



# REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG



**Dissertação de Mestrado**

**"Análise de curvas de agregação de hemácias obtidas por fotometria"**



**Autor: Arnaldo Nakamura Filho**

**Orientador: Prof. Antônio Valadão Cardoso**



**Dezembro de 2010**



# REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG

Arnaldo Nakamura Filho

"Análise de curvas de agregação de hemácias obtidas por fotometria"

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Análise e seleção de materiais

Orientador: Prof. Antônio Valadão Cardoso

Ouro Preto, dezembro de 2010



**REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**  
**UFOP - CETEC - UEMG**  
Pós-Graduação em Engenharia de Materiais



---

**DECLARAÇÃO**

A Coordenação da Rede Temática em Engenharia de Materiais - REDEMAT declara, para os devidos fins, que **Arnaldo Nakamura Filho**, apresentou sua defesa de dissertação intitulada “*Análise de Curvas de Agregação de Hemácias por Fotometria*”, no dia 17/12/2010, tendo sido aprovado, conforme ata em anexo.

Ouro Preto, 17 de dezembro de 2010.

  
Prof. PhD Carlos Antônio da Silva  
Coordenador da REDEMAT

## Agradecimentos

Ao Professor Antônio Valadão pela orientação, apoio, oportunidade, ensinamentos, incentivo e paciência;

ao Biólogo Antônio Vassalo pelo apoio, orientação, amizade e pelas enriquecedoras conversas no almoço;

ao CETEC por proporcionar a excelente estrutura do laboratório;

à Fundação Hemominas pela oportunidade, especialmente aos funcionários que nos acolheram com muita simpatia e disponibilidade;

a todos voluntários (doadores e pacientes), que foram peças fundamentais neste estudo;

aos avaliadores pela contribuição;

à REDEMAT pelo suporte financeiro;

aos colegas do laboratório de Bioreologia;

aos primos Luciano, Flávio e Leandro;

à minha companheira Livia Helena Diniz e toda sua família, em especial minha sogra Maria Porcina, e

à minha Família.

Minha eterna gratidão a todos vocês, muito obrigado!

“O sangue é um suco verdadeiramente notável.” - Goethe,  
Mefistófeles a Fausto.

## Resumo

Foram investigadas as microestruturas do sangue de 50 amostras de doadores de sangue e 16 amostras de portadores de Anemia Falciforme utilizando duas pipetas diferentes e um equipamento de uso corrente, o Leitor de Microplacas, também chamado de “Leitor de E.L.I.S.A”. Apresentamos aqui a interpretação das curvas de absorvância (A) em função do tempo(s), obtidas com esta técnica. A técnica abrange o processo completo que ocorre com o sangue em repouso: primeiro os eritrócitos agregam-se formando rolos (roleaux) e esses rolos tendem a se unirem uns aos outros formando uma rede desorganizada (gel); o gel tende a densificar, se compactado e começa a sedimentar; por final, os agregados que se sedimentam tendem a tornarem-se cada vez mais compactos pela formação contínua de novos contatos entre os agregados e pela expulsão de plasma do seu interior. São apresentados a comparação entre os resultados para amostras de sangue de doadores e sangue de portadores de Anemia Falciforme, levando-se em consideração o gênero e o tipo de pipeta utilizada nos ensaios, bem como as análises estatísticas dos resultados. Não houve diferença entre os gêneros, entre os grupos apenas a etapa de agregação é diferente e entre as pipetas apenas os valores de absorvância diferenciam as curvas.

## ***Abstract***

We have investigated the microstructures of 50 blood samples from donors and 16 samples from patients with sickle cell disease using two types of different pipettes and one very well-known equipment, the Microplate Reader, also called "ELISA reader". We presented the interpretation of the curves of absorbance (A) versus time (s), obtained with this technique. The technique covers the entire process that occurs in the blood at rest: first the red cells have to aggregate to form rolls (roleaux) and these rolls are joined to each other to forming a disorganized network (gel). Soon after formed this gel begins a process of contraction resulting from the continued formation of new contacts between the red cells. Along with the formation of new contacts, sedimentation of the gel also reinforces the tendency towards increasing densification with the expulsion of plasma from its interior. This is the stage of compaction which is increased on healthy (deformable) red blood cells. We also present and compared the results of essays employing this technique using blood samples from donors and carriers of sickle cell disease. Finally we show the optimization of some important parameters of the test such as temperature, type of pipette, time, gender, etc and present the statistical analysis of the results. There wasn't difference between gender, between groups only the aggregation step is different and between pipettes only the absorbance values of the curves can differ each other.

## Lista de Figuras

- Figura 1.1: Representação do fluxo laminar dentro de um vaso sanguíneo. Nota-se a maior velocidade nas camadas mais internas do fluido e o surgimento da tensão cisalhante ( $\tau$ ) e a resistência para fluir ( $\eta$ ). ..... 4
- Figura 1.2: Perdas por reflexão e espalhamento (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). .... 12
- Figura 1.3: Descrição do sistema ótico do Leitor de Elisa (MARTINS, 2007a). ..... 13
- Figura 1.4: Fotomicrografia de sangue SS com aumento de 40x destacando a presença de vários eritrócitos em forma de foice. .... 15
- Figura 1.5: Hemoglobina normal e falciforme. (a) Diferenças sutis entre as conformações da hemoglobina A e S resultam da troca de um único aminoácido nas cadeias  $\beta$ . (b) Em consequência dessa troca, a desoxihemoglobina S tem uma região hidrofóbica na superfície, que causa a agregação das moléculas em cordões, os quais se alinham formando fibras insolúveis (NELSON e COX, 2002). ..... 16
- Figura 1.6: Fibra de deoxiHbS 220Å de diâmetro. Micrografia eletrônica de uma fibra. O desenho indica a relação entre as vertentes interna e externa; cada esfera representa uma molécula HbS individual. As fibras possuem camadas repetidas a cada 64Å de distância e uma torção moderada que se repete a cada 350Å ao longo do eixo da fibra (VOET e VOET, 2004). ..... 17
- Figura 1.7: Modelo da vista de uma seção transversal da fibra de HbS, baseado na estrutura e reconstruções tridimensionais de microscopia eletrônica da fibras (VOET e VOET, 2004). ..... 17
- Figura 3.1: Fluxograma representando a sequência das etapas realizadas para obtenção dos dados amostrais. .... 20
- Figura 3.2: Fotografias das pipetas utilizadas nos ensaios de agregação. A – Pipeta multicanal eletrônica com 12 canais. B – Pipeta monocanal com deslocamento positivo. Nota-se a presença de um êmbolo na ponteira da pipeta B ..... 24
- Figura 3.3: Gráfico representando a distribuição típica de respostas biológicas. .... 26
- Figura 3.4: Gráfico da absorbância em função do tempo, demonstrando os pontos utilizados para as análises estatísticas. Em vermelho o ponto denominado absorbância inicial ( $ABS_0$ ), em verde o ponto denominado tempo de agregação ( $tA$ ) e em azul o ponto denominado tempo do pico ( $tP$ ). ..... 27
- Figura 4.1: Fotomicrografias óticas nos aumentos de 4x, 10x, 40x e 100x com sangue de doadores e pacientes, com as devidas escalas. .... 32
- Figura 4.2: Valores da viscosidade do plasma: Gráfico representando os valores da viscosidade do plasma dos doadores e pacientes obtidos com viscosímetro cone-placa. Os valores entre as linhas representam os valores para a viscosidade do plasma de indivíduos sadios à temperatura de 37°C independente do gênero e da idade segundo Rampling (1989). A cor azul representa o sexo masculino e vermelho o sexo feminino. Os círculos representam os doadores e os quadrados os pacientes. .... 34
- Figura 4.3: Dados experimentais obtidos no Leitor de Microplacas e imagens de estereoscopia de um micropoço de uma “placa de Elisa” com a amostra de sangue humano normal. Hematócrito de 20% (v/v) (Martins, 2007a) ..... 35



- Figura 4.4: Curva representando os fenômenos que ocorrem quando o sangue é deixado em repouso. 1 – Curva da formação dos rolos. 2 – Formação de agregados tridimensionais (gel). 3 – continuação da sedimentação dos agregados tridimensionais (gel) e compactação dos mesmos no fundo do poço. .... 36
- Figura 4.5: Esquema representativo da direção do feixe de luz que atravessa o micropoço, durante as leituras no leitor de microplacas. .... 37
- Figura 4.6: Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio das 50 amostras de sangue dos doadores, separados por gênero, utilizando a pipeta multicanal eletrônica. A curva em azul representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo masculino. A curva em vermelho representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo feminino. .... 38
- Figura 4.7: Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos doadores, separados por gênero, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo. A curva em azul representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo masculino. A curva em vermelho representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo feminino. .... 39
- Figura 4.8: Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme, separados por gênero, utilizando a pipeta multicanal eletrônica. A curva em preto representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo masculino. A curva em laranja representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos pacientes com de Anemia Falciforme do sexo feminino. .... 40
- Figura 4.9: Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme, separados por gênero, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo. A curva em cinza representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo masculino. A curva em laranja representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo feminino..... 41
- Figura 4.10: Gráfico da absorbância em função do tempo evidenciando a diferença no comportamento das curvas de agregação obtidas com sangue de doadores utilizando as pipetas multicanal eletrônica e monocanal com deslocamento positivo. .... 42
- Figura 4.11: Ponteira utilizada nos ensaios realizados com a pipeta multicanal eletrônica, seu destacando o formato cônico e a ausência do êmbolo interno. .... 43
- Figura 4.12: Ponteira utilizada nos ensaios realizados com a pipeta monocanal específica para líquidos viscosos, destacando seu formato cilíndrico e a presença do êmbolo interno..... 43

Figura 4.13: Gráfico da absorvância em função do tempo mostrando o comportamento das curvas obtidas com sangue de pacientes com Anemia Falciforme. Nota-se a diferença no comportamento das curvas de agregação utilizando as pipetas multicanal eletrônica e monocanal com deslocamento positivo. ....	44
Figura 4.14: Gráfico da absorvância em função do tempo, indicando a diferença entre as curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores e dos pacientes com Anemia Falciforme, utilizando a pipeta multicanal eletrônica. ....	45
Figura 4.15: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a diferença entre as curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores e dos pacientes com Anemia Falciforme, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo.....	46
Figura 5.1: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo masculino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto. ....	50
Figura 5.2: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo feminino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto. ....	50
Figura 5.3: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo masculino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.....	51
Figura 5.4: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo feminino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.....	51
Figura 5.5: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos seis resultados das amostras dos pacientes do sexo masculino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto. ....	53
Figura 5.6: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos dez resultados das amostras dos pacientes do sexo feminino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto. ....	54

Figura 5.7: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos seis resultados das amostras dos pacientes do sexo masculino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto..... 54

Figura 5.8: Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos dez resultados das amostras dos pacientes do sexo feminino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto..... 55

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Tabela utilizada para calcular o valor da variância do erro ( $s^2$ ), onde n é o número total de amostras, t o número total de tratamentos realizados nas amostras e gl os graus de liberdade. ....	29
Tabela 5.1: Estatística descritiva dos valores da viscosidade do plasma ( $\eta$ ) das amostras de sangue dos doadores. X - representa o valor médio, s - o desvio padrão e CV - o coeficiente de variação dos dados. ....	47
Tabela 5.2: Estatística descritiva dos valores da viscosidade do plasma das amostras de sangue dos pacientes. X- representa o valor médio, s - o desvio padrão e CV - o coeficiente de variação dos dados. ....	48
Tabela 5.3: Tabela com os intervalos de confiança das médias obtidas com os valores da viscosidade do plasma dos doadores, separados por gênero, com probabilidade de erro (p) igual a 0,05. ....	48
Tabela 5.4: Tabela com os intervalos de confiança das médias obtidas com os valores da viscosidade do plasma dos doadores, separados por gênero, com probabilidade de erro (p) igual a 0,05. ....	48
Tabela 5.5: Estatística descritiva dos pontos $ABS_0$ , $ABS_A$ , $ABS_P$ , tA e tP para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta multicanal eletrônica. X representa a média, s o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. ....	52
Tabela 5.6: Estatística descritiva dos pontos $ABS_0$ , $ABS_A$ , $ABS_P$ , tA e tP para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta monocal eletrônica. X representa a média, s o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. ....	52
Tabela 5.7: Estatística descritiva dos pontos $ABS_0$ , $ABS_A$ , $ABS_P$ , tA e tP para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta multicanal eletrônica. X representa a média, s o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. ....	56
Tabela 5.8: Estatística descritiva dos pontos $ABS_0$ , $ABS_A$ , $ABS_P$ , tA e tP para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta monocal eletrônica. X representa a média, s o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. ....	56
Tabela 5.9: Intervalos de confiança, obtidos pelo método de comparação de pares, dos pontos $ABS_0$ , tA, $ABS_A$ , tP, e $ABS_P$ , com os resultados das amostras de sangue dos doadores, separados pelo gênero. p é a probabilidade de erro. ....	57
Tabela 5.10: Intervalos de confiança, obtidos pelo método de comparação de pares, dos pontos $ABS_0$ , tA, $ABS_A$ , tP, e $ABS_P$ , com os resultados das amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme. p é a probabilidade de erro. ....	58
Tabela 5.11: Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos sexos masculino e feminino, do grupo dos doadores. ....	59
Tabela 5.12: Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos sexos masculino e feminino, do grupo dos pacientes. ....	60
Tabela 5.13: Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos doadores e pacientes do sexo masculino. Probabilidade de erro (p) de 5%. ....	61
Tabela 5.14: Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos doadoras e pacientes do sexo feminino. Probabilidade de erro (p) de 5%. ....	62

## Lista de Abreviaturas Símbolos e Siglas

$\tau$  - tensão cisalhante

A ou ABS – absorvância ou absorvância

$dy/dt$  – taxa de cisalhamento

ESR (Erithrocyte Sedimentation Rate) – taxa de sedimentação eritrocitária

HbF – hemoglobina fetal

HbS – hemoglobina S

kg – kilograma

M – Mega ( $10^6$ )

ml – mililitro

MPa – Megapascal

Pa – Pascal

s – segundo

SS – genótipo referente à Anemia Falciforme

u.a. ou unid. arb. – unidade arbitrária

$\eta$  - viscosidade (MPa.s)

$\lambda$  - comprimento de onda

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrometro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Os eritrócitos.....	2
1.2	Bioreologia.....	3
1.3	Agregação eritrocitária.....	6
1.4	Sedimentação.....	9
1.5	Espectrofotometria.....	10
1.6	Anemia Falciforme.....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1	Procedimento de abordagem e inclusão de doadores e pacientes.....	21
3.2	Coleta e armazenamento das amostras.....	22
3.3	Determinação e ajuste do hematócrito.....	22
3.4	Determinação da viscosidade do plasma.....	23
3.5	Ensaio no Leitor de Microplacas.....	23
3.6	Microestrutura do sangue utilizando Microscopia Ótica.....	25
3.7	Análises estatísticas.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4.1	Fotomicrografias.....	31
4.2	Valores da viscosidade do plasma.....	33
4.3	Formato da curva de agregação-sedimentação-compactação do sangue.....	35
4.3.1	Curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores.....	38
4.3.2	Curvas obtidas das amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme.....	40
4.4	Influência do tipo de pipeta.....	42
4.5	Diferenças entre os grupos amostrados.....	45
<b>5</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>47</b>
5.1	Estatística descritiva da viscosidade plasmática.....	47
5.2	Estatística descritiva para as amostras de sangue dos doadores.....	49
5.3	Estatística descritiva para as amostras de sangue dos pacientes.....	53
5.4	Comparação entre pares (pareamento).....	57
5.5	Comparação entre os gêneros dentro dos grupos experimentais.....	59
5.6	Comparação entre os grupos experimentais do mesmo gênero.....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O sangue é o constituinte principal do sistema transporte do corpo, de modo que todas as funções que lhe são atribuídas são inteiramente dependentes de sua circulação. Portanto, as funções do sangue são estreitamente ligadas às do sistema circulatório, que se encarrega de criar a energia mecânica necessária para que o sangue circule, sendo distribuído por todo o organismo. Deve-se compreender, então que o sistema circulatório (contênte) e o sangue (conteúdo) constituem uma unidade: o primeiro não tem razão de ser se está vazio, o segundo não cumpre nenhuma função separada daquele. Devido à função de transporte que o sangue possui, ele participa direta ou indiretamente de todas as funções do corpo, como: respiratória, nutritiva, excretora, imunitária, regulação térmica, tamponante do pH e comunicação hormonal. Todas as células do organismo necessitam do aporte contínuo de oxigênio e de substâncias nutritivas para cumprir os fenômenos vitais que lhes são característicos, além disso, necessitam liberar seus produtos de resíduo metabólico. Essas células, com exceção das sanguíneas, encontram-se submersas na porção do meio interno conhecido como líquido intersticial. Esse líquido constitui o meio externo imediato para cada célula, com o qual realizam uma troca ativa: obtêm dele o oxigênio e as substâncias nutritivas e cedem a ele seus produtos residuais. Para que o líquido intersticial possa efetuar tais funções, fornecer substâncias às células e livrá-las de seus produtos de excreção, é necessário que, por sua vez, receba as primeiras e possa liberar os segundos. Para satisfazer essas necessidades, o líquido intersticial encontra-se em íntimo contato com o sangue, por meio dos capilares sanguíneos de circulação sistêmica, dos quais recebe continuamente oxigênio e alimentos e aos quais cedem os produtos residuais do metabolismo (HOUSSAY e CINGOLANI, 2004).

O sangue é o fluido biológico mais importante, devido às suas funções de transporte, defesa e regulação (VILELA, 1941). É composto basicamente por gases, minerais, hidrocarbonatos, lipídeos, proteínas, vitaminas, hormônios e por alguns tipos de células, essencialmente, os eritrócitos (99%), glóbulos brancos e as plaquetas (1%), todos suspensos em uma fase líquida denominada plasma (~57% do volume). O sangue pode ser separado em três frações: as células, o plasma e o soro (plasma sem fibrinogênio, liberado após a contração do coágulo no processo de coagulação do sangue). (YAROSLAVSKY, PREIZZHEV, *et al.*, 2002).

O plasma é, geralmente, constituído de 90% de água, 8% de proteínas plasmáticas como a albumina e a globulina, 1% de substâncias inorgânicas e 1% de outras substâncias orgânicas. Existe no sangue de 5.000 a 8.000 glóbulos brancos por  $\text{mm}^3$  e 250.000 a 300.000 plaquetas por  $\text{mm}^3$ , possuindo um diâmetro de cerca de  $2,5\mu\text{m}$  (MONTE, PALHARES e DA MOTTA, 2002). Os glóbulos brancos (leucócitos) apresentam diversas formas e tamanhos (ROSSETT e ABATTI, 2002) e ocupam uma fração volumétrica muito pequena. Eles não geram distúrbios e seus efeitos reológicos no sangue são desprezíveis (MARTINS, 2007a).

## 1.1 Os eritrócitos

Os eritrócitos são discos bicôncavos que apresentam de  $6-8\mu\text{m}$  de diâmetro e  $2\mu\text{m}$  de espessura; em mamíferos as células são anucleadas e consistem de uma solução concentrada de hemoglobina envolta por uma membrana altamente flexível. A principal função dos eritrócitos é carrear oxigênio dos pulmões para os tecidos e carrear dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão. Os eritrócitos normalmente ocupam cerca de 40% do volume sanguíneo (cerca de  $5.000.000/\text{mm}^3$ ) (POPEL e JOHNSON, 2005).

A membrana eritrocitária forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular e consiste de uma membrana plasmática com sistema estrutural complexo, bicamada lipídica (representa 50% da massa total da membrana) e proteínas associadas, e um citoesqueleto subjacente, que regula a forma da célula, sua mobilidade e deformabilidade, e o transporte de macromoléculas. Os elementos principais do citoesqueleto são espectrina, actina e proteína 4.1. Estas proteínas formam uma rede viscoelástica que é responsável pela manutenção da integridade estrutural da célula. A bicamada lipídica é responsável pela manutenção da área superficial da membrana. A intrincada diversidade expressa na membrana eritrocitária define a identidade biológica de cada um, reconhecendo o caráter único dos seres vivos (MURADOR e DEFFIUNE, 2007).

O glóbulo vermelho caracteriza-se por um suporte protéico encerrando o pigmento respiratório – a Hemoglobina. Quase todo o oxigênio circulante está ligado à molécula de hemoglobina e o restante está dissolvido no citosol das hemácias ou no plasma sanguíneo. Portanto, a distribuição do oxigênio nos diferentes órgãos é determinada pela quantidade de oxigênio no sangue e pelo fluxo sanguíneo. (HOUSSAY e CINGOLANI, 2004).



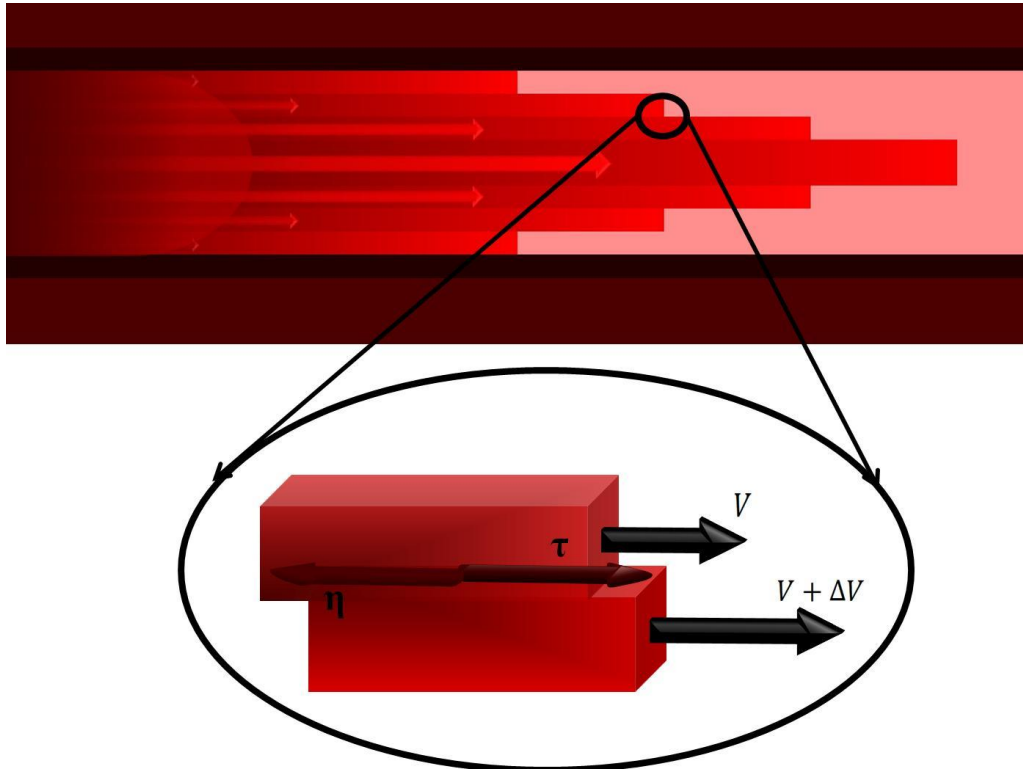
## 1.2 Bioreologia

A bioreologia é o ramo das ciências biológicas que estuda o fluxo e a deformação de materiais biológicos sob influência de restrições aplicadas a ele. O ramo da bioreologia que estuda especificamente o sangue é a hemoreologia. Seu propósito é estudar o fluxo sanguíneo interagindo com o meio que o circunda, tanto na macro como na microcirculação (BRUN, CONNES e VARLET-MARIE, 2007).

O estudo das características reológicas do sangue (hemoreologia) é de grande interesse, pois o sangue é um fluido biológico constituído de vários elementos figurados e macromoléculas capazes de alterar a viscosidade da suspensão sanguínea. A alteração dessas características é responsável por uma série de complicações vasculares (MARTINS, 2007a).

No início do século XX, Robin Fahraeus, um patologista escandinavo, começou a explorar as propriedades do fluxo sanguíneo. Já nas últimas décadas, a natureza dinâmica do fluxo sanguíneo e seu comportamento reológico começaram a ser amplamente investigado. O desenvolvimento de técnicas adequadas para estudar o comportamento do fluxo sanguíneo e seus componentes, juntamente com a evolução dos modernos conceitos de dinâmica de fluidos, tem contribuído para o crescimento da hemoreologia.

Quando o sangue circula pelos vasos, seu fluxo é guiado pelo gradiente de pressão entre o coração e a periferia, gerando uma força de fricção na superfície do endotélio. Esta força cria uma tensão cisalhante  $\tau$  na parede do vaso. Devido a forças de coesão entre a parede e o fluido e dentro do próprio sangue, a velocidade do fluxo sanguíneo é menor nas proximidades da superfície do endotélio do que no meio do vaso, definindo assim a taxa de cisalhamento  $\dot{\gamma}$  ( $\dot{\gamma} = d\gamma/dt$ ). Esta diferença na velocidade reflete uma intrínseca resistência para fluir, a qual é denominada viscosidade sanguínea aparente  $\eta_{ap} = d\tau/d\dot{\gamma}$  (figura 1.1) (BASKURT e MEISELMAN, 2003; CARDOSO, PEREIRA, *et al.*, 2007).



**Figura 1.1:** Representação do fluxo laminar dentro de um vaso sanguíneo. Nota-se a maior velocidade nas camadas mais internas do fluido e o surgimento da tensão cisalhante ( $\tau$ ) e a resistência para fluir ( $\eta$ ).

A viscosidade aparente do sangue depende da magnitude da tensão de cisalhamento existentes, determinada pelo hematócrito, viscosidade do plasma, agregação eritrocitária e as propriedades mecânicas das hemácias. A viscosidade sanguínea aparente “in vivo” é menor que os valores obtidos “in vitro” por viscosimetria (BASKUT, YALCIN e MEISELMAN, 2004).

A viscosidade sanguínea pode ser descrita pela equação do cientista Daniel Quemada:

$$\eta = \eta_p(1 - 0,5\mathbf{k}\phi)^{-2} \quad (1.1)$$

onde  $\phi$  é o hematócrito (porcentagem do volume total de sangue ocupado pelas células),  $\eta_p$  é a viscosidade do plasma, e  $\mathbf{k}(\dot{\gamma})$  é o parâmetro cisalhamento-dependente que quantifica a contribuição do eritrócito nas propriedades reológicas da viscosidade do sangue total. Nas altas taxas de cisalhamento,  $\mathbf{k}(\dot{\gamma})$  representa a rigidez do eritrócito (quanto menor  $\mathbf{k}$ , maior é a

deformabilidade), enquanto que nas baixas taxas de cisalhamento  $k(\dot{\gamma})$  tende a um máximo ( $k_0$ ) que é proporcional à habilidade de formar agregados (agregabilidade eritrocitária).

O modelo demonstra que a viscosidade sanguínea depende de três fatores (BRUN, CONNES e VARLET-MARIE, 2007):

- viscosidade plasmática, determinada pela concentração de proteínas plasmáticas;
- hematócrito, que pode variar rapidamente de acordo com a área da circulação e as condições fisiológicas;
- deformabilidade e agregabilidade das células vermelhas, que são influenciados pelo metabolismo e pelos hormônios.

As propriedades reológicas do sangue dependem da taxa de cisalhamento, tempo, dimensões e geometria do sistema no qual ele está contido. As principais propriedades reológicas do sangue, incluindo as características não-newtonianas (a viscosidade não é constante), têm sido estudadas durante muitos anos através de estudos de viscosidade, que utilizam, por exemplo, viscosímetros de cilindros rotacionais e viscosímetros por queda de esfera. Estes estudos têm fornecido informações valiosas sobre as propriedades do sangue em condições bem definidas, mas por várias razões estas informações são insuficientes para o entendimento do comportamento do fluxo sanguíneo, especialmente na microcirculação. As propriedades reológicas do sangue na microcirculação, com seus milhares de segmentos de diferentes comprimentos, diâmetros e taxas de fluxo, não podem ser adequadamente previstas num sistema simples como o da viscosimetria. E também porque na microcirculação as superfícies internas dos vasos retardam, em diferentes graus dependendo da taxa do fluxo, o fluxo sanguíneo nas imediações da parede. Além disso, as células endoteliais que revestem a parede das vênulas, capilares e arteríolas são dotadas de receptores que interagem com ligantes das células brancas e possibilitam a sua adesão à parede, permitindo em alguns casos a sua migração para os tecidos (POPEL e JOHNSON, 2005; CARVALHO, 2006).

### 1.3 Agregação eritrocitária

A propriedade de agregação dos eritrócitos foi descrita primeiro pelo médico John Hunter em 1786 e foi considerada durante muito tempo de importância fisiopatológica visto que a agregação se torna elevada em muitos estados patológicos; em 1965 surgiu então o termo “sedimento sanguíneo” cunhado por Kinsley para descrever o fenômeno (BISHOP, POPEL, *et al.*, 2001).

Em várias espécies de animais, assim como nos humanos, os eritrócitos, que normalmente são monodispersos, tendem a agregar na presença de certas macromoléculas como fibrinogênio, imunoglobulinas (IgG, IgM), dextran, polilisina, lipoproteínas e formar estruturas parecidas com pilhas de moedas chamadas de “rouleaux” (rolos). Existe uma relação entre a concentração de proteínas agregantes e a velocidade de formação dos agregados (SCHIMID-SCHÖBEIN, MALOTTA e STRIESOW, 1990) e, os agregados tendem a ramificar-se, formando estruturas em forma de rede (SAMSEL e PERELSON, 1982; CARDOSO e CAMARGOS, 2002; MARTINS, CARDOSO, *et al.*, 2007).

Os agregados de hemácias formam-se quando as células ficam muito próximas e o processo de agregação inicia-se quando dois eritrócitos estão a aproximadamente 25nm de distância (PRIEZZHEV, FIRSOV e LADEMANN, 2002). Existem duas explicações para a ocorrência do fenômeno:

- *a teoria de ligações por pontes*, onde macromoléculas de cadeias longas (fibrinogênio ou *dextrans*) podem ser adsorvidas na superfície de mais de uma célula, gerando um efeito de ligação entre as células de modo que as forças de agregação ultrapassem as de desagregação (BASKURT e MEISELMAN, 2003). Os requisitos para este processo são: eletrólitos, macromoléculas neutras ou negativamente carregadas em solução e hemácias metabolicamente ativas. Se estas condições não estão presentes, os eritrócitos não irão agregar (SAMSEL e PERELSON, 1982). De acordo com o modelo, macromoléculas grandes constituintes do plasma, como o fibrinogênio, IgG, IgM e lipoproteínas são adsorvidas nas superfícies dos eritrócitos. Quando duas células aproximam-se, o lado livre dessas macromoléculas, adsorvidas anteriormente na superfície de uma célula, é adsorvida na superfície de uma segunda célula. Esta é a forma como uma “ponte” é formada. O movimento das células em torno dessa ligações resulta na formação de outras pontes. A força de coesão resultante, que mantém células individuais agregadas, corresponde ao montante de ligações formadas entre elas. As forças de ligação são não-específicas e surgem apenas quando células

individuais (separadas ou como partes de agregados) aproximam-se casualmente umas das outras a partir de uma distância crítica. (KATCHALSKY, DANON, *et al.*, 1959; CHIEN, 1973; RAMPLING, 1989; MAEDA, IZUMIDA, *et al.*, 1990). Além das ligações não-específicas do fibrinogênio na membrana existem ligações específicas do fibrinogênio na membrana eritrocitária, sugerindo a possibilidade de terapia com drogas que resultem numa significativa diminuição da agregação eritrocitária em diferentes patologias (LOMINADZE e DEAN, 2002). Certas proteínas plasmáticas, presentes em estados patológicos na qualidade de anticorpos, são agentes potentes na alteração da superfície do eritrócito, e afetam a agregação (BURTON, 1977).;

- *a teoria da depleção*, onde a redução da concentração de macromoléculas nas proximidades das hemácias, gera um gradiente osmótico, causando expulsão de fluido do espaço intercelular, diminuindo a afinidade célula-solvente e criando uma região de subpressão na fronteira entre as duas células, com isso, aumentando a tendência de aproximação entre as células (NEU e MEISELMAN, 2002).

Estes dois modelos apresentam discordância quanto à natureza exata das forças de agregação. Eles prevêem efeitos contraditórios sobre a agregação dos glóbulos vermelhos, com aumento da concentração de macromoléculas perto da superfície da célula. De acordo com o modelo de ligação por pontes, a agregação deve aumentar, enquanto no modelo de depleção preve-se a diminuição da agregação (BASKURT e MEISELMAN, 2003).

Essas duas vertentes concordam que a força de aderência total entre duas células é máxima quando as células estão orientadas face a face (*en face*), o que é comumente encontrado quando as células estão organizadas em rolos (*rouleaux*) (BISHOP, POPEL, *et al.*, 2001).

A agregação de hemácias é um processo que ocorre tanto “in vivo” como “in vitro” (SCHIMID-SCHÖBEIN, MALOTTA e STRIESOW, 1990), é o fator dominante nas propriedades reológicas do sangue “in vitro” (LIU e LIU, 2006) e é constituído de duas etapas: primeiro, os eritrócitos se associam em longas cadeias (formação de rolos). À medida que essas cadeias vão sendo formadas, elas tocam umas as outras, estabelecendo ligações entre elas e formando uma estrutura desorganizada em forma de rede (gel). Para reduzir a energia livre de superfície, essas cadeias tendem a formar agregados que podem ser caracterizados como esferas sendo que o raio dessas esferas depende do meio e do hematócrito (FABRY, 1987).

A formação de agregados é um dos principais mecanismos que conferem ao sangue a característica não-newtoniana quando submetido a fluxos viscométricos “in vitro” (SCHIMID-SCHÖBEIN, MALOTTA e STRIESOW, 1990).

O eritrócito necessita de um eficiente sistema de estabilização que impede a formação de agregados muito resistentes, em condições fisiológicas. Este sistema é baseado em forças de repulsão eletrostática. A superfície da membrana do eritrócito é coberta com grupos carboxi do ácido siálico carregados negativamente. Eles fornecem a membrana cargas eletrostáticas negativas que impedem uma aproximação muito estreita entre as células. A energia de interação eletrostática entre duas células normalmente carregadas, separadas a uma distância de 20nm é de cerca de  $1,9 \times 10^{-14}$ J por célula. A repulsão electrocinética é um dos mecanismos que mantém a estabilidade da suspensão de glóbulos vermelhos. A neutralização das cargas elétricas nas membranas dos glóbulos vermelhos, tratando-as com neuraminidase, aumenta fortemente o processo de agregação de sangue (PRIEZZHEV, FIRSOV e LADEMANN, 2002).

A agregação eritrocitária é um processo reversível e dinâmico. Em condições de fluxo cisalhante, os agregados perdem células únicas ou grupos de células e adquirem outras. Os agregados alteram seu tamanho médio, de acordo com a taxa de cisalhamento do fluxo e a força de coesão entre as células. O aumento na taxa de cisalhamento favorece a separação das células dos agregados e a redução favorece a formação dos agregados maiores.

Análises por difratometria a laser demonstram que, em altas taxas de cisalhamento, a viscosidade do meio intercelular (solução de hemoglobina) é o principal fator envolvido na deformabilidade dos eritrócitos, enquanto em baixas taxas são as propriedades viscoelásticas da membrana e o formato das células (PRIEZZHEV, FIRSOV e LADEMANN, 2002).

A configuração exata de um grupo de células depende das condições locais de taxa de cisalhamento, concentração de células (hematócrito) e as mais variadas formas complexas que se pode encontrar, desde simples rolos a redes ramificadas de rolos e a formas esferoidais mais compactas (POPEL e JOHNSON, 2005).

Novos métodos automáticos baseados em técnicas fotométricas estão sendo desenvolvidos; estes dispositivos são baseados na medição da reflexão da luz ou na transmissão da luz através da suspensão de glóbulos vermelhos. A agregação reduz o número e aumenta o tamanho das partículas e, portanto, informações relacionadas com a medida, taxa e força de agregação podem ser obtidas. Técnicas microscópicas também podem ser usadas

para quantificar a agregação de hemácias, observando o número de agregados por unidade de volume de uma suspensão com hematócrito reduzido (JAYAVANTH e SINGH, 2004).

#### 1.4 Sedimentação

Existe uma pequena diferença ( $0,07\text{g/cm}^3$ ) entre a densidade dos glóbulos vermelhos e a densidade do plasma. Esta diferença provoca a deposição das células suspensas no plasma, em velocidade baixa (velocidade de sedimentação).

O princípio físico envolvido na sedimentação das hemácias é a lei de Stokes (1845):

$$F_{\eta} = 6\pi\eta Va \quad (1.2)$$

onde George Stokes demonstrou que uma esfera de raio  $a$  (cm), caindo através de um fluido viscoso, em regime laminar, de viscosidade  $\eta$  deve experimentar um empuxo ( $F_{\eta}$ ) proporcional à velocidade de queda ( $v$ ). Quando o empuxo se iguala com a força gravitacional a partícula esférica atinge uma velocidade terminal.

Quando a velocidade terminal é alcançada, temos:

$$v_t = 2/9 a^2 \frac{(\rho_1 - \rho_2)g}{\eta} \quad (1.3)$$

onde  $\rho_1$  é a densidade do solvente,  $\rho_2$  é a densidade da partícula e  $a$  o raio da esfera.

Nota-se que a velocidade terminal é proporcional ao quadrado do raio das partículas em sedimentação. Portanto, mantendo-se a força gravitacional ( $g$ ) e a viscosidade ( $\eta$ ) constantes, a velocidade de sedimentação é uma medida do tamanho efetivo da partícula ou agregado de partículas que está sedimentando.

Outras variáveis devem ser introduzidas na lei de Stokes (1.2) para se descrever o complexo movimento de sedimentação dos eritrócitos, devido a alguns fatores como o

formato discóide dos eritrócitos, a relação entre forma e volume, a orientação das células e ainda a agregação das hemácias.

O principal fator responsável pelas alterações da velocidade de sedimentação é a dinâmica da nucleação e crescimento, de modo que a velocidade de sedimentação é uma medida da tendência dos eritrócitos aderirem uns aos outros (BURTON, 1977).

O movimento das partículas em suspensão podem ser afetadas por suas interações, algumas técnicas ópticas podem ser utilizadas para analisar os efeitos dessas interações na formação do sedimento de hemácias (GRZEGORZEWSKI e KOWALINSKA, 2002).

A cinética de sedimentação do sangue pode ser avaliada por diversos métodos, sendo que o mais comum é o teste da velocidade de hemossedimentação (VHS), em que a sedimentação dos glóbulos vermelhos é observada em um tubo de vidro colocado na vertical. No entanto, o VHS é um método relativamente lento e fornece um único tipo de dado (agregados de hemácias após uma hora de sedimentação) (BASKURT, HARDