antes de iniciar os experimentos, os eritrócitos são delicadamente rompidos [104]. Esse processo se inicia com a escolha ou preparação do substrato onde os eritrócitos serão aderidos. A superfície do substrato deve possuir uma grande afinidade química com a membrana eritrocitária, a fim de que a fixação seja a maior possível. Após a fixação, o eritrócito é lisado osmoticamente a fim de romper a membrana e expor a superfície citoplasmática. Após sucessivos enxágues, remove-se todo o conteúdo citoplasmático e os fragmentos membranares não-aderidos ao substrato [105].

A dificuldade no estudo de alta resolução de materiais biológicos (em nível molecular) por AFM também se deve à má fixação das células ao substrato. Substratos como lamínulas de vidro e mica tem sido tratados com substâncias tais como: poly-L-lisina, 3 aminopropiltrimetóxisilano (APS), 3-aminopropiltritóxisilano (APTES), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisucinimida (ANBNOS) a fim de aumentar a capacidade de fixação desses materiais [105].

Em seu trabalho, Stevina e colaboradores [100] demonstraram que a membrana e o citoesqueleto do eritrócito afetam seu comportamento elástico de maneira cooperativa. Um entendimento acerca da estrutura dos constituintes da membrana eritrocitária, organização e sua

elasticidade também são relatados nos trabalhos de McGouth e Discher e colaboradores^[106,107].

Há trabalhos, como o de Bremmel e colaboradores^[108], em que se utilizam uma abordagem diferente para se estudar a mecânica celular. Os autores estudaram a deformação e o comportamento reológico de eritrócitos normais, analisando o comportamento coletivo das propriedades mecânicas dessas células. Para tanto, utilizaram sondas de AFM com esferas de sílica fixadas na ponta, a fim de que o indentador tomasse a forma esférica e tamanho próximo ao da célula. Assim, é possível indentar uma grande região do eritrócito e sondar coletivamente tais propriedades.

Segundo Bremmel^[108], a histerese em uma curva de força é uma evidência da resposta viscoelástica, onde um tempo de resposta é necessário para que a célula volte a sua conformação original. Variando-se a frequência com que a sonda se aproxima e se afasta da amostra, pode-se caracterizar a sua viscoelasticidade. Bremmel e colaboradores variaram a frequência do processo de obtenção de curvas de força sobre eritrócitos e obtiveram curvas com diferentes histereses.

Com o aumento da frequência, a ponta desce e sobe com maior velocidade deformando rapidamente o eritrócito, que não tem o tempo suficiente para voltar a sua conformação original, ocasionando a histerese na curva de força. Quanto maior a histerese, maior será a dissipação de energia potencial elástica. O aumento da histerese com o aumento da velocidade de aproximação e retração da ponta é outra evidência do comportamento viscoelástico^[108].

A membrana dos eritrócitos tem propriedades viscoelásticas singulares, que, em alguns aspectos, ora se assemelham aos fluidos, ora se aproximam daquelas concernentes aos sólidos. A base estrutural da membrana dos eritrócitos ainda é muito discutida^[109]. A alta resistência da membrana a mudanças na sua área superficial é uma característica das bicamadas fosfolípídicas, enquanto sua resposta ao cisalhamento depende da rede de proteínas do citoesqueleto que reveste a superfície citoplasmática^[7,109]. De acordo com Bremmel^[108], poucos estudos têm considerado quantitativamente a viscoelasticidade de eritrócitos e feito uma correlação desta propriedade com a reologia do sangue.

Mokken e colaboradores^[110] definem *Hemorreologia* como sendo a ciência que estuda o comportamento do fluxo sanguíneo. Segundo esse autor, o maior campo de interesse da hemorreologia é aquele que estuda a viscosidade do sangue. Logo, essas propriedades devem ser influenciadas pela deformabilidade do eritrócito e sua viscoelasticidade.

Caprari e colaboradores^[111] usaram a reologia do sangue total para investigar a influên-

cia de próteses valvares cardíacas sob o estado anêmico de pacientes com esferocitose e elip-
ticitose. Segundo esses autores, em casos de implantação dessas próteses, a fragmentação de
eritrócitos pode ser uma importante causa de processos hemolíticos, mudanças na deformabili-
dade de eritrócitos e na viscosidade do sangue. Isso deve se agravar em pacientes portadores de
anemias hemolíticas com próteses cardíacas. Essa fragmentação geralmente é atribuída ao mau
funcionamento das válvulas.

Diante dessa revisão, observa-se que investigações através da técnica de AFM podem ser
úteis no estudo de patologias de células do sangue, haja vista que qualquer fator influenciando
as estruturas celulares pode causar alterações em suas propriedades mecânicas ^[96]. Corrobo-
rando com essa ideia, Dulinska e colaboradores ^[8] afirmam que a determinação de propriedades
elásticas de células via AFM possibilita uma medida da influência de diferentes fatores na me-
cânica celular, fato que justifica a perspectiva de que essa técnica venha a ser utilizada como
uma ferramenta de diagnóstico para diferentes patologias.

Nos trabalhos citados, as propriedades mecânicas de eritrócitos vêm sendo estudadas por
várias técnicas e, em alguns deles, percebe-se uma busca por uma caracterização mecânica das
patologias. Observa-se, porém, que a técnica de AFM tem sido pouco aplicada ao exame de
eritrócitos em anemias hemolíticas. Com este trabalho, espera-se contribuir de forma signifi-
cativa para a consolidação da ponte entre os conhecimentos bioquímicos já estabelecidos e as
propriedades nanomecânicas e ultraestruturais de eritrócitos em anemias hemolíticas.

No próximo capítulo, serão abordados os materiais e métodos para caracterização das
propriedades nanomecânicas e ultraestruturais de eritrócitos por microscopia de força atômica.

3. Materiais e Métodos

Esse é um estudo experimental de cooperação multidisciplinar entre o Departamento de Física da Universidade Federal do Maranhão (DEFIS-UFMA) e o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR).

3.1 Aquisição das amostras

As amostras de sangue de doadores voluntários sudáveis (hemoglobina AA) e de pacientes com hemoglobinopatias SS, SF, SC, AS (Anemia falciforme) e β -talassemia foram obtidas por meio de parceria com o HEMOMAR e de acordo com as normas do Comitê de Ética Brasileiro (CAAE: 89646518.5.0000.5087) (ANEXO I).

O HEMOMAR atua: selecionando doadores autólogos e homólogos; realizando coletas sanguíneas internas e externas, analisando, identificando e fazendo exames imunohematológicos do sangue, conservando hemocomponentes e hemoderivados; realizando estudos pré-transfusionais dos pacientes antes da transfusão e de fenotipagem. Na ocasião das medidas realizadas, as amostras que já haviam sido analisadas laboratorialmente foram cedidas para esta pesquisa, não comprometendo o trabalho realizado pelo HEMOMAR.

Os dados foram analisados de forma anônima e os resultados apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação dos participantes da pesquisa. Ao final das análises no Microscópio de Força Atômica, estas amostras foram devolvidas ao HEMOMAR para descarte adequado.

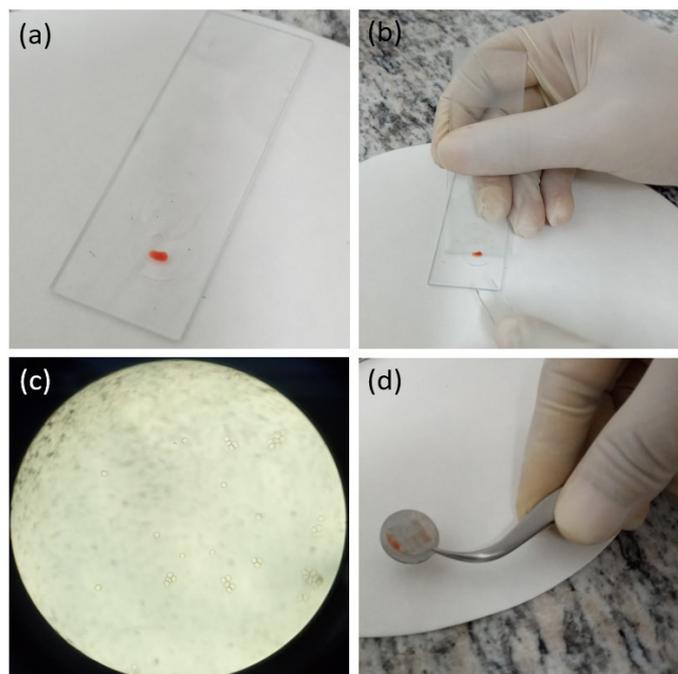
3.2 Preparação das amostras

3.2.1 Preparação de amostra para investigação de membrana externa

Para análise no Microscópio de Força Atômica, uma gota de sangue foi colocada em uma lamínula de vidro de circular, de 13 mm de diâmetro, com ajuda de um capilar de vidro tratado com heparina, conforme a Figura 3.1A . Após este processo, um esfregaço de sangue padrão foi feito nessas lamínulas, como mostrado na Figura 3.1B. Para verificar se as células estavam dispostas de forma isolada, as lâminas foram analisadas previamente em um Microscópio Óptico (Figura 3.1C). As lâminas então foram deixadas para secar ao ar na sala com temperatura de 22°C, por cerca de 10 minutos, para fixar as células na superfície da lâmina. Em seguida, as lâminas foram fixadas no porta-amostra do AFM, com o auxílio de fita dupla face, sendo levadas em seguida para a análise no AFM (Figura 3.1D).

Uma observação necessária acerca do procedimento metodológico nesta etapa é que, a fim de observar a influência da camada de plasma nas medidas, fez-se a lavagem das células com PBS para verificar possíveis alterações nos resultados. Conforme será mostrado no Capítulo 4, alterações significativas não foram encontrados. Portanto, a metodologia simplificada foi escolhida por se assemelhar ao procedimento utilizado nos Centros de Hematologia para investigação de tecido sanguíneo por microscopia óptica.

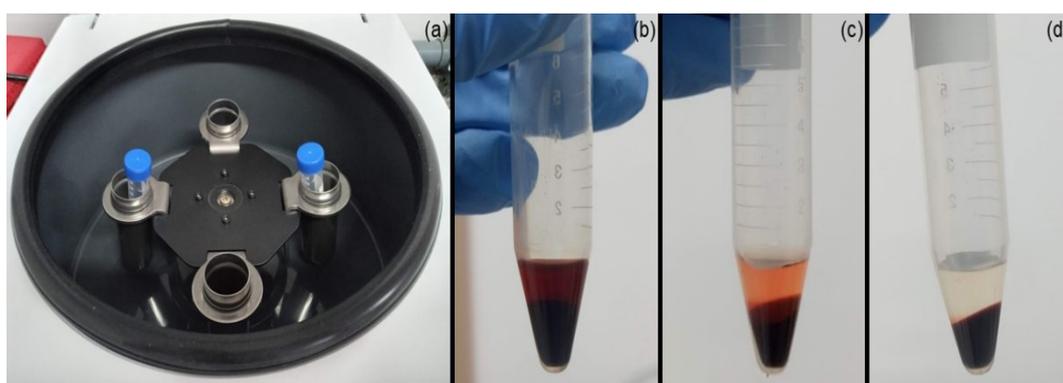
Figura 3.1: Preparação da amostra para as medidas. (a) Gota de sangue na lâmina. (b) Esfregaço do sangue. (c) Verificação do esfregaço no microscópio óptico. (d) Lâmina fixada no porta-amostra do AFM.



3.2.2 Preparação de eritrócitos para investigação da região interna da membrana

Para produzir uma suspensão de eritrócitos, 1 mL de solução tampão fosfatada (PBS) (NaCl ; KCl ; Na_2PO_4 ; KH_2PO_4 e $\text{pH} = 7,4$ a 25°), contendo anticoagulante EDTA 0,2 mM, foi colocado em um tipo Eppendorf e, em seguida, com o auxílio de um capilar de vidro com heparina, um volume de sangue de aproximadamente $20 \mu\text{L}$ foi adicionado ao tubo. A solução do tubo foi centrifugada a 3000 rpm, durante 4 minutos, por 3 vezes, conforme mostra a Figura 3.2A. Após cada centrifugação, o volume de sobrenadante (Figura 3.2B) foi removido e descartado, sendo adicionado um volume idêntico da solução de PBS com EDTA 0,2mM (Figura 3.2C-D), afim de manter o volume do Eppendorf constante.

Figura 3.2: Preparação da amostra para as medidas no ghost eritrocitário. (a) Centrifuga com tubos eppendorf. (b) 1ª centrifugação. (c) 2ª centrifugação. (d) 3ª centrifugação.

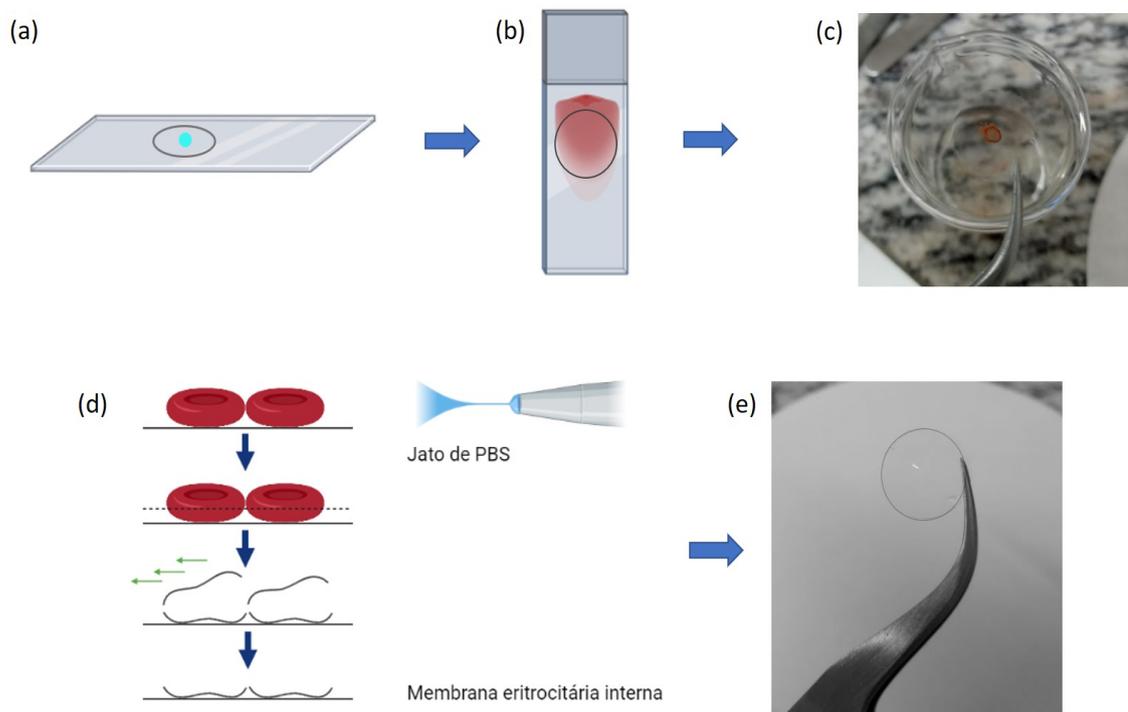


Enquanto isso, uma gota de aproximadamente $10 \mu\text{L}$ de solução de 0,1% v/v poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi depositada sobre uma lâmina de vidro, como ilustrado na Figura 3.3A. Após este processo, a lâmina foi deixada para secar, em ambiente livre de contaminação. Após a secagem da poli-L-lisina, uma gota da suspensão de eritrócitos foi depositada sobre a lamínula e fez-se o esfregaço no sangue, sendo deixado para secar por 15 minutos (Figura 3.3B). Após esse tempo, o excesso de células foi retirado com uma lavagem em PBS (Figura 3.3C) e, em seguida, a lâmina foi submetida a um jato de PBS na horizontal para que a parte superior das células fossem extraídas (Figura 3.3D) ^[112]. Dessa forma, a parte inferior, presa na poli-L-lisina, fica aderida na lâmina (Figura 3.3D). Após esse processo, uma lavagem da lâmina foi realizada, em solução de baixa salinidade NaPi 0,3 mM com EDTA 0,2 mM, com pH de 7,4, para remover resquícios de hemoglobina, sais e outros constituintes citoplasmáticos. O excesso de líquido sobre a lamínula foi retirado com auxílio de papel filtro. Como resultado, obtém-se uma lamínula com coloração levemente avermelhada, como mostrado na Figura 3.3E.

Esse procedimento produz fragmentos membranares, chamados na literatura de *ghost*, com a face citoplasmática exposta, aderidos à lamínula de vidro.

Destaca-se aqui que foram realizados testes com este procedimento, porém sem esfregação da gota de sangue. Essa metodologia não se mostrou eficaz pois haviam muitos aglomerados de fragmentos celulares e sais, impossibilitando encontrar boas áreas de varredura no AFM que contivessem de membranas isoladas.

Figura 3.3: Exposição da membrana eritrocitária interna. (a) Gota de poli-L-lisina na lâmina. (b) Esfregação do sangue. (c) Lâmina lavada. (d) Jato de PBS nas células. (e) Lâmina com *ghost* eritrocitário.



3.3 Experimentos de Microscopia de Força Atômica

3.3.1 Parâmetros de varredura

As lâminas foram analisadas no microscópio *Multimode 8* ((*Bruker*, Santa Bárbara, CA, EUA) (Figura 3.4), utilizando sondas de silício de raio nominal de 2 nm, com constante de mola nominal de 0,4 N/m; no entanto, a constante de mola real foi calibrada usando o método de ruído térmico^[113]. O modo de varredura empregado foi o *Peak Force Tapping Quantitative Nanomechanics* (QNM), que permitiu a aquisição, além dos mapas topográficos, de informações nanomecânicas das amostras estudadas. As medidas foram realizadas em ar (temperatura de

23°C e 44% de umidade), com resolução de 256 pixels e frequência de varredura de 0,5 Hz.

Varreduras de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ foram realizadas para a análise da membrana externa, de modo a obter-se unicamente uma célula por varredura. Para a análise da face interna da membrana eritrocitária, varreduras de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ foram realizadas, de forma a obter uma varredura compreendendo somente a membrana celular. Uma estatística robusta foi utilizada nessa pesquisa, com 65.536 curvas de força obtidas para cada mapa, medindo 10 células de cada tipo e um total de aproximadamente três indivíduos para cada grupo de hemoglobina em estudo.

Para geração dos mapas e análise dos dados quantitativos de rugosidade e propriedades nanomecânicas, foram utilizados os softwares Nanoscope Analyses 2.0, Gwyddion 2.57 e Mountains Software, cortesia da Digital Surf.

Figura 3.4: Microscópio de Força Atômica Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA) localizado no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas da UFMA.



3.3.2 Análises Ultraestruturais

Nos dados do AFM, o estudo estatístico da rugosidade foi realizado com base na altura de cada pixel da imagem (em nosso caso 65.536 pixels), analisada a partir do mapa de altura. O parâmetro R_q , descrito no Capítulo 2, foi empregado para o cálculo da rugosidade nesta etapa. Para evitar alterações nos valores reais, nenhum pré-tratamento da imagem foi realizado nos

mapas antes do cálculo deste parâmetro. Conforme mencionado, o tamanho da varredura foi padronizado. Porém, como as células de diferentes hemoglobinopatias apresentavam tamanhos diferentes, optou-se por uma área de $3,5 \mu\text{m}^2$ no centro de cada célula, tamanho mínimo comum para todas as amostras que evitam bordas celulares para que a rugosidade fosse calculada.

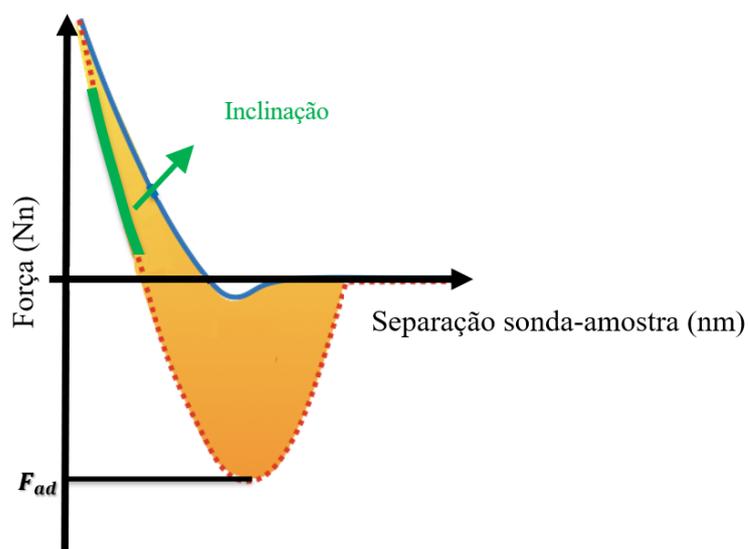
Para obtenção dos dados de área e volume, foram utilizadas as ferramentas do *software Mountains SPIP*. A área da superfície foi calculada por triangulação simples da superfície celular que foi selecionada. O volume foi calculado como a integral da altura da superfície sobre a área da célula mascarada.

3.3.3 Análises Nanomecânicas

Como mencionado no Capítulo 2, as curvas de força obtidas a partir de medições com AFM carregam muitas informações sobre a natureza física da superfície da amostra. A Figura 3.5 mostra um ciclo de aproximação (linha azul) e retração (linha pontilhada vermelha) de uma sonda AFM da superfície de uma amostra. Cada parte da curva carrega uma informação específica e, para acessá-la, são empregados modelos matemáticos específicos citados neste trabalho.

Os dados de dureza celular foram calculados a partir de cada uma das curvas de força obtidas em todas as amostras em estudo, a partir da região de inclinação destacada em verde na Figura 3.5, de acordo com os conceitos apresentados no Capítulo 2.

Figura 3.5: Curva de força mostrando as regiões de força a partir das quais cada uma das propriedades nanomecânicas foram calculada.



Foram considerados os valores de declividade na porção de contato das curvas de aproximação, em intervalos que compreendiam de 30-70% dos valores de deflexão da curva de força

após o ponto de contato da ponta com a amostra.

Para o cálculo das forças de adesão entre a sonda e a superfície da amostra, foram considerados os valores de força mais negativo (resistência do cantiléver de retrain a partir da superfície da amostra), obtidos a partir da curva de retração (região de forças negativas), indicado na Figura 3.5 como F_{ad} .

No próximo capítulo, serão apresentados os resultados obtidos a partir dessa metodologia descrita e as discussões acerca desses resultados.

4. Resultados e Discussões

Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros físicos analisados.

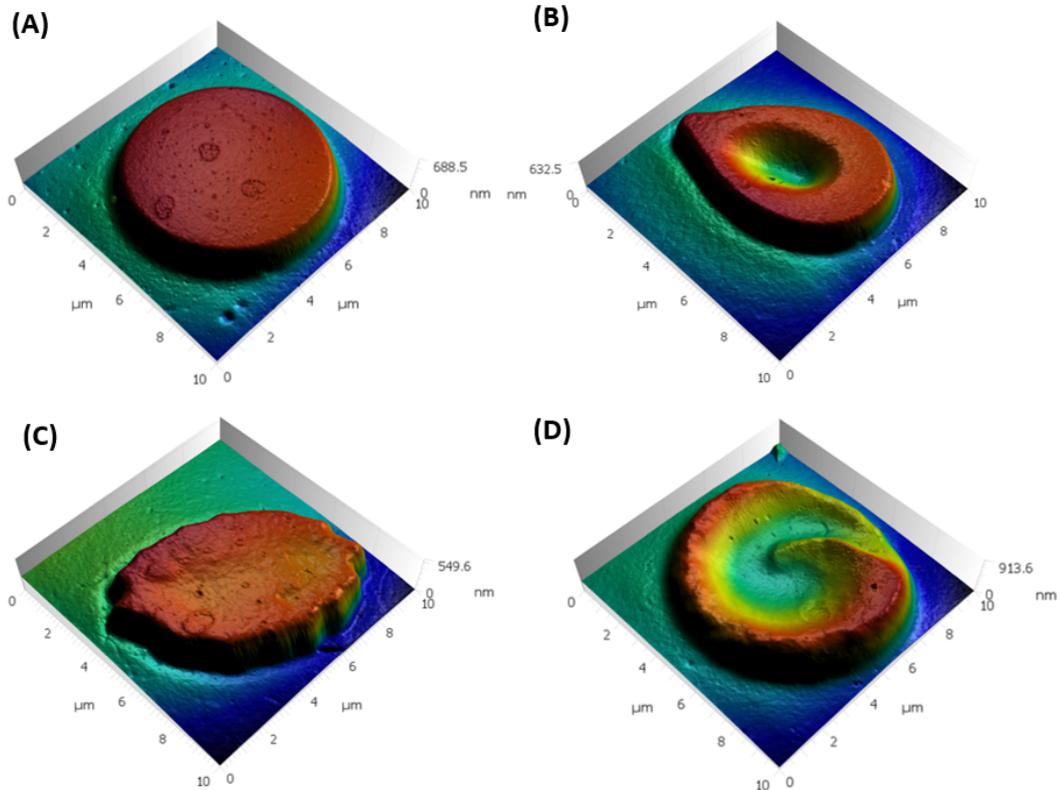
4.1 Análise das propriedades ultraestruturais da face externa da membrana eritrocitária

A Figura 4.1 apresenta mapas topográficos tridimensionais de eritrócitos com morfologias diversas, de acordo com a hemoglobinopatia a eles associada. Na Figura 4.1 (A), tem-se a imagem de eritrócito da amostra controle (AA), enquanto na Figura 4.1 (B) é possível observar um eritrócito em forma de lágrima, ou dacriócito, proveniente de uma amostra de hemoglobinopatia de β -talassemia. Na Figura 4.1 (C), observa-se um eritrócito, com formato alongado, proveniente de amostra de HbS. Na mesma imagem, é observada a presença de espículas nas bordas da célula, denominadas equinócitos. Na Figura 4.1 (D) tem-se um eritrócito "em alvo" (denominado codócito), proveniente de uma amostra de HbS.

Apesar das doenças aqui estudadas serem caracterizadas por promoverem alterações na estrutura dos eritrócitos a elas associadas, neste estudo as análises dos eritrócitos associados a cada amostra investigada deu-se unicamente em células morfologicamente inalteradas. Esta proposta buscou acessar precocemente possíveis alterações em suas propriedades físicas e ultraestruturais. Assim, todos os resultados aqui discutidos vêm de células normais do ponto de vista morfológico. Imagens topográficas do AFM são comparadas para análise qualitativa. No entanto, esta técnica fornece uma descrição quantitativa de vários parâmetros, incluindo rugosidade da superfície.

De acordo com Girasole e colaboradores ^[22], em condições adequadas e bem definidas, a rugosidade superficial, pode ser preciosa na avaliação quantitativa da morfologia de uma membrana biológica, com aplicações, por exemplo, no estudo da estrutura e função celular. A

Figura 4.1: Perfil de células com morfologia alterada. (A) Eritrócito saudável. (B) Eritrócito em forma de lágrima (dacriócito). (C) Eritrócito com a membrana irregular apresentando espículas nas bordas (equinócito). (D) Eritrócito em alvo (codócito).

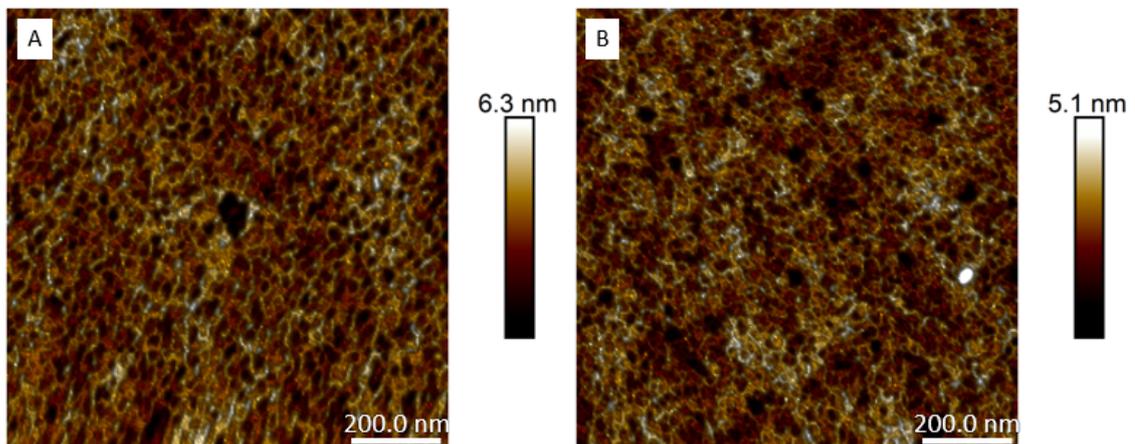


rugosidade da superfície desempenha um papel relevante na interação célula-célula, bem como na interação célula-microvasos no fluxo sanguíneo. Além disso, a organização das asperezas da membrana na face citoplasmática está diretamente relacionada aos elementos do citoesqueleto^[114]. No entanto, células estressadas podem promover alterações de membrana, o que pode ser um sinal preditivo e precoce de disfunção celular^[115]. Dentre as alterações de membrana, destacam-se o rearranjo mais comum das proteínas espectrina-actina (componentes do citoesqueleto celular), diminuição das glicoproteínas e aceleração do processo de apoptose.

No processo simplificado usado para a isolamento das amostras, que foi o esfregaço do sangue total, os eritrócitos investigados estão parcialmente imersos em um filme de plasma sanguíneo. Para compreender possíveis contribuições do plasma nos valores de rugosidade, foram analisadas amostras submetidas a um processo de remoção do plasma, como descrito no Capítulo 3. A Figura 4.2 mostra imagens de $1 \times 1 \mu\text{m}$ obtidas a partir da região central de uma célula analisada após processo de remoção do plasma (Figura 4.2 (A)) e em uma célula analisada a partir do esfregaço do sangue total (Figura 4.2 (B)). As alterações na ultraestrutura das membra-

nas não apresentaram influência significativa, especialmente nos valores de rugosidade, devido a presença do plasma. Para a célula mostrada na Figura 4.2 (A), o valor de rugosidade média quadrática R_q é de 0,761 nm (rugosidade com valor em escala molecular). Para a célula não lavada (Figura 4.2 (B)), o valor de R_q é de 0,721 nm. Além de mais complexo e demorado, por haver necessidade de diversas lavagens para remoção completa do plasma, o processo de lavagem, que envolve sucessivas centrifugações, promove danos na membrana celular, resultando no aparecimento de alterações estruturais do tipo equinócitos ¹. Desta forma, concluiu-se que a metodologia empregada a partir do esfregaço do sangue total é eficiente e, portanto, esse método simplificado foi escolhido nesse estudo.

Figura 4.2: Membrana de eritrócitos (A) observada por esfregaço de sangue total e (B) observada após processo de lavagem por centrifugação.

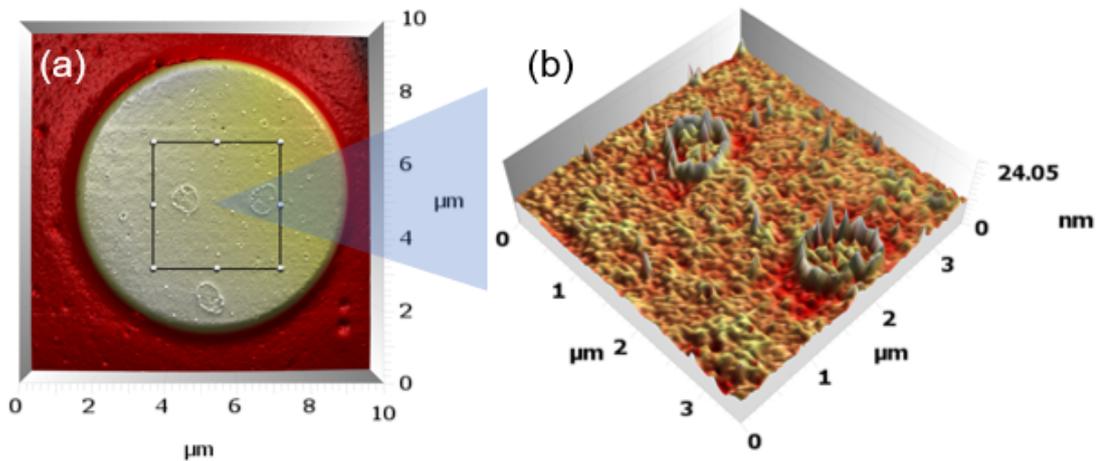


A Figura 4.3 (A) mostra a vista superior de uma célula íntegra em uma varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. A Figura 4.3 (B) mostra uma imagem tridimensional de uma região de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. Na Figura 4.3 (B) observam-se algumas estruturas de diâmetros nanométricos, com dimensões na escala z também da ordem de nanômetros. Como mostrado no Capítulo 2, a membrana celular é formada por proteínas, lipídeos e glicoproteínas, estruturas cujas dimensões são desta ordem de grandeza. Desta forma, as características associadas com a altura das estruturas, como a rugosidade de superfície, nesse nível de resolução, podem quantificar alterações dos componentes da membrana.

A Figura 4.4 mostra os resultados da rugosidade, com respectivos erros padrão para a face externa da célula, para amostras de controle (AA) e de células com diferentes tipos de hemoglobinopatias associadas a hemoglobina HbS (AS, SC, SF, SS), além de β -talassemia. O

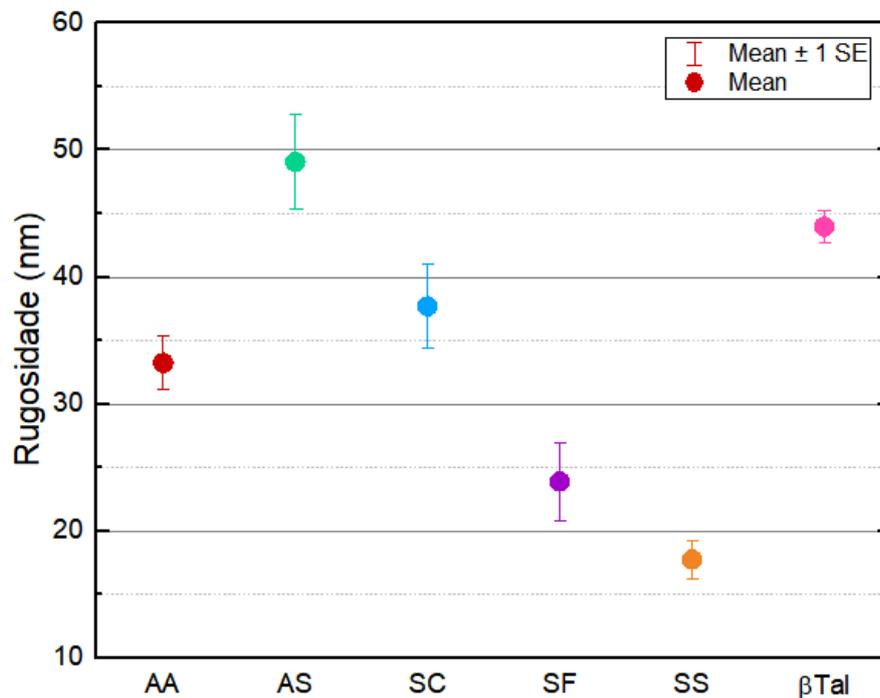
¹Echinócito (da palavra grega echinos, que significa 'ouriço' ou 'ouriço do mar'), na biologia e na medicina humanas, refere-se a um tipo de glóbulo vermelho que possui uma membrana celular anormal caracterizada por muitas projeções espinhosas pequenas e uniformemente espaçadas.

Figura 4.3: Ultraestrutura da membrana celular. (A) Área celular de $10 \mu\text{m}^2$. (B) Mapa com zoom de $1 \mu\text{m}^2$ sobre a região central da célula.



valor médio da rugosidade foi calculado tomando-se uma área de $3,5 \mu\text{m}^2$ na região central de todas as células.

Figura 4.4: Rugosidade da membrana. Gráfico dos valores médios da rugosidade com os respectivos erros-padrões.



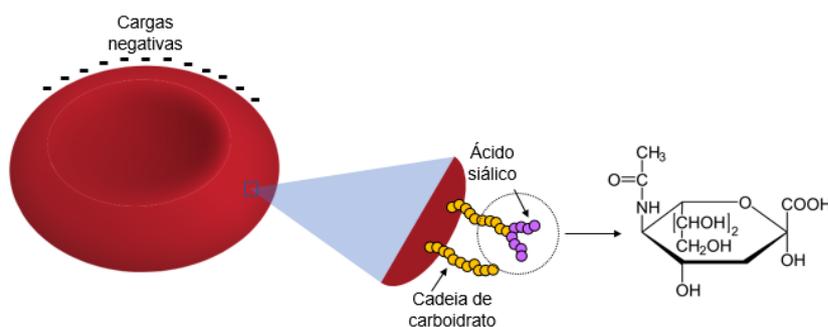
Os valores de R_q para as amostras AA, AS, SC, SF, SS e β -Tal são, respectivamente, $33,3 \pm 9,6$ nm, $49,1 \pm 11,7$ nm, $37,7 \pm 10,5$, $23,9 \pm 9,7$ nm, $17,7 \pm 7,6$ nm e $43,8 \pm 3,9$ nm. Uma clara tendência linear de redução da rugosidade é observada para as células que possuem HbS, a partir do traço falciforme (AS) para a forma mais agressiva da doença (SS).

Observando as alterações da superfície celular em casos de anemias hemolíticas, alguns

aspectos podem ser destacados. A hemoglobina parcialmente oxigenada, especialmente se for instável, é responsável pela maioria das espécies reativas de oxigênio geradas na membrana de eritrócitos. Essas espécies podem facilmente oxidar lipídios e proteínas de membrana [116]. As alterações funcionais do eritrócito de indivíduos com anemia falciforme e talassemia, levam a uma variedade de alterações na membrana quanto à estrutura e função. As células tentam manter a composição lipídica normal e reparar ou renovar os lipídios oxidados, particularmente os ácidos graxos, durante períodos de estresse oxidativo. O processo de renovação e reparação dos lipídios é essencial para a sobrevivência dos eritrócitos. Além disso, as mudanças na estrutura e função dos componentes da membrana também são causadas pela precipitação direta de hemoglobina desnaturada ou cadeias de globina [117-120].

O ácido siálico tem sido um fator crucial durante a análise da membrana dos glóbulos vermelhos, especialmente para a rugosidade. Conforme relatado por Rizvi [121], Os eritrócitos têm uma carga superficial negativa líquida e essa carga se deve ao ácido siálico ionizado. A Figura 4.5 ilustra a membrana eritrocitária carregada negativamente devido ao carboidrato ácido siálico, que se encontra na parte mais externa da membrana celular. A figura também mostra o grupo químico desse componente da membrana.

Figura 4.5: Membrana eritrocitária com cargas negativas e ácido siálico em sua superfície (também representada por seu grupo químico).



Normalmente, os eritrócitos na anemia falciforme têm alterações de ácido siálico em sua superfície [122], exibindo uma distribuição desigual em relação às células saudáveis [123]. Comparando a rugosidade em células saudáveis (AA) e células obtidas de indivíduos com SS e SF, é possível observar uma diminuição da rugosidade nas amostras de SS e SF. Uma razão para a assimetria da presença ácido siálico são as diferenças na idade dos eritrócitos circulantes. Os eritrócitos envelhecidos demonstram uma diminuição do ácido siálico na membrana (10% - 30%). Essa redução pode chegar a 50% em algumas anemias hemolíticas [124]. No nosso caso, como

as células doentes não apresentaram morfologia global alterada, as alterações na rugosidade da superfície possivelmente estão relacionadas às próprias patologias para as amostras de hemoglobinopatias.

A possível redução da rugosidade pode ser explicada pela perda de componentes da membrana, principalmente ácido siálico, e glicoproteínas, causada pelas alterações da doença nas membranas celulares. Além disso, de acordo com Hebbel ^[125], a bicamada lipídica normalmente é disposta assimetricamente, com 75% a 80% dos fosfolipídeos (PL) contendo colina (fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline), que são encontrados na monocamada externa. Este estado de assimetria é mantido por estabilização passiva de PL, que envolve a interação de fosfatidilserina (PS) com espectrina e banda 4.1, e uma atividade de translocação de PL dependente de ATP. O PL pode trafegar entre as monocamadas, de modo que a desestabilização do PL pode assumir a forma de maior mobilidade transmembrana da bicamada, promovendo a perda de assimetria, resultando em diminuição da rugosidade da membrana. Mesmo para formas celulares preservadas, os resultados de rugosidade sugerem que a membrana celular possivelmente apresenta essas alterações que estão associadas principalmente ao processo de falcização.

Ao comparar o valor médio de rugosidade entre as amostras de SS e SF, é possível observar uma redução mais significativa desse parâmetro para a forma mais grave de anemia falciforme (SS). Nesse sentido, associamos esse resultado às características atenuantes da HbF na doença falciforme, possivelmente evitando alterações nos componentes da membrana e na disposição desses componentes ^[1].

O modelo mais aceito para estrutura dos componentes da membrana é chamado de *mosaico fluido*, proposto por Singer e Nicolson ^[126]. No referido modelo, proteínas e glicoproteínas estão inseridas em um “mar” de lipídeos (bicamada lipídica). Pequenas modificações nessa estrutura, em sua cinética ou em suas propriedades elásticas, podem afetar drasticamente a estabilidade e a viabilidade das células ^[127]. Para a amostra AS, observa-se uma alteração no valor de R_q quando comparado com os valores obtidos para as amostras AA. A possível explicação para essa diferença é a reorganização dos componentes da membrana resultante do processo oxidativo, promovida pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, causando regiões de maior densidade. Outra possibilidade para a alteração da rugosidade é o aumento de receptores e canais protéicos na membrana celular, possivelmente relacionado a um mecanismo compensatório para os efeitos da HbS promovidos pela HbA.

O aumento da rugosidade também foi observado nas amostras de SC. É importante en-

fatizar que, embora a doença SC seja uma das doenças genéticas significativas mais típicas em todo o mundo, ela é negligenciada, com poucos laboratórios ou estudos clínicos abordando esta doença [128]. Na maioria dos casos, a doença SC é clinicamente mais leve do que a SS, e as complicações da anemia falciforme geralmente ocorrem com menos frequência neste caso [129]. O aumento da rugosidade da membrana em SC pode estar associado a um aumento nos canais ou receptores de membrana. Nagel e colaboradores [129] discutiram que as células com HbC expressaram mais componentes de membrana que aceleram a cristalização de HbC. Além disso, uma característica marcante das células com este tipo de hemoglobina é a desidratação e, conseqüentemente, redução no volume celular e alta concentração de hemoglobina corpuscular [130]. Nesse sentido, o aumento da rugosidade da membrana também pode estar associado ao aumento do número de canais de membrana, tornando o efluxo de células SC mais intenso.

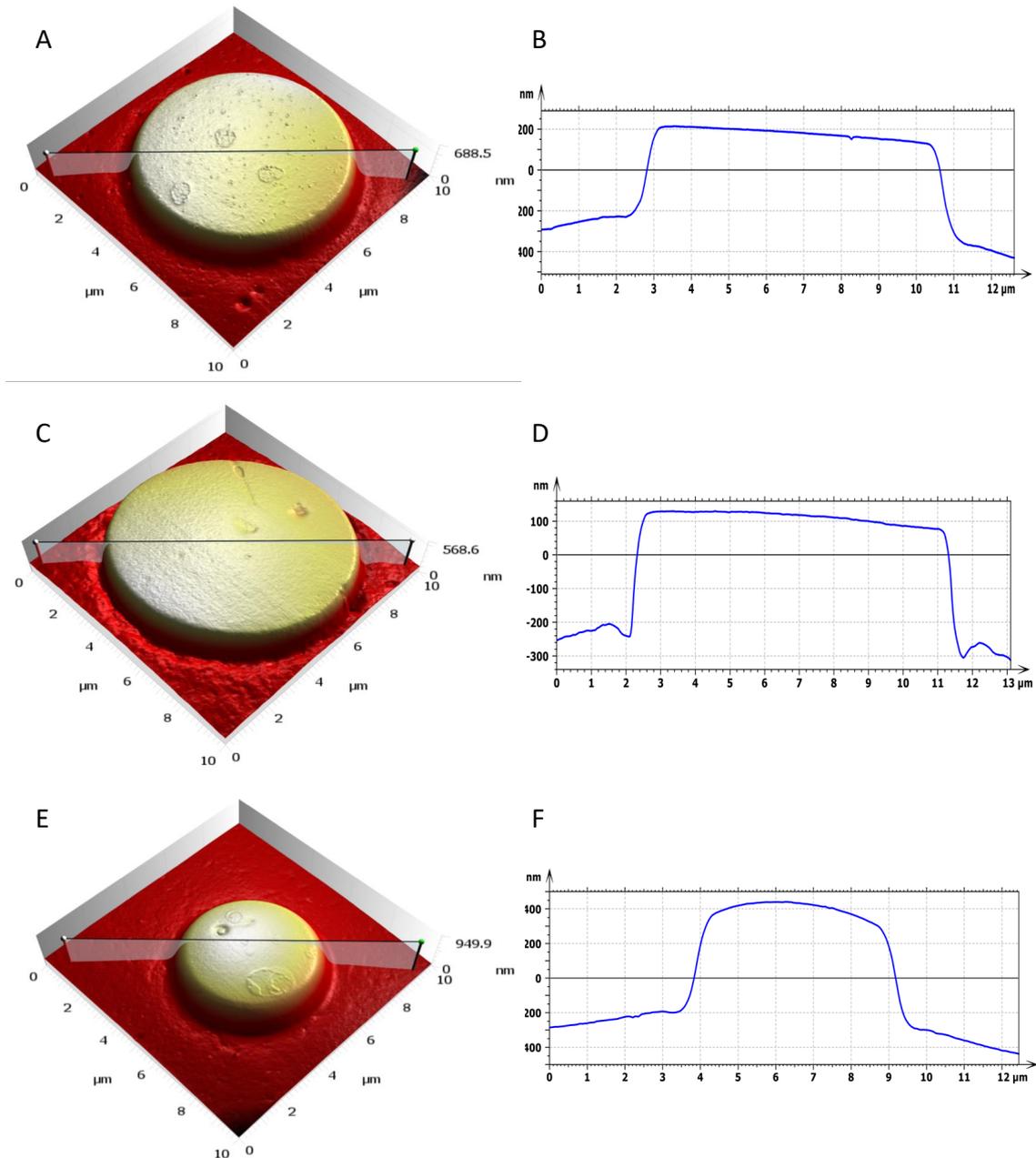
Por fim, no caso das amostras de β -tal, observou-se aumento dos valores de rugosidade em relação ao grupo controle. Urbinati e colaboradores [131] descrevem alterações na membrana dessas células, como aumento de fosfolipídios e colesterol. Alterações nesses componentes estão associadas à fluidez e permeabilidade da membrana, promovendo o acondicionamento de seus componentes [132], resultando em maior aspereza. Oliviero e colaboradores [130] também apontaram que o aumento da permeabilidade dessas células pode ser decorrente do dano oxidativo à membrana decorrente do excesso de cadeias α livres. Este processo oxidativo também pode estar relacionado a alterações na rugosidade da membrana.

Mesmo com o formato preservado, devido à alta resolução das imagens de AFM, alterações nas dimensões das células são observadas, principalmente na amostra de SS, apresentando diâmetros maiores (9,5 μm) do que as células saudáveis. Controversamente, em células de β -tal, as células apresentaram diâmetros menores (6,0 μm).

A Figura 4.6 mostra exemplos representativos dessas observações. De maneira geral, as alterações no tamanho das hemácias são referidas como anisocitose (microcitose e macrocitose). Na Figura 4.6 (A) temos uma célula controle que possui tamanho dentro do padrão, de 8,2 μm de diâmetro. Em comparação, a Figura 4.6 (B) mostra uma célula de anemia falciforme exibindo macrocitose, com diâmetro de 9,8 μm , enquanto na Figura 4.6 (C) é possível ver uma célula de β -talassemia com microcitose com diâmetro de 6,0 μm .

Como apontado por Benedetto e colaboradores [127], pequenas modificações na estrutura celular podem afetar drasticamente no desempenho de suas funções, sua estabilidade e viabilidade. As mudanças observadas nas dimensões das células motivaram um estudo mais detalhado

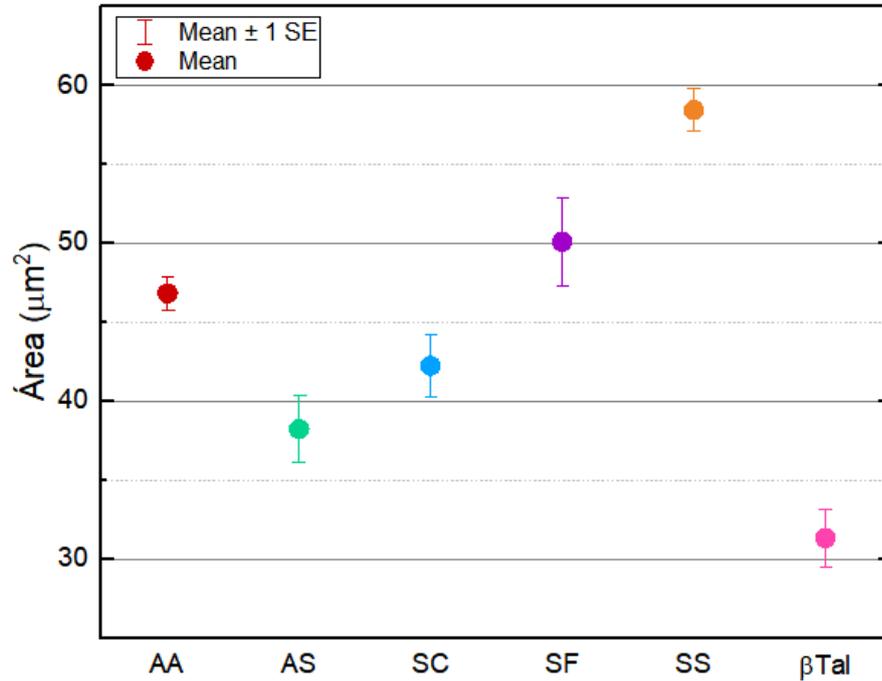
Figura 4.6: Diferentes dimensões celulares. (A) Célula de amostra controle e (B) seção transversão mostrando seu perfil; (C) célula de anemia falciforme com maior dimensão e (D) seu respectivo perfil e (E) Célula de β -talassemia e (F) seu respectivo perfil.



de parâmetros como área e volume celular. A habilidade de avaliar o volume de estruturas micrométricas é uma das vantagens da técnica de AFM. Os resultados de área dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas são exibidos na Figura 4.7.

Os valores médios da área das amostras AA, AS, SC, SF, SS e β -tal são, respectivamente, $46,9 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$, $38,3 \pm 6,8 \mu\text{m}^2$, $42,3 \pm 6,2 \mu\text{m}^2$, $50,1 \pm 8,9 \mu\text{m}^2$, $58,4 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$ e $31,4 \pm 5,9 \mu\text{m}^2$. É possível observar uma tendência linear de crescimento da área superficial entre células que contém a HbS, do caso mais ameno (traço falcêmico -AS) para a manifestação mais

Figura 4.7: Gráfico do parâmetro geométrico de área dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.



severa das doenças promovidas pela presença desse tipo de hemoglobina (SS). Comparando cada amostra com o grupo controle, observamos um padrão similar aos encontrados para os dados de rugosidade: as amostras AS e SC apresentam tendências opostas às amostras SF e SS. Enquanto as amostras de AS e SC diminuem sua área superficial com relação às amostras de AA, as de SF e SS aumentam essa área.

De acordo com Degiorgio e colaboradores ^[133], a forma como as membranas se estruturam (empacotamento) depende de parâmetros como a área, volume e comprimento das cadeias hidrofílicas, de acordo com a equação:

$$p = \frac{v}{a_0 l_c}, \quad (4.1)$$

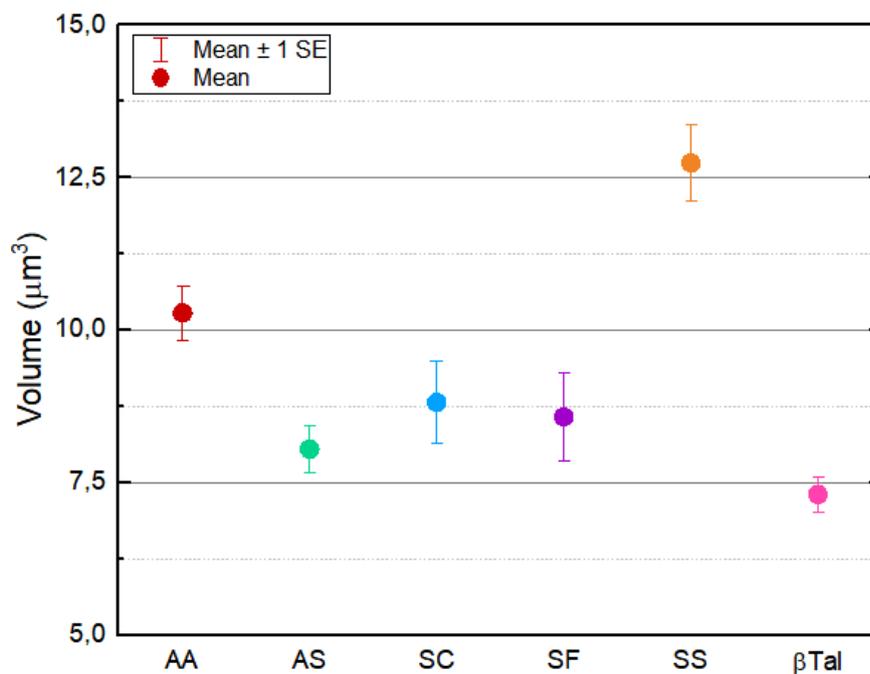
onde p é o parâmetro que define o formato na membrana, a_0 a área superficial, v é o volume e l_c o comprimento efetivo das cadeias hidrofílicas que compõem a membrana. Além disso, as mudanças na composição da membrana e no arranjo dos componentes da membrana estão relacionadas a mudanças na área de superfície da célula.

Conforme explicado, o aumento da rugosidade das amostras de AS e SC pode ser parcialmente explicado pela reorganização dos componentes da membrana, resultante do processo oxidativo promovido pelo aumento das espécies reativas de oxigênio, levando a regiões de maior

densidade dos componentes da membrana^[132]. Partes da membrana celular com uma densidade maior de componentes da membrana reduzem a maleabilidade, a forma e a fluidez das células^[127]. Esse fato pode explicar a redução da área de superfície celular. Para células SF e SS em alterações morfológicas iniciais, o aumento da área de superfície pode estar associado a um mecanismo da membrana celular para aumentar a captação de oxigênio, uma vez que suas funções estariam comprometidas^[134]. Esse mecanismo não é novo. Em outras situações, como viver em grandes altitudes, onde o oxigênio é reduzido, o organismo sofre modificações fisiológicas, alterando as propriedades dos eritrócitos, promovendo aumento do hematócrito e da massa celular^[134]. Esses resultados sugerem que as alterações nos eritrócitos das hemoglobinopatias HbS vão além da polimerização ou cristalização de sua hemoglobina em estágios avançados do ciclo de vida celular, indicando alterações intrínsecas em suas propriedades de membrana.

Os resultados de volume dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas são exibidos na Figura 4.8, apresentando valores médios de: $10,3 \pm 1,9 \mu\text{m}^3$ para o grupo AA, $8,0 \pm 1,2 \mu\text{m}^3$ para AS, $8,8 \pm 2,1 \mu\text{m}^3$ para SC, $8,6 \pm 2,3 \mu\text{m}^3$ para SF, $12,7 \pm 1,9 \mu\text{m}^3$ para SS e $7,3 \pm 0,9 \mu\text{m}^3$ para β -tal.

Figura 4.8: Gráfico do parâmetro geométrico de volume dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.



Vários eventos de patogênese são de grande relevância, sendo que as alterações do volume celular são fundamentais na investigação da evolução das anemias hemolíticas. Para os resultados de volume celular, observando os valores médios de volume para as amostras de

AS, SC e SF, é notado uma redução em comparação com o grupo AA, mesmo para células de forma preservada. Embora os indivíduos com AS sejam considerados assintomáticos, a redução do volume celular esclarece o papel da HbS nos eritrócitos. O aumento da permeabilidade da membrana de eritrócitos contendo HbS contribui para a patogênese da anemia falciforme, promovendo a entrada de Ca^{2+} , perda osmótica de KCl e água e, portanto, desidratação da célula [128]. Este fato também explica a redução do volume celular para o grupo SF. Em relação aos dados anteriores, a diminuição da rugosidade média para as células SF sugere uma diminuição dos componentes da membrana, como as glicoproteínas [127], lipídios [131] e carboidratos [122].

Em células SC, a perda de K^+ e a desidratação são marcadamente pronunciadas, com uma alta concentração de hemoglobina corpuscular média [135]. Hannemann e colaboradores destacaram a importância de um entendimento completo dos mecanismos que regulam o volume celular, especialmente nas anemias hemolíticas, enfatizando que os mecanismos envolvidos na regulação do volume ainda são incertos [128].

Para SS, curiosamente, as tendências são opostas, quando comparamos com a amostra controle. Em células SS, três vias foram propostas: o cotransportador KCl (KCC), a condutância catiônica induzida por desoxigenação e o canal de K^+ ativado por Ca^{2+} (canal de Gardos) [136]. KCC é mais ativo e regulado de forma anormal nas células de SS. Para células AA, o inchaço celular é um mecanismo essencial da atividade KCC e, no entanto, para células SS, o pH intracelular é o fator mais relevante [128]. A condutância catiônica induzida pela desoxigenação é possivelmente exclusiva para células HbS e é ativada, entre outros fatos, pela polimerização de HbS. Como este efeito é ativado, a entrada de Ca^{2+} aumenta e há perda de Mg^{2+} . O Ca^{2+} elevado na mídia intracelular ativa o canal de Gardos que promove a desidratação celular. Portanto, como as células investigadas tinham sua forma preservada, para as células SS antes do já conhecido processo de desidratação celular, nos estágios iniciais da célula no fluxo sanguíneo, a deficiência de KCC possivelmente leva a um inchaço celular, não regulamentado como com as células AA. Posteriormente, à medida que o processo de polimerização avança, provavelmente os seguintes mecanismos são ativados, como o canal de Gardos, promovendo a conhecida desidratação das células SS.

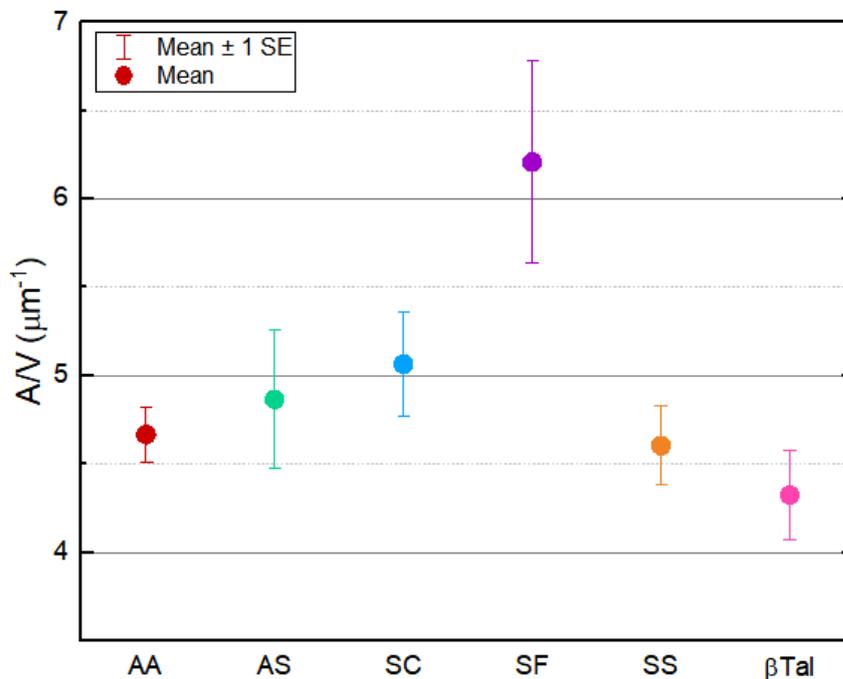
Para as amostras de β -tal, a redução da área superficial e do volume pode ser explicada pelo fato de que o conteúdo interno das células é afetado pela deficiência na produção das cadeias de globina. A hemoglobinizacão deficiente dos eritrócitos resulta em hipocromia e microcitose, anormalidades características deste grupo de doenças [131], mesmo para células com

forma preservada. Schrier ^[137] descreve que um grau modesto de desidratação celular resulta em um aumento relativamente pequeno na concentração média de hemoglobina corpuscular que pode aumentar substancialmente a viscosidade celular interna e diminuir sua deformabilidade.

A forma bicôncava do eritrócito resulta em uma importante relação: a razão área/volume (A/V). Este parâmetro, relacionado à deformabilidade global e estabilidade mecânica da membrana, permite que a célula realize as deformações necessárias para circular na corrente sanguínea ^[138]. É importante destacar ainda que a redução da razão A/V está associada com a diminuição da deformabilidade celular, função eritrocitária comprometida, fragilidade osmótica e diminuição de sua vida celular, sendo o caso de diversas patologias, como as anemias hemolíticas, septicemia e diabetes mellitus ^[110].

Diante disso, a razão A/V dos eritrócitos foi estudada e os resultados são mostrados na Figura 4.9. Os valores médios da razão A/V para as amostras AA, AS, SC, SF, SS e β -talassemia são, respectivamente, $4,7 \pm 0,7 \mu\text{m}^{-1}$, $4,9 \pm 1,2 \mu\text{m}^{-1}$, $5,1 \pm 0,9 \mu\text{m}^{-1}$, $6,2 \pm 1,8 \mu\text{m}^{-1}$, $4,6 \pm 0,7 \mu\text{m}^{-1}$ e $4,3 \pm 0,8 \mu\text{m}^{-1}$.

Figura 4.9: Gráfico da razão área/volume dos eritrócitos das hemoglobinopatias estudadas.



Os resultados da razão A/V para as amostras AS, SC e SF podem ser compreendidos quando se observa que todas essas amostras possuem hemoglobinas que minimizam as consequências da polimerização da hemoglobina. O aumento da razão A/V dessas amostras, em comparação com o grupo AA, sugere a maior deformabilidade dessas células nesta fase de vida.

Esse fato é uma possível consequência da presença das hemoglobinas HbA, HbS e HbF que, nessa fase da vida celular, podem fornecer um mecanismo compensatório para as complicações das patologias, como a perda da deformabilidade. Na ausência de cadeias poliméricas de hemoglobina, a presença dessas hemoglobinas leva a uma maior deformabilidade das células em comparação com aquelas com HbA em estágio inicial. Aqui, destaca-se o valor encontrado para o grupo SF, com maior deformabilidade precoce entre todos os grupos^[7]. Essa característica da HbF pode fazer com que a deformação celular seja maior nos estágios iniciais da vida celular, antecipando o futuro enrijecimento celular.

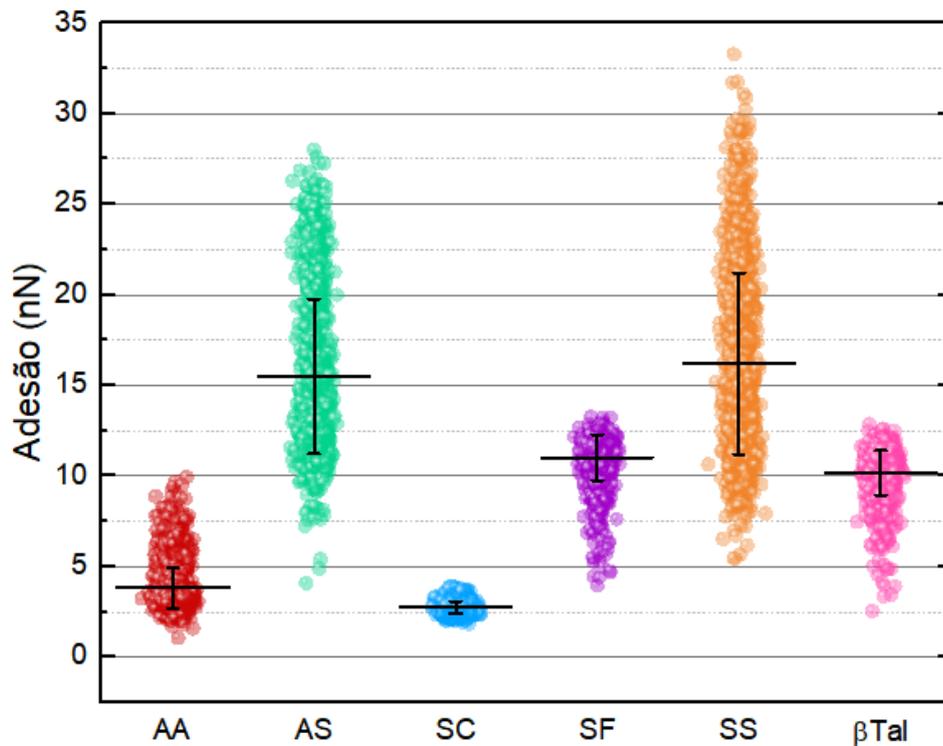
Embora as células estudadas aqui não apresentassem alterações em sua morfologia, o que significa que elas estão no início de sua vida celular, os resultados mostram uma tendência de diminuição na razão A/V para as amostras SS e β -tal. De acordo com Mokken e colaboradores^[110], é sabido que a razão A/V para estas células diminui. No entanto, a diminuição relatada pela literatura está associada com a formação de cadeias polimérica (SS) e precipitados de cadeias α , (β - tal). Porém, outros mecanismos de alteração de propriedades físicas, como a deformabilidade, são apontados, indo além das alterações nas moléculas de hemoglobina^[139]. Os resultados sugerem que alterações nos componentes e arranjo da membrana também contribuem para mudanças nas propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos. Ressalta-se também que as análises das células, mesmo com a morfologia preservada, mostram redução da relação A/V para as amostras de SS e β - tal.

4.2 Análise das propriedades físicas da face externa da membrana eritrocitária

Conceitualmente, a adesão é a tendência de partículas ou superfícies diferentes se unirem. É uma propriedade mecânica crucial para explorar o estado de um sistema biofísico. A Figura 4.10 mostra o resultado das forças de adesão entre a superfície das células e a ponta de AFM. Os valores médios de adesão para as amostras AA, AS, SC, SF, SS e β -tal são, respectivamente, $3,9 \pm 1,1$ nN, $15,5 \pm 4,3$ nN, $2,8 \pm 0,3$ nN, $11,0 \pm 1,3$ nN, $16,2 \pm 5,0$ nN e $10,2 \pm 1,2$ nN.

É importante notar que, em medidas de espectroscopia de força via AFM, as forças de adesão são uma combinação das forças eletrostáticas, de van der Waals, capilar e forças promovidas pelas quebras de ligações químicas^[140]. Principalmente em casos de sondas não funcionalizadas (a exemplo desta pesquisa), as forças de adesão são tomadas como interações inespecíficas,

Figura 4.10: Gráfico de adesão para as amostras de hemoglobinopatias estudadas. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.



não sendo possível separar a contribuição de cada uma dessas forças. No entanto, como as sondas utilizadas aqui para analisar todas as amostras são feitas do mesmo material (Si) e possuem as mesmas especificações (modelo, raio de ponta etc.), assim como os experimentos para todas as amostras foram realizados nas mesmas condições (temperatura e umidade do ar), diferenças nas forças de adesão entre as amostras podem significar alterações nas suas propriedades físicas advindas das hemoglobinopatias, indicando alterações na superfície das células.

Cada força que contribui para as medições de adesão será analisada individualmente para entendermos qual tem a influência mais significativa nos resultados. Dessa forma, podemos relacionar os resultados às propriedades físicas das células. Primeiramente, analisando a força de capilaridade (ou menisco), vale ressaltar que a sonda utilizada para as medidas possui geometria cônica, com 2 nanômetros de raio, promovendo um pequeno ângulo de contato e um filme de menisco desprezível entre sonda e amostra. Ainda, segundo Butt e colaboradores^[67], forças de capilaridade são mínimas em condições experimentais de baixa umidade (como feito neste trabalho). Esse fato é corroborado pela não correlação dos dados de rugosidade e adesão. Em geral, amostras mais rugosas tendem a reter uma maior camada de umidade, aumentando as forças adesivas entre a sonda e a amostra. Em nossos resultados, a amostra com menor valor de

rugosidade média quadrática (SS) é aquela que apresenta maior valor médio de forças adesivas.

Considerando a influência das forças eletrostáticas, Butt e colaboradores ^[67] apontam que, especialmente em medidas em ar, contribuições de forças eletrostáticas são esperadas, principalmente em amostras não condutoras e em baixas umidades do ar, quando a dissipação de cargas é inefetiva. Assim, as forças eletrostáticas resultam de um maior ou menor acúmulo de carga na superfície, que está associado a mudanças na composição da membrana ou na disposição dos componentes da membrana.

As forças de ligação química sonda-amostra vêm das interações de pares receptor-ligante devido a sondas funcionalizadas com grupos químicos ou moléculas. Como as sondas utilizadas neste trabalho não sofreram nenhum processo de modificação, não houve contribuição das forças de ligação química nos resultados de adesão.

Com relação a contribuição das forças de van der Waals, elas dependem de parâmetros geométricos da ponta, além de serem diretamente proporcionais à constante de Hamaker, que inclui parâmetros físico-químicos da interação sonda-amostra ^[67]. Essa constante (A_H) é definida por:

$$A_H = \pi^2 C \rho_1 \rho_2, \quad (4.2)$$

onde C é a constante no potencial de interação do par átomo-átomo, ρ_1 e ρ_2 são os números de átomo por unidade de volume. Mudanças nas contribuições das forças de van der Waals só podem ser fornecidas por mudanças no potencial de interação do par sonda-amostra e, neste caso, devem vir da amostra, pois os átomos da sonda são sempre os mesmos para todas as células.

Para medições de AFM realizadas no modo QNM, uma característica marcante é a alta frequência de aquisição da curva de força, possibilitando um mapa com alta resolução de 65536 curvas de força neste trabalho. Esta alta taxa de aquisição de curvas pode induzir eletrificação por atrito com ar nas sondas de Si. Assim, é observado de forma consistente em nossas medições que as amostras conhecidas por terem cargas positivas têm interação de adesão mais significativa com a sonda de AFM neste modo. O oposto é observado para amostras com uma carga negativa líquida ^[141].

Ao comparar a amostra do estudo com o grupo controle, algumas informações interessantes são observadas. Os valores médios de adesão são menores para as amostras do grupo AA quando comparados aos valores médios para hemoglobinopatias, exceto para SC. Embora sua rugosidade seja mais significativa do que as amostras de AA, o grupo SC possui uma ade-

são média inferior que o grupo AA, mesmo com menor dispersão de valores. A mutação HbC substitui um ácido glutâmico de DNA por uma lisina, portanto, há perda líquida de duas cargas negativas. Oliviero e colaboradores apontaram que essas mudanças na carga da proteína podem alterar a forma como as HbS interagem e modulam a função do transportador na membrana do eritrócito^[130]. Como uma única substituição Glu-Val (Hb S) ou Glu-Lis (Hb C) afeta a atividade do sistema de co-transporte de membrana (K^+Cl^-) permanece inexplicado^[130]. Os mecanismos pelos quais a mutação HbS ou HbC induz a atividade do sistema de cotransporte poderiam ser baseados, entre outros fatores, na diferença de carga da membrana causada pela substituição de aminoácidos^[128]. Tokumasu e colaboradores^[120] observaram para células com HbC uma membrana eritrocitária externa carregada negativamente. Essas cargas negativas podem não ser suficientes para alterar a carga líquida da superfície do eritrócito. Eles podem influenciar as distribuições de membrana de outras moléculas portadoras de carga. Para células HbSC morfológicamente preservadas, as cargas positivas do citoplasma da célula podem induzir cargas negativas na membrana externa da célula. Desta forma, as forças de adesão são menos intensas e mais homogêneas.

O aumento da dispersão dos valores de adesão das células do grupo AA pode ser explicado pelo fato de, para este grupo, não podermos garantir que as células sejam novas no fluxo sanguíneo, uma vez que não há alterações no formato das células ao longo Tempo. No entanto, sabe-se que a idade celular influencia vários parâmetros celulares, incluindo a quantidade de ácido siálico presente na membrana.

O grupo AS apresentou alto valor médio de força de adesão com a ponta AFM. Esse resultado sugere que o grupo AS se comporta de forma semelhante ao grupo HbSS para células com forma preservada, oferecendo distribuição de cargas positivas na superfície da membrana. No entanto, os valores de rugosidade da membrana das células no grupo AS sugerem, ao contrário do grupo SS, que esta mudança na carga líquida está associada a mudanças nos componentes da membrana celular. Chauvet e colaboradores apresentaram um estudo proteômico comparando células AA e AS, motivado pela observação da resistência do AS à infecção por *Plasmodium falciparum*^[142]. Em seus trabalhos de proteômica, análises estatísticas foram realizadas para conservar apenas proteínas abundantes em todas as amostras de AS em comparação com todas as amostras de AA. Dentre as proteínas da membrana eritrocitária, cuja quantidade ou intensidade de fosforilação está aumentada no grupo AS em relação ao grupo AA, estão, por exemplo, LPLAT 5, CD38, antígeno Duffy, BCAM, LIN7C, entre outras. Essas descobertas

são especialmente relevantes. Embora os indivíduos com traço falciforme sejam considerados assintomáticos, todos os dados apresentados sugerem que as células AS apresentam alterações que podem revelar mecanismos desencadeadores de eventos biológicos ainda não totalmente esclarecidos. Por exemplo, há relatos de morte súbita e complicações clínicas em indivíduos com AS, como embolia pulmonar e infarto esplênico, principalmente quando expostos a condições extremas de baixa oxigenação^[46].

Os resultados de adesão para a amostra de SF corroboram com resultados de rugosidade que mostram uma redução na rugosidade da membrana dessas células, possivelmente associada à diminuição de componentes da membrana, como o ácido siálico. Esta última observação pode causar a contribuição mais significativa para o aumento da adesão em amostras do grupo SF, uma vez que o ácido siálico é o principal responsável pela carga líquida negativa dos eritrócitos. A diminuição do ácido siálico leva a maiores interações célula-célula e célula-vaso sanguíneo^[37]. A redução desse componente celular modifica a distribuição de carga em sua superfície e as forças envolvidas, alterando as forças de adesão. Ao comparar os resultados de SS com SF, observamos um menor valor médio de adesão para a amostra de SF, provavelmente fornecida pela hemoglobina HbF. A hemoglobina fetal torna-se um agente chave na patologia da anemia falciforme. O medicamento mais utilizado no tratamento de pacientes é a hidroxiureia (HU), que aumenta os níveis de hemoglobina nas células^[7].

O maior resultado de adesão entre todos os grupos estudados é observado em amostras do grupo SS, mesmo em células com forma preservada. É fundamental destacar que a amostra de SS possui o menor valor de rugosidade e maior valor de adesão, reforçando a hipótese de que a redução acentuada do ácido siálico na membrana promoverá uma alteração mais marcante nas forças eletrostáticas. Os demais resultados mostram que alterações bioquímicas e/ou estruturais na superfície celular contribuem para a adesão mais significativa desde sua liberação na corrente sanguínea. Esses resultados sugerem que, mesmo antes de a célula apresentar estágios avançados de polimerização da hemoglobina, sem apresentar o formato típico de foice ou qualquer outra forma atípica, são observadas alterações significativas nas propriedades físicas e estruturais dos eritrócitos com SS.

Em relação às amostras de β -tal, os dados de adesão corroboram o consenso da literatura sobre a incidência de eventos tromboembólicos^[143]. Esses eventos podem ser causados pelo aumento da exposição à fosfatidilserina na membrana do eritrócito^[144]. Essa exposição é promovida por um aumento da expressão de moléculas em células endoteliais de indivíduos

talassêmicos que melhoram a aderência dos eritrócitos de β -tal ao endotélio^[145]. É aceito que a presença de cadeias de globina em excesso desemparelhadas é a circunstância primária que leva a alterações da membrana de β -tal como oxidação de fosfolípidios, alterações e interações de proteínas do citoesqueleto e aumento da permeabilidade de cátions^[137]. Essas alterações resultam na exposição de neoantígenos da superfície externa, aumento da ligação de autoanticorpos e fixação do complemento na superfície externa dos glóbulos vermelhos^[146]. O aumento no valor médio dos dados de rugosidade para β -tal sugere que mesmo nos estágios iniciais do ciclo de vida celular, os fatores mencionados acima já estão começando a se manifestar. Como a tendência das forças de adesão é a mesma das células SS, podemos concluir que, nesta fase, as células têm carga líquida mais positiva do que as células do grupo AA.

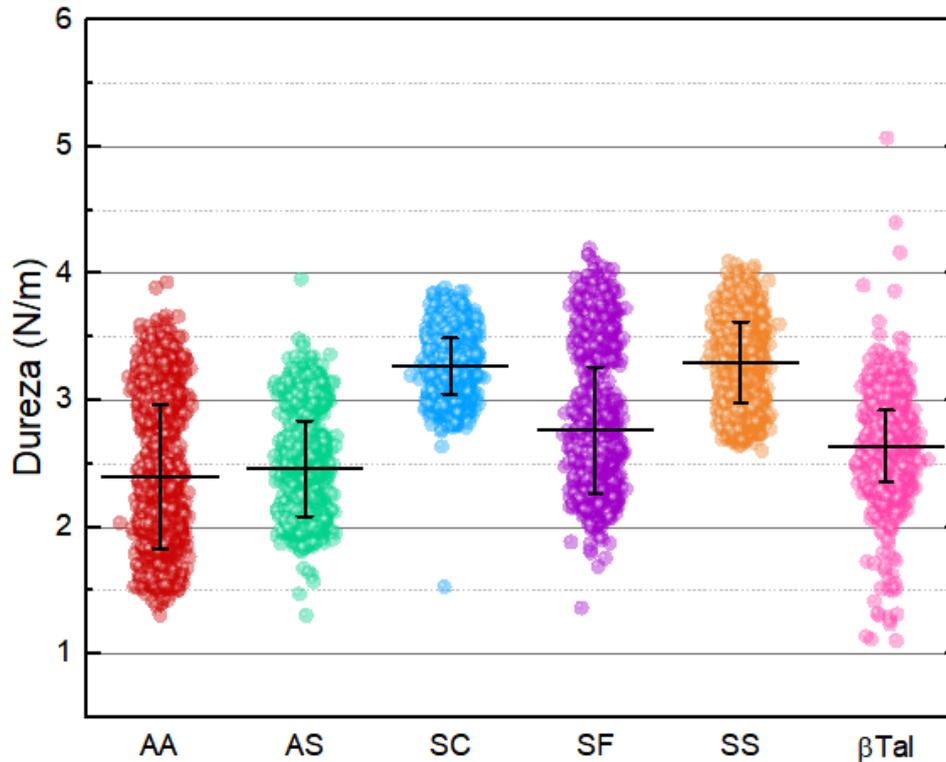
Outro parâmetro estudado foi a dureza da membrana celular, apresentados na Figura 4.11. Os valores médios de dureza para as amostras AA, AS, SC, SF, SS e β -tal são, respectivamente, $2,4 \pm 0,6$ N/m, $2,5 \pm 0,4$ N/m; $3,2 \pm 0,2$ N/m; $2,7 \pm 0,5$ N/m; $3,3 \pm 0,3$ N/m; $2,6 \pm 0,3$ N/m. Os eritrócitos se deformam repetidamente ao passar por capilares estreitos, muitas vezes menores que seu diâmetro, para distribuir oxigênio pelo corpo. Portanto, a deformabilidade dos eritrócitos é uma característica fundamental, amplamente governada pelas propriedades mecânicas da membrana celular.

A biofísica pode trazer informações importantes sobre as células e outros sistemas, ao passo que pode fornecer informações únicas sobre as propriedades locais da membrana celular e seus componentes. Em medições de rigidez AFM, cada pixel do mapa de rigidez AFM representa a rigidez local sobre a membrana celular. Dessa forma, é possível compreender como cada componente da membrana contribui para a rigidez da membrana celular.

As indentações realizadas pela ponta do AFM são altamente precisas devido ao alto controle das forças aplicadas pelo cantilever (na ordem dos nano-newtons). Assim, em nossas medições, as indentações realizadas na superfície da célula não ultrapassaram 15 nm de profundidade. A Figura 4.11 revelou que todas as amostras apresentaram aumento da rigidez local da membrana em comparação com a amostra de controle. Células mais rígidas em AS, SC, SF e SS indicam o efeito da hemoglobina HbS nas propriedades locais da membrana, como a organização dos componentes da membrana, mais ou menos expressão de tais elementos e rearranjo do citoesqueleto celular^[8].

Curiosamente, mesmo para células com forma preservada, as amostras de hemoglobinopatias apresentaram valores de rigidez superiores aos obtidos para a amostra controle, principal-

Figura 4.11: Gráfico de dureza para as amostras de anemias hemolíticas. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.



mente a amostra de SS, que apresenta rigidez média cerca de 38% maior do que a amostra de AA.

De acordo com G.Tomaίουolo^[147], a deformabilidade de RBC é atribuída a três fatores: razão A/V, viscosidade do fluido intracelular e propriedades mecânicas da membrana celular, que é composta por um glicocálice rico em carboidratos, uma bicamada lipídica e uma rede de proteína subjacente. Robert Hebbel^[125] apontou muitas anormalidades da membrana da célula falciforme, incluindo homeostase catiônica, vesículas contendo Ca, bicamada lipídica disfuncional e depósitos de ferro na membrana. Esse resultado revela que, além do processo de polimerização da hemoglobina HbS, a membrana das células com esse tipo de hemoglobina também é mais rígida. Embora as células AS e SF apresentem valores médios de rigidez superiores aos das células do grupo AA, esses valores são menores que os observados para os grupos SC e SS, na fase em que as células apresentam morfologia preservada. Para o AS, o valor médio de rigidez próximo ao AA revela que este parâmetro de fato não é alterado significativamente para o traço falciforme, ao contrário dos resultados observados para rugosidade, área, volume e adesão. Para as células SF, embora indivíduos com este tipo de hemoglobina possam apresentar as complicações típicas da doença falciforme, o valor médio de rigidez da membrana inferior ao

obtido para as células SS aponta, mais uma vez, para o caráter atenuante da HbF nas alterações do aspecto físico das propriedades dos eritrócitos.

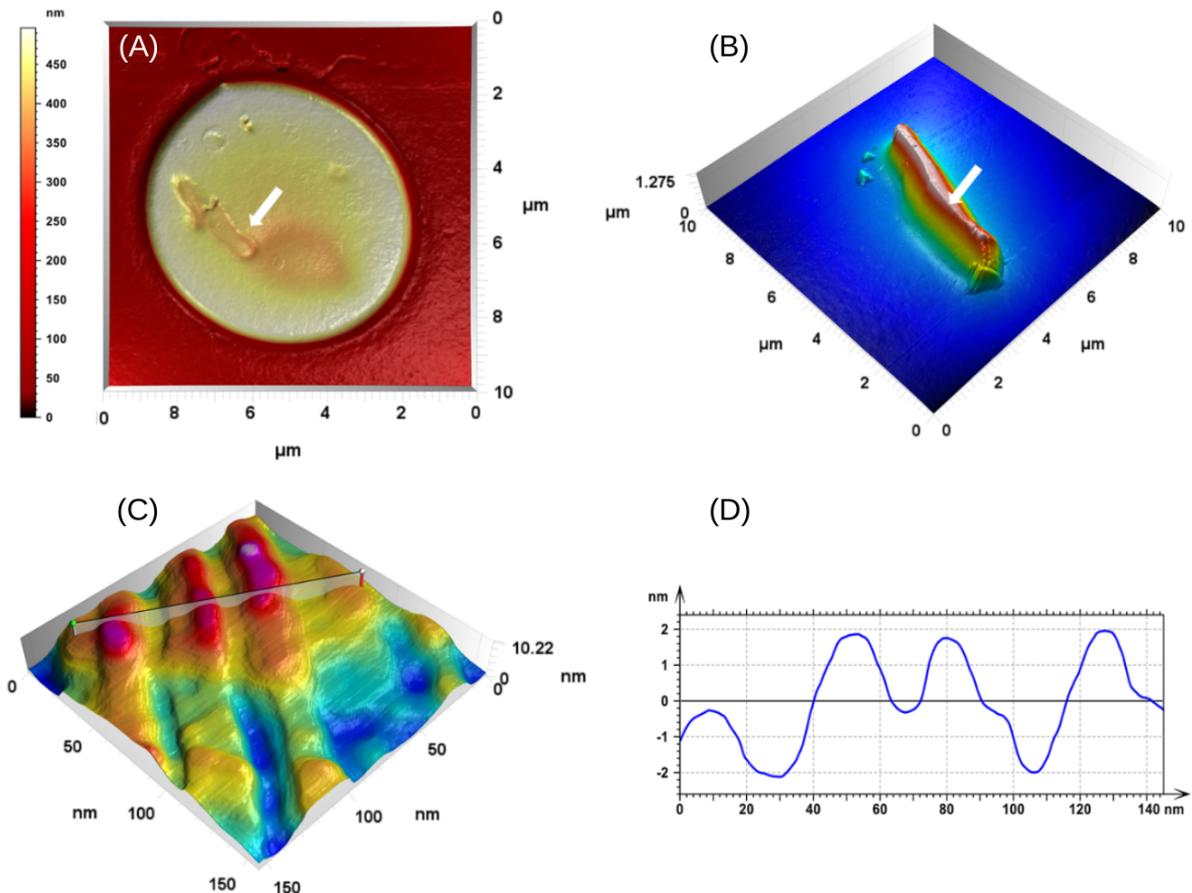
A membrana de hemácias de amostras de SC também apresenta alterações essenciais que levam à perda de K⁺, aumento da concentração média de hemoglobina corpuscular, entre outras. Em comparação com as células SS, as células SC mostram perda de K⁺ e desidratação mais pronunciadas. Um número significativo de células SC jovens começa o ciclo da corrente sanguínea com alta densidade ^[148]. A alta atividade do KCC em células SC oxigenadas pode resultar dos cristais de HbC, diminuindo a concentração total de hemoglobina solúvel. Hanemann e colaboradores ^[128] sugerem que o eritrócito inchado ativa mecanismos para perder solutos e água com a formação dos cristais. Assim, supõe-se que alterações na membrana das células SC aparecem precocemente e estão associadas ao início do processo de cristalização.

As células de SC aqui investigadas, com morfologia preservada, apresentavam diversas alterações físicas. Entre eles, destaca-se a rigidez da membrana. O valor de rigidez de membrana, próximo ao valor encontrado para células SS, sugere o papel crítico dessas alterações de membrana na mecânica celular. Mudanças na membrana promovem, junto com outros fatores, a formação de cristais. Esses cristais podem ser encontrados dentro e fora das células. No último caso, após um processo de extrusão de células ^[149]. O alto valor médio de rigidez para o grupo SC, além das alterações de membrana, pode estar associado a esses cristais, ainda no início do processo de cristalização. Mesmo que os cristais não sejam observados ao microscópio óptico, a HbC inicia seu processo de reestruturação interna para ficar mais rígida, e essa alteração do processo pode ser medida com AFM.

A Figura 4.12 mostra um exemplo dessas estruturas cristalinas observadas em amostras de HbSC, analisadas pelo AFM. A Figura 4.12(A) mostra uma varredura de um eritrócito HbSC. A seta destaca uma estrutura de membrana, supostamente o contorno de um cristal interno. Uma das vantagens da técnica de AFM é delinear estruturas internas nas células, como mostrado em Rebelo e colaboradores ^[150]. É possível observar as estruturas internas do citoesqueleto das células epiteliais renais a partir da caracterização da membrana externa da célula. Esta imagem sugere que as células com morfologia preservada podem ter estruturas cristalinas altamente desenvolvidas. A Figura 4.12(B) mostra uma imagem de altura AFM de um cristal externo de um eritrócito. A ultraestrutura da superfície do cristal é revelada na Figura 4.12(C), na qual vários terraços são evidentes nesta imagem, mostrando um padrão ondulado na superfície cristalina ^[149]. Na região indicada pela barra horizontal da Figura 4.12(C), foi obtido o corte transver-

sal (Figura 4.12(D), com parâmetros de superfície do cristal compatíveis com os relatados por Dewan e colaboradores [151].

Figura 4.12: Cristal na hemoglobinopatia SC. (A) Cristal na face de um eritrócito indicado pela seta. (B) Cristal externo à célula. (C) enquadramento sobre a face do cristal evidenciando detalhes do plano cristalino. (D) Corte da secção transversal no plano cristalino.



Os resultados de rigidez da amostra de β - tal revelaram que as membranas celulares são mais rígidas quando comparadas à amostra controle, demonstrando que embora as morfologias estejam preservadas, os agrupamentos de cadeias α podem contribuir para a rigidez da membrana. Além disso, a ligação de cadeias α oxidadas à proteína 4.1 [131] e a reorganização dos componentes externos da membrana pode influenciar o resultado de rigidez da amostra de β -tal. A membrana do eritrócito contribui significativamente para sua capacidade de deformação [137]. As características da membrana são afetadas em hemácias talassêmicas principalmente devido à globina associada à membrana ligada ao esqueleto celular [152]. Desta forma, é possível que o excesso de cadeias de globina ligadas à membrana interna altere as propriedades mecânicas da membrana. Além disso, a globina com seus grupos hemes, hemicromos e ferro associados poderiam gerar espécies reativas de oxigênio, que causariam danos oxidativos aos

lipídios e proteínas da membrana adjacente ^[153], também alterando suas propriedades físicas.

É fundamental destacar as divergências entre os resultados apresentados nos gráficos da relação A/V (Figura 4.9) e os resultados de dureza (Figura 4.12). É importante notar que a natureza física dessas grandezas são distintas. A deformação (unidade de μ^{-1}), inferida a partir dos resultados de razão A/V, é um parâmetro que determina a mudança na configuração geométrica de um corpo, levando-se em conta a variação de sua forma ou dimensões após a aplicação de uma força externa (tensão). Esse é um parâmetro global da célula. A dureza é um parâmetro nanométrico local, que define a resistência de um objeto à deformação elástica em resposta à força aplicada. Esses parâmetros caracterizam diferentes informações sobre as propriedades biomecânicas dos eritrócitos em diferentes escalas.

4.3 Análise das propriedades de superfície da face citoplasmática da membrana eritrocitária

Além das medidas nas células íntegras, foram feitas medidas na face interna da membrana eritrocitária, com objetivo de estudar os valores da rugosidade e a adesão. Como resultado morfológico, mostram-se, na Figura 4.13, os fragmentos membranares dos eritrócitos das amostras. Nesse caso, foram investigadas as amostras de células controle AA, hemoglobinopatias SS e β -talassemia. O número reduzido de hemoglobinopatias estudadas foi um efeito direto do cenário pandêmico causado pelo COVID-19. A Figura 4.13 (A) mostra a imagem da face interna da membrana de uma célula de amostra controle; a Figura 4.13 (B), a imagem da face interna de uma membrana de eritrócito de HbSS; a Figura 4.13 (C), uma imagem de membrana interna de eritrócito com β -tal. Na Figura 4.13, em todos os casos, é possível observar as proteínas internas de membrana. As diferenças marcantes das estruturas nessa face da membrana, especialmente entre os diferentes tipos de hemoglobina, motivaram a análise de rugosidade média quadrática desses resultados.

A Figura 4.14 mostra o gráfico de rugosidade para a face interna da membrana eritrocitária. Os valores médios são de $6,5 \pm 2,2$ nm para a amostra AA, $11,8 \pm 2,9$ nm para a amostra SS, e $7,9 \pm 2,4$ nm para a amostra de β -tal. Observam-se maiores valores médios para as amostras com patologias, e, dentre elas, a de anemia falciforme apresenta maior valor médio.

Os resultados sugerem que um aumento na rugosidade pode estar associado a uma grande quantidade de hemoglobina corpuscular ligada à face interna da membrana eritrocitária. O do-

Figura 4.13: Face interna de membranas eritrocitárias. (A) Amostra HbAA. (B) Amostra HbSS. (C) Amostra Hb β Tal.

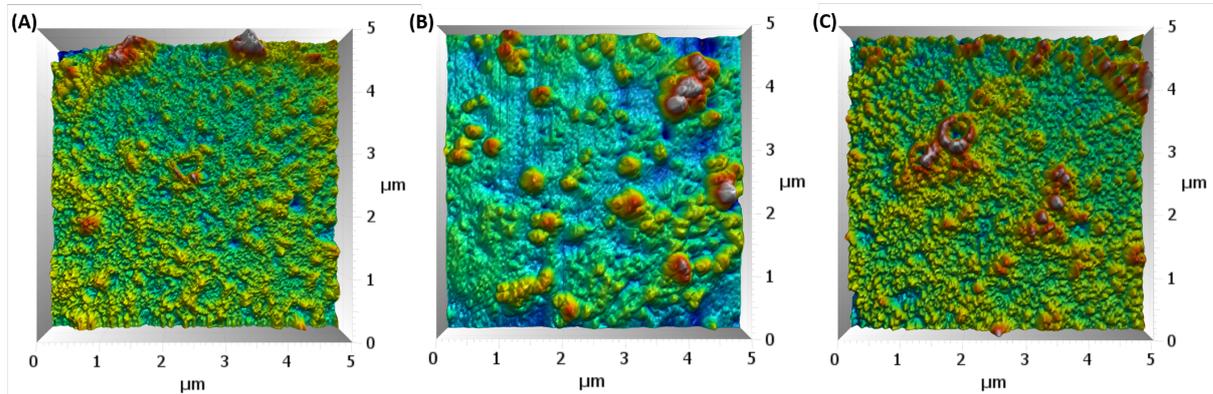
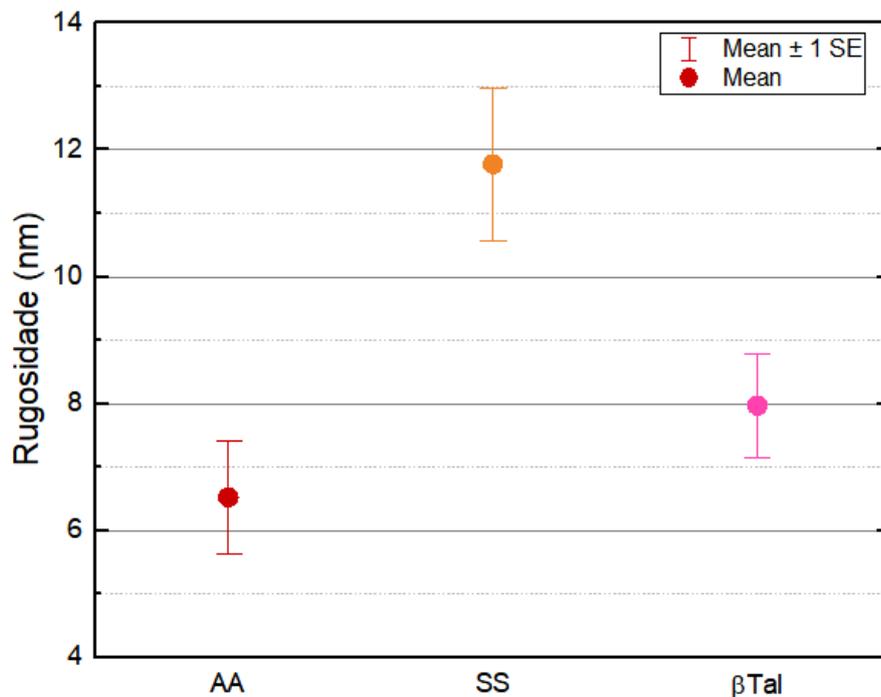


Figura 4.14: Gráfico de rugosidade para a face interna das membranas eritrocitárias.



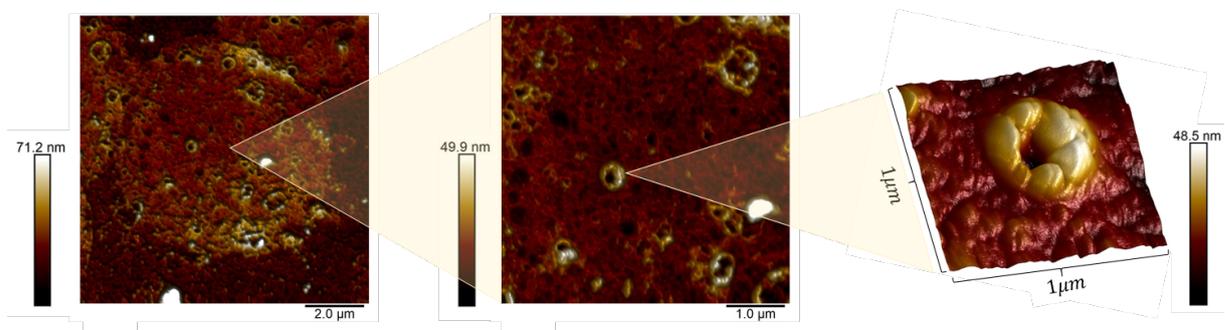
mínio citoplasmático da banda 3 é um sítio de ligação de alta afinidade para HbS mais do que HbA ^[130]. O rearranjo de proteínas da face interna pode contribuir para mudanças na superfície celular e em suas propriedades mecânicas.

Em relação à rugosidade da membrana interna no grupo β -tal, Shinar e colaboradores ^[154] mostraram agregados de cadeia α e agrupamento da Banda 3 na membrana interna da face de células com β -tal. Esse fato promove falhas na interação e organização das proteínas do citoesqueleto. Além disso, a espectrina é o principal alvo das espécies reativas de oxigênio, causando perdas ao interagir com outras proteínas. Esses fatos podem estar associados ao aumento

da rugosidade interna das membranas de amostras β -tal.

Canais de membrana caracterizam aspereza na membrana interna de eritrócitos de β -tal, como mostrado na Figura 4.15, uma imagem de alta resolução do fragmento de membrana da célula de β -tal com face interna exposta, evidenciando uma das muitas estruturas observadas que poderiam ser um canal de membrana. A presença e o arranjo desses componentes estão diretamente ligados às mudanças na rugosidade das membranas internas de hemácias de β -tal. Mesmo para células em início de alterações morfológicas, os resultados de AFM mostram uma diferença notável entre a rugosidade interna de células com e sem patologias.

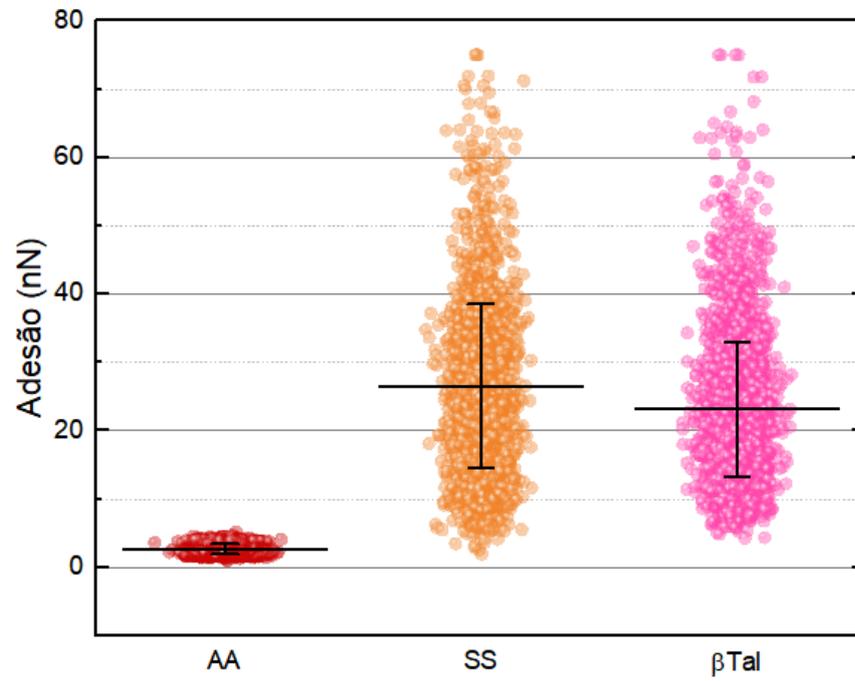
Figura 4.15: Imagem da face interna da membrana eritrocitária, com áreas de 10, 5 e 1 μm^2 , respectivamente, revelando detalhes de um canal de membrana.



A Figura 4.16 mostra o gráfico de adesão para a face interna da membrana eritrocitária. Os valores médios são de: $2,7 \pm 0,8$ nN para a amostra AA, $26,5 \pm 12,0$ nN para a amostra SS e $23,1 \pm 9,9$ nN para a amostra de β -tal.

As forças de adesão médias resultantes para a face citoplasmática de eritrócitos não fornecem nenhuma distinção ambígua, pois as forças de adesão médias são cerca de dez vezes maiores em amostras de SS e nove vezes no grupo β -tal, em comparação com a amostra AA. Essa mudança nas forças de adesão e, conseqüentemente, nas forças eletrostática e van der Waals da membrana interna, provavelmente contribui para a fixação de agregados nesta porção da membrana. Observa-se uma relação direta entre rugosidade e forças de adesão. O grupo com a maior força média de adesão (SS) possui o número mais significativo de agregados na membrana e o maior valor médio de rugosidade. Oxidação de espectrina, actina e proteína 4.1 foi observada em eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme^[155]. Na face interna do eritrócito, a autoxidação da HbS causa dano oxidativo aos componentes da membrana. Conseqüentemente, a organização e as propriedades da membrana estão comprometidas^[115]. Para a amostra de β -tal, o dano oxidativo também está presente, estimulando a expressão da peroxiredoxina-2 que

Figura 4.16: Gráfico de adesão para a face interna da membrana eritrocitária. A barra horizontal representa o valor médio e a barra vertical representa o desvio padrão.



pode se mover para a membrana ao se ligar ao domínio citoplasmático da banda-3 ^[156, 157].

5. Conclusões e Perspectivas

O desenvolvimento do AFM trouxe novas possibilidades para o estudo de sistemas biológicos em nanoescala. Nessa perspectiva, avaliou-se, neste trabalho, a aplicação do Microscópio de Força Atômica para a investigação de propriedades biofísicas relacionadas aos eritrócitos, demonstrando que medidas de força associadas com imagens de alta resolução espacial podem revelar diversos aspectos a respeito das propriedades mecânicas de células, especialmente relacionadas com patologias (em nosso caso, as anemias hemolíticas).

A partir das imagens de alta resolução, conseguiu-se comparar a morfologia das diferentes amostras de anemias hemolíticas aqui estudadas, o que possibilitou observar as alterações estruturais acarretadas pelas hemoglobinopatias.

Por meio da análise da rugosidade da face externa de membrana, os resultados apresentaram informações importantes acerca da superfície celular no início do ciclo de vida das células. Nessa etapa, observaram-se alterações significativas da rugosidade para todas as amostras de hemoglobinopatias, quando comparadas com a amostra controle, mesmo em estágios precoces do ciclo celular. Para cada hemoglobinopatia, foram formuladas hipóteses, como expressão de proteínas e aumento de canais ou poros de membrana (para o caso das AS, SC e β -tal), ou redução de expressão de determinados componentes, como o ácido siálico, que levam a uma redução dos valores de rugosidade (para o caso de SF e SS).

O estudo da área, volume celular e razão área/volume mostrou alterações para as propriedades geométricas das células, relevando eritrócitos com diâmetros maiores e menores que o tamanho considerado padrão. O aumento da área celular para as amostras de SS e SF nos leva a inferir um mecanismo de compensação. Os glóbulos vermelhos aumentam sua área superficial para coletar mais oxigênio. A diminuição na área da célula para amostras de AS, SC e β -tal indica mudanças nos componentes da membrana.

Os resultados de volume mostraram uma redução de todos os volumes nas hemoglobinopatias, exceto para as amostras de SS. Esse resultado sugere que o início da desidratação celular

é prematuro para amostras de AS, SC, SF e β -tal. Para as células SS, antes do processo de desidratação celular, a deficiência de KCC possivelmente leva ao inchaço celular.

Os resultados da razão para as amostras de AS, SC e SF indicam um aumento na deformabilidade celular, provavelmente relacionado à presença de hemoglobina HbA, HbC e HbF, uma vez que essas hemoglobinas reduzem a falcização e são acompanhadas por redução da gravidade clínica. Também foi possível encontrar uma redução na razão A/V para as amostras de SS e β -tal, mesmo em células com formas bem preservadas, conforme encontrado na literatura [110]. Eles sugerem uma influência mais significativa da estrutura e componentes da membrana celular no processo de deformação além da presença de cadeias poliméricas de hemoglobina e corpúsculo de Heinz.

Nos resultados da biomecânica celular, o estudo da adesão fornece informações importantes para o entendimento das hemoglobinopatias. Destaca-se o resultado para a amostra de AS, em que o valor médio de adesão é maior que o da amostra controle. Se comparados aos valores de adesão da amostra de SS, esses valores são notavelmente semelhantes. Esse resultado corrobora relatos de que indivíduos com o traço falciforme, embora clinicamente assintomáticos, são mais suscetíveis a complicações de saúde, como a morte súbita [46].

Para rigidez da membrana celular, os resultados mostram um aumento no valor médio para todas as hemoglobinopatias. O resultado reforça que células mais rígidas indicam mudanças na organização e nos componentes da membrana celular. O alto valor de rigidez para a amostra de SC pode ser associado a cristais internos submicrônicos e alterações intrínsecas da membrana.

O estudo da membrana interna de eritrócitos se torna promissor, como forma de compreender as alterações advindas das anemias hemolíticas também no interior da célula. Foi possível correlacionar adesão e rugosidade na face citoplasmática de amostras AA, SS e β -tal. Os resultados mostram que a face da membrana interna é mais rugosa para patologias e com maiores forças de adesão, associada a maior expressão de proteínas e formação de aglomerados.

De modo geral, com os resultados detalhados neste trabalho, é possível observar a importância e contribuição do AFM como técnica de análise de sistemas em nanoescala, promovendo resultados importantes acerca da compreensão destes. Em especial neste trabalho, mostra-se que o estudo ultraestrutural e nanomecânico precoce em eritrócitos de anemias hemolíticas se torna importante para o entendimento da patogênese da doença, o que foi possível utilizando medidas de força interatômicas.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, algumas perspectivas podem ser idealiza-

das. Além das amostras de anemias hemolíticas estudadas aqui (e com os resultados já obtidos), é possível expandir a pesquisa para que a técnica de AFM possa ajudar na compreensão de hemoglobinopatias de anemia falciforme associada com talassemia, que também englobam casos comuns das anemias.

O estudo descrito no trabalho pode ser feito utilizando funcionalização de sondas, a fim de compreender como determinadas proteínas interagem com os receptores de superfície das células. Com isso, é possível monitorar interações do tipo receptor-ligante, interações moleculares de adesão celular e interações do tipo antígeno-anticorpo.

O estudo relatado no trabalho foi feito em ar, como mencionado. Com o AFM, há a possibilidade de operar em meio aquoso, mantendo as características químicas e físicas próprias do ambiente biológico em estudo. Isso também pode ser uma perspectiva para a abordagem de estudo nanomecânico em células.

REFERÊNCIAS

- [1] ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1a. ed. [S.l.]: Atheneu, 2004. ISBN 978-8-573-79368-0.
- [2] LEKKA, M. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.*, v. 28, p. 312, 1999.
- [3] WEATHERALL, D. J. et al. Malaria and the red cell. *ASH Education Program Book*, American Society of Hematology, v. 2002, n. 1, p. 35–57, 2002.
- [4] HOSSEINI, S. M. How malaria parasites reduce the deformability of infected red blood cells. *Biophys. J.*, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2012.
- [5] BUYS, A. V. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: A scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc. Diabetol.*, v. 12, n. 1, p. 1–25, 2013.
- [6] SURESH, S. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomaterialia.*, v. 1, p. 15–30, 2005.
- [7] MOHANDAS, N.; EVANS, E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *E. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 23, p. 787–818, 1994.
- [8] DULIŃSKA, I. et al. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *Journal of biochemical and biophysical methods*, Elsevier, v. 66, n. 1-3, p. 1–11, 2006.
- [9] BHANU, P. J.; HEINRICH, J. K. H. *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*. 1a. ed. [S.l.]: Academic Press, 2002. v. 68. (Methods in Cell Biology 68, v. 68). ISBN 0-12-544171-1, 0-12-383851-7.
- [10] GIOVANNA, T. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, v. 8, n. 051501, p. 1–19, 2014.
- [11] KNOLL, M.; RUSKA, E. Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für physik*, Springer, v. 78, n. 5, p. 318–339, 1932.
- [12] DAVIDSON, M. W. *Microscopy Basic: Resolution*. 2019. <<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution>>. Acessado em 18/05/2021.
- [13] NobelPrize.org. *The Nobel Prize*. 2021. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/press-release/>>. Acesso em: 25 Fev. 2021.
- [14] BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. *Surface science*, Elsevier, v. 126, n. 1-3, p. 236–244, 1983.
- [15] BINNIG, G. et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 49, p. 57–61, Jul 1982. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.49.57>>.

- [16] NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v. 44, n. 290, p. 212–219, 1998.
- [17] KASAS, S.; DIETLER, G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, Springer, v. 456, n. 1, p. 13–27, 2008.
- [18] CHANG, K.-C. et al. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, Elsevier, v. 24, n. 4, p. 162–169, 2012.
- [19] DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy: a powerful molecular toolkit in nanoproteomics. *Proteomics*, Wiley Online Library, v. 9, n. 24, p. 5400–5405, 2009.
- [20] LAST, J. A. et al. The applications of atomic force microscopy to vision science. *Investigative ophthalmology and visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 51, n. 12, p. 6083–6094, 2010.
- [21] MACIASZEK, J. L.; ANDEMARIAM, B.; LYKOTRAFITIS, G. Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease. *The Journal of Strain Analysis for Engineering Design*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 46, n. 5, p. 368–379, 2011.
- [22] GIRASOLE, M. et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study rbc: a quantitative atomic force microscopy investigation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1768, n. 5, p. 1268–1276, 2007.
- [23] FELLOWS, A. et al. Nanoscale adhesion profiling and membrane characterisation in sickle cell disease using hybrid atomic force microscopy-ir spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 197, p. 111383, 2021.
- [24] CONSORTIUM, H. et al. The human body at cellular resolution: the nih human biomolecular atlas program. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 574, n. 7777, p. 187, 2019.
- [25] BIORENDER. 2021. Disponível em: <<https://app.biorender.com/>>. Acesso em: 25 Fev. 2021.
- [26] TOMITORI, M.; BHUSHAN, B.; FUCHS, H. *Applied Scanning Probe Methods IX: Characterization*. [S.l.]: Springer, 2008.
- [27] SANTOS, V. dos. *O que é membrana plasmática?* 2020. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-membrana-plasmatica.htm>>, NOTE="Acessado em 21/05/2021".
- [28] Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. *Molecular Cell Biology 5th Ed*. [S.l.: s.n.], 2000. 1150 p. ISSN 15393429. ISBN 0716776014.
- [29] GUMBINER, B. M. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, v. 84, n. 3, p. 345–357, 1996. ISSN 00928674.
- [30] LO, S. K. et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, v. 173, n. 6, p. 1493–1500, 1991. ISSN 15409538.

- [31] CUNNINGHAM, B. A. The Structure and Function of Cell Adhesion Molecules. *Advances in Molecular and Cell Biology*, v. 2, n. C, p. 25–54, 1988. ISSN 15692558.
- [32] Hoffbrand, A. V. - Moss, P. a. H. *Fundamentos em Hematologia, 6ª Edição (Artmed).pdf*. [S.l.: s.n.], 2017. 462 p.
- [33] OLIVEIRA, M. B. S. C. d.; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. EPSJV, Rio de Janeiro, p. 156, 2013.
- [34] BOLTON-MAGGS, P. H. et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis - 2011 update. *British Journal of Haematology*, v. 156, n. 1, p. 37–49, 2012. ISSN 00071048.
- [35] GALLAGHER, P. G. Red cell membrane disorders. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, n. 203, p. 13–18, 2005. ISSN 15204383.
- [36] ÁCIDO Siálico: estrutura e funções. 2018. Disponível em: <<https://maestrovirtuale.com/acido-sialico-estrutura-funcoes-e-doencas>>.
- [37] SIALIC acids: from the comprehension of their involvement in biological processes to antiinfluenza drug design. *Quimica Nova*, v. 28, n. 2, p. 306–316, 2005. ISSN 01004042.
- [38] KHAN, M.; SONI, H.; SOOD, A. K. Optical tweezer for probing erythrocyte membrane deformability. *Applied Physics Letters*, v. 95, n. 23, p. 233703, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.3272269>>.
- [39] EDUCAÇÃO, P. (Ed.). *Anemias*. [S.l.: s.n.], 2012. 11-16 p. ISBN 9788582411209.
- [40] PROVAN, D.; BAGLIN, T.; DOKAL, I.; VOS, J. d. O. *Handbook of Clinical Haematology*. 4. ed. [S.l.: s.n.], 2015. 835 p. ISSN 13654357. ISBN 9780199683307.
- [41] Naoum PC, N. F. Anthropological aspects related to the origin and dispersion of the hb s gene in brazil. *Microscopy: advances in scientific research and education*, 2016. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microscopy6/book/141-152.pdf>>.
- [42] CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 3, n. 29, p. 203–6, 2007.
- [43] BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 12, p. 345–367, 2010. ISSN 15239829.
- [44] SANITÁRIA, A. N. d. V. *Tratamento de Doenças Falciformes*. [S.l.: s.n.], 2002. 1–143 p. ISBN 8588233045.
- [45] GLADWIN, M. T. et al. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 291, n. 5, p. 2026–2035, 2006. ISSN 03636135.
- [46] STEINBERG, M. H. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Hemoglobin*, v. 20, n. 1, p. 1–19, 1996. ISSN 03630269.

- [47] SONATI, M. F. D.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: Hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de Pediatria*, v. 84, n. 4 SUPPL., p. 40–51, 2008. ISSN 00217557.
- [48] ENFERMEDAD DE LA HEMOGLOBINA CC. 2017. 1576–1580 p. Disponível em: <em:http://chescovallehemastation014.blogspot.com/2014/11/enfermedad-de-la-hemoglobina-cc.html>.
- [49] KUEHNE, S. E. of Physical Phenomena. 2004.
- [50] DIASPRO, A.; BIANCHINI, P. Optical nanoscopy. *La Rivista del Nuovo Cimento*, v. 43, p. 385–455, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40766-020-00008-1>.
- [51] IBACH, H. *Physics of Surfaces and Interfaces*. 1. ed. [s.n.], 2006. v. 2006. 646 p. ISBN 3540347097. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=uIdeNSV8o9MCpgis=1>.
- [52] SARID, D. Scanning Force Microscopy: With Applications to Electric, Magnetic, and Atomic Forces (Oxford Series in Optical and Imaging Sciences). *US Patent 5,319,960*, 1994.
- [53] APPLICATION and Results. 2020. <https://nanoscore.de/products/application-results/>. Acessado em 10/01/2021.
- [54] ALENCAR, L. M. R. *Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica*. Tese (Tese (Doutorado em Física)) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- [55] GALEMBECK, F. et al. Microscopia de sondas : uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. 1980.
- [56] PINTO, E. P. et al. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. 2013.
- [57] HOLBROW, C. H.; AMATO, J. C. What Gay-Lussac didn't tell us. *American Journal of Physics*, v. 79, n. 1, p. 17–24, 2011. ISSN 0002-9505.
- [58] UNIVERSITY, R. A. Atomic Force Microscopy - An advanced physics lab experiment. *Advanced Physics Lab Experiments*, n. 04, 2014.
- [59] HAMAKER, H. C. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica*, v. 4, n. 10, p. 1058–1072, 1937. ISSN 00318914.
- [60] LONDON, F. The general theory of molecular forces. *Transactions of the Faraday Society*, The Royal Society of Chemistry, v. 33, p. 8b–26, 1937.
- [61] RADMACHER, M. *Methods in Cell Biology*. [S.l.]: Elsevier, 2007. v. 83.
- [62] HERTZ, H. J. Über die Berührung fester elastischer Körper. *J. Reine Angew. Math.*, v. 92, p. 155:171, 1881.
- [63] JOHNSON, K. L.; JOHNSON, K. L. *Contact mechanics*. [S.l.]: Cambridge university press, 1987.
- [64] JOHNSON, K. K. kendall and ad roberts. *Proc. Roy. Soc., London A*, v. 324, 1971.

- [65] DERJAGUIN, B. V.; MULLER, V. M.; TOPOROV, Y. P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, Elsevier, v. 53, n. 2, p. 314–326, 1975.
- [66] LIMA, R. C. *Marcadores de superfície para células de leucemias mieloblásticas: uma proposta através da microscopia de força atômica*. Tese (Monografia (Graduação em Física)) — Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.
- [67] BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.*, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005. ISSN 01675729.
- [68] HAO, H. W. Electrostatic and contact forces in force microscopy. *Journal of Vacuum Science and Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, v. 9, n. 2, p. 1323, 1991. ISSN 0734211X.
- [69] HERMANSSON, M. The dlvo theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 14, p. 105–119, 1999.
- [70] NÁRAY-SZABÓ, G. Electrostatic effects in proteins. *Periodicum Biologorum*, v. 101, n. 4, p. 325–331, 1999. ISSN 00315362.
- [71] SOTRES, J.; BARÓ, A. M. AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules. *Biophysical Journal*, v. 98, n. 9, p. 1995–2004, 2010. ISSN 15420086.
- [72] ALENCAR, L. M. R. *Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica*. Tese (Dissertação (Mestrado em Física)) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- [73] ZANETTE, S. Funcionamento de um microscópio de força atômica. *Notas do curso ministrado no CBPF*, 1997.
- [74] OLIVER, W. C.; PHARR, G. M. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *J. Mater. Res.*, v. 19, p. 3:20, 2004.
- [75] YEOW, N.; TABOR, R. F.; GARNIER, G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Advances in Colloid and Interface Science*, Elsevier, v. 249, n. May, p. 149–162, 2017. ISSN 00018686.
- [76] MEGE, J.-L. et al. Quantification of cell surface roughness: a method for studying cell mechanical and adhesive properties. *Journal of Theoretical Biology*, v. 119, n. 2, p. 147 – 160, 1986. ISSN 0022-5193.
- [77] BHUSHAN, B. Surface roughness analysis and measurement techniques. In: *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set*. [S.l.]: CRC press, 2000. p. 79–150.
- [78] DRELICH, J.; MITTAL, K. L. *Atomic force microscopy in adhesion studies*. [S.l.]: CRC Press, 2005.
- [79] NUNES, L. T. et al. Análise estatística da influência dos parâmetros de corte na rugosidade no torneamento do aço microligado din 38mnsivs5. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

- [80] NIKOVA, D. et al. *Atomic force microscopy in nanomedicine*. 1a. ed. [S.l.]: Springer, 2006. v. 1. (Applied scanning probe methods III, v. 1). ISBN 978-3-540-26909-0.
- [81] KUZNETSOVA, T. G. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, v. 38, p. 824–833, 2007.
- [82] PETERSEN, N. O.; MCCONNAUGHEY, W. B.; ELSON, E. L. Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin b. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 79, p. 5327–5331, 1982.
- [83] ZAHALAK, G. I.; MCCONNAUGHEY, W. B.; ELSON, E. L. Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocytes. *J Biomech Eng.*, v. 112, p. 283–294, 1990.
- [84] YOUNG, A.; EVANS, E. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys J.*, v. 56, p. 139–149, 1989.
- [85] SHAO, J. Y.; HOCHMUTH, R. M. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. *Biophysical Journal.*, v. 71, p. 2892–2901, 1996.
- [86] ZILKER H. ENGELHARDT, E. S. A. Dynamic reflection interference contrast (ric) microscopy: a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. *Journal de Physique*, v. 48, p. 2139–2139, 1987.
- [87] ZEMAN, K.; ENGELHARD, H.; SACKMANN, E. Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effect of cell shape and membrane organization. *Eur Biophys J.*, v. 18, p. 203–219, 1990.
- [88] LUERS, H. et al. Acoustic microscopy of cultured cells: distribution of forces and cytoskeletal elements. *Cell Biophys.*, v. 18, p. 279–293, 1991.
- [89] BEREITER-HAHN, J. et al. Mechanical basis of cell shape: investigations with the scanning acoustic microscope. *Biochem. Cell Biol.*, v. 73, p. 337–348, 1990.
- [90] ASHKIN, J. M. D. A. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 86, p. 7914–7918, 1989.
- [91] SVOBODA, K. et al. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys J.*, v. 63, p. 784–793, 1992.
- [92] BRANDÃO, M. M. et al. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to study of drug response in sickle cell disease. *Eur J Haematol.*, v. 70, p. 207–211, 2003.
- [93] AGERO, U. et al. Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy. *Physical Review E.*, v. 67, 2003.
- [94] NETO, J. C. et al. Measuring optical and mechanical properties of a living cell with defocusing microscopy. *Biophysical Journal.*, v. 91, p. 1108–1115, 2006.
- [95] NOWAKOWSKI, R.; LUCKHAM, P. Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy. *Surf. Interface Anal.*, v. 33, p. 118–121, 2002.

- [96] GARCIA, C. R. et al. Imaging plasmodium falciparum-infected ghost and parasite by atomic force microscopy. *J Struct Biol.*, v. 204, p. 92–98, 1997.
- [97] SAFRAN, S. A. et al. Physics of cell elasticity, shape and adhesion. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, v. 352, p. 171–201, 2005.
- [98] SEN, S.; SUBRAMANIAN, S.; DISCHER, D. E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with afm: Theoretical model and experiments. *Biophys J.*, v. 89, p. 3203–3213, 2005.
- [99] WU, Y. et al. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with afm: Theoretical model and experiments. *Micron*, v. 40, p. 359–364, 2009.
- [100] SVETINA, S. et al. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry*, v. 62, p. 107–113, 2004.
- [101] MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, v. 29, p. 168–178, 2007.
- [102] AKAKI, M. et al. Surface charge of plasmodium falciparum merozoite as revealed by atomic force microscopy with surface potential spectroscopy. *Parasitol. Res.*, v. 88, p. 16–20, 2002.
- [103] MESQUITA U. AGERO, O. N. M. L. G. Defocusing microscopy: An approach for red blood cell optics. *Appl. Phys. Lett.*, v. 88, p. 133901, 2006.
- [104] SWIHART, A. H. et al. Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton. *Journal of Microscopy.*, v. 204, p. 212–225, 2001.
- [105] LIU, F. et al. Sample preparation and imaging of erythrocyte cytoskeleton with the atomic force microscopy. *Cell Biochem Biophys.*, v. 38, p. 251–270, 2003.
- [106] MCGOUGH, A. Membrane skeleton: How to build a molecular shock absorber. *Current Biology.*, v. 9, p. R887–R889, 1999.
- [107] DISCHER, D. E. Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Annals of biomedical engineering.*, v. 37, p. 847–859, 2009.
- [108] E. EVANS A., P. C. A. B. K. Deformation and nano-rheology of red blood cells: an afm investigation. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, v. 50, p. 43–48, 2005.
- [109] SLEEP, J. e. a. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. *Biophys J.*, v. 6, n. 77, p. 3085–3095, 1999.
- [110] MOKKEN, F. C. et al. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann Hematol.*, v. 64, p. 113–122, 1992.
- [111] CAPRARI, P. et al. Hereditary spherocytosis and elliptocytosis associated with prosthetic heart valve replacement: rheological study of erythrocyte modifications. *Int J Hematol.*, v. 89, p. 285–293, 2009.

- [112] SANCTIS, V. D. et al. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases β -thalassemia distribution in the old world: an ancient disease seen from a historical standpoint. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 9, p. 1–11, 2017. ISSN 2035-3006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5333734/pdf/mjhid-9-1-e2017018.pdf>>.
- [113] LÜBBE, J. et al. Determining cantilever stiffness from thermal noise. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 4, n. 1, p. 227–233, 2013. ISSN 21904286.
- [114] MEGE, J.-L. et al. Quantification of cell surface roughness; a method for studying cell mechanical and adhesive properties. *Journal of theoretical biology*, Elsevier, v. 119, n. 2, p. 147–160, 1986.
- [115] VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox biology*, Elsevier, v. 6, p. 226–239, 2015.
- [116] BARODKA, V. M. et al. New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Elsevier B.V., v. 52, n. 4, p. 230–235, 2014. ISSN 10960961. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.10.004>>.
- [117] KEPPNER, A. et al. Lessons from the post-genomic era: Globin diversity beyond oxygen binding and transport. *Redox biology*, Elsevier, p. 101687, 2020.
- [118] MARENGO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. In: TAYLOR & FRANCIS. *Baylor University Medical Center Proceedings*. [S.l.], 2006. v. 19, n. 3, p. 239–245.
- [119] METTANANDA, S.; GIBBONS, R. J.; HIGGS, D. R. α -globin as a molecular target in the treatment of β -thalassemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, American Society of Hematology Washington, DC, v. 125, n. 24, p. 3694–3701, 2015.
- [120] TOKUMASU, F. et al. Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin c erythrocytes. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 4, n. 6, p. e5828, 2009.
- [121] KUMAR, D.; RIZVI, S. I. Erythrocyte membrane bound and plasma sialic acid during aging. *Biologia*, Springer, v. 68, n. 4, p. 762–765, 2013.
- [122] KISER, Z. et al. Decreased erythrocyte binding of siglec-9 increases neutrophil activation in sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 81, p. 102399, 12 2019.
- [123] KAHANE, I. et al. Distribution of sialic acids on the red blood cell membrane in β thalassaemia. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 271, n. 5646, p. 674–675, 1978.
- [124] RACHMILEWITZ, E. A.; KAHANE, I. The red blood cell membrane in thalassaemia. *British Journal of Haematology*, v. 46, p. 1–6, 2008.
- [125] HEBBEL, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. 1991.

- [126] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.
- [127] BENEDETTO, A.; BINGHAM, R. J.; BALLONE, P. Structure and dynamics of popc bilayers in water solutions of room temperature ionic liquids. *The Journal of chemical physics*, AIP Publishing LLC, v. 142, n. 12, p. 03B622_1, 2015.
- [128] HANNEMANN, A. et al. The properties of red blood cells from patients heterozygous for hbs and hbc (hbcs genotype). *Anemia*, Hindawi, v. 2011, 2011.
- [129] NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; STEINBERG, M. H. The paradox of hemoglobin sc disease. *Blood reviews*, Elsevier, v. 17, n. 3, p. 167–178, 2003.
- [130] OLIVIERI, O. et al. Hemoglobin variants and activity of the (k⁺ cl⁻) cotransport system in human erythrocytes. 1992.
- [131] URBINATI, F.; MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: Thalassaemias. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 8, n. 10, p. 1–26, 2006. ISSN 14623994.
- [132] TURK, H. F.; CHAPKIN, R. S. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Elsevier, v. 88, n. 1, p. 43–47, 2013.
- [133] DEGIORGIO, V. Physics of amphiphiles, micelles and microemulsions. *Europhysics News*, EDP Sciences, v. 16, n. 6, p. 9–12, 1985.
- [134] ZUBIETA-CALLEJA, G. et al. Altitude adaptation through hematocrit changes. *Journal of physiology and pharmacology*, Polish Physiological Society, v. 58, n. 5, p. 811–818, 2007.
- [135] FABRY, M. E. et al. Sc erythrocytes have an abnormally high intracellular hemoglobin concentration. pathophysiological consequences. *The Journal of clinical investigation*, Soc Clin Investig, v. 70, n. 6, p. 1315–1319, 1982.
- [136] LEW, V. L.; BOOKCHIN, R. M. Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiological reviews*, American Physiological Society, v. 85, n. 1, p. 179–200, 2005.
- [137] SCHRIER MD, S. L. Thalassaemia: pathophysiology of red cell changes. *Annual review of medicine*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 45, n. 1, p. 211–218, 1994.
- [138] MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, American Society of Hematology Washington, DC, v. 112, n. 10, p. 3939–3948, 2008.
- [139] DIEZ-SILVA, M. et al. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS bulletin*, Cambridge University Press, v. 35, n. 5, p. 382–388, 2010.

- [140] BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface science reports*, Elsevier, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005.
- [141] CARDOSO-LIMA, R. et al. Sars-cov-2 unveiled: Ultrastructural and nanomechanical analysis. *Langmuir*, ACS Publications, 2021.
- [142] CHAUVET, M. et al. Sick cell trait modulates the proteome and phosphoproteome of plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Frontiers, v. 11, p. 181, 2021.
- [143] ATAGA, K. I.; CAPPELLINI, M. D.; RACHMILEWITZ, E. A. β -Thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. *British Journal of Haematology*, v. 139, n. 1, p. 3–13, 2007. ISSN 00071048.
- [144] JONG, K. de et al. Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, American Society of Hematology Washington, DC, v. 98, n. 5, p. 1577–1584, 2001.
- [145] KHEANSAARD, W. et al. Microparticles from β -thalassaemia/hbe patients induce endothelial cell dysfunction. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- [146] WILAIRAT, P.; KITTIKALAYAWONG, A.; CHAICHAROEN, S. The thalassaemic red cell membrane. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 23, p. 74–78, 1992.
- [147] TOMAIUOLO, G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, AIP Publishing LLC, v. 8, n. 5, p. 051501, 2014.
- [148] BUNN, H. F. et al. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin sc disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 79, n. 23, p. 7527–7531, 1982.
- [149] FEELING-TAYLOR, A. R. et al. Crystallization mechanisms of hemoglobin c in the r state. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 87, n. 4, p. 2621–2629, 2004.
- [150] REBELO, L. M. et al. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, IOP Publishing, v. 24, n. 5, p. 055102, 2013.
- [151] DEWAN, J. C. et al. Structure of mutant human carbonmonoxyhemoglobin c (β e6k) at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 58, n. 12, p. 2038–2042, 2002.
- [152] SHINAR, E. et al. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta-thalassaemia. *Blood*, American Society of Hematology, v. 70, n. 1, p. 158–164, 1987. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.V70.1.158.158>>.
- [153] SHINAR, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassaemia. *Semin Hematol*, v. 27, n. 1, p. 70–82, 1990.

- [154] SHINAR, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Differences in the Pathophysiology of Hemolysis of α and β Thalassemic Red Blood Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 612, n. 1, p. 118–126, 1990. ISSN 17496632.
- [155] PACE, B. S. et al. Effects of n-acetylcysteine on dense cell formation in sickle cell disease. *American journal of hematology*, Wiley Online Library, v. 73, n. 1, p. 26–32, 2003.
- [156] PERROTTA, S. et al. The n-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: implications for band 3 function. *Blood*, American Society of Hematology, v. 106, n. 13, p. 4359–4366, 2005.
- [157] MATTÉ, A. et al. The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, v. 76, p. 80–88, 2014.

A. ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Viscoelasticidade de Células do Tecido Sanguíneo por Microscopia de Força Atômica

Pesquisador: LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89646518.5.0000.5087

Instituição Proponente: Universidade Federal do Maranhão

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.683.032

Apresentação do Projeto:

As propriedades mecânicas de células vivas são de grande importância para um bom funcionamento fisiológico dos sistemas biológicos em geral, porém o conhecimento acerca das mesmas ainda é considerado limitado. Como a estrutura das células determina, muitas vezes, as suas funções, estas também podem estar associadas à mecânica celular. Assim, qualquer tipo de anormalidade em processos fisiológicos, ocasionada por uma patologia pode vir a ser relacionada com alguma alteração nas propriedades mecânicas da célula. Através da utilização de várias técnicas, em especial da Microscopia de Força Atômica, torna-se possível obter mais informações a respeito dessas propriedades e investigar os distúrbios causados por processos patológicos na micromecânica celular. Comparadas a outras células, as hemácias ou eritrócitos apresentam uma simplicidade estrutural que torna menos complexo o estudo de suas propriedades mecânicas. Além disso, a micromecânica desta célula está altamente associada a doenças como as anemias hemolíticas. Nesse projeto, propomos o uso da Microscopia de Força Atômica para a investigação das propriedades mecânicas de eritrócitos de pacientes portadores das anemias falciforme, esferocitose hereditária e da eliptocitose hereditária. Visa-se propor um parâmetro físico que, ao mesmo tempo, possa ser utilizado para a investigação laboratorial de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores dessas anemias hemolíticas e que possa ser utilizado para a avaliação da evolução de estados anêmicos.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Propor um parâmetro físico que possa ser utilizado para a investigação de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores de Anemia Falciforme e para a avaliação da evolução de seus estados anêmicos. Tal investigação será realizada, majoritariamente, utilizando a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), por meio da exploração de propriedades físicas das células, como a elasticidade e a viscoelasticidade, com a finalidade de caracterizar estrutural e mecanicamente eritrócitos de doadores sadios e portadores de Anemia Falciforme.

Objetivo Secundário:

- 1 - Caracterizar topograficamente os eritrócitos de doadores sadios e portadores de Anemia Falciforme;
- 2 - Obter um conjunto de curvas de força sobre os eritrócitos afim de construir mapas de elasticidade das células controle (doadores) e daquelas de portadores de Anemia Falciforme;
- 3 Variar a frequência do processo de indentação e a força aplicada afim de obter informações viscoelásticas das células;
- 4 - Realizar experimentos de indentação com a utilização de beads fixadas às pontas de AFM para sondar as propriedades mecânicas coletivas das RBCs;
- 5 - Utilizar as curvas de força obtidas para fomentar modelos mecânicos hertzianos, de onde se pode estimar parâmetros elásticos;
- 6 - Correlacionar os dados de propriedades mecânicas dos eritrócitos obtidos por AFM com aqueles originados de análises complementares tais como de reologia, eletroforese, Raman e MEV;
- 7 - Desenvolver uma linha de pesquisa na área de Biofísica no Departamento de Física da UFMA;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto de pesquisa não oferece riscos para os indivíduos estudados pois a amostra de sangue que será analisada será proveniente de doadores do HEMOMAR (grupo controle), cuja sorologia se encontra apta para este grupo, sendo utilizado o sangue descartado no "macarrão", não necessitando nenhuma coleta adicional de sangue, e amostras de pacientes portadores de anemias hemolíticas (grupo de estudo) também identificados por meio de sorologia no HEMOMAR.

Benefícios:

O estudo da caracterização estrutural e mecânica de alta resolução via AFM de células do tecido sanguíneo podem trazer à luz mecanismos da patologia que, combinados com ensaios clínicos, podem proporcionar um parâmetro físico que, ao mesmo tempo, possa ser utilizado para a

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

investigação laboratorial de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores dessas anemias hemolíticas e que possa ser utilizado para a avaliação da evolução de estados anêmicos e proposição de novas terapias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta todos os elementos necessários ao seu pleno desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórios foram entregues e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Não existem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1130146.pdf	07/05/2018 19:44:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SES.pdf	07/05/2018 17:39:21	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_luciana.PDF	07/05/2018 17:37:17	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infra_Lu.pdf	07/05/2018 14:56:39	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_HEMOMAR_luciana.pdf	07/05/2018 14:50:17	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	HEMOMAR.pdf	07/05/2018 14:47:10	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 29 de Maio de 2018

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br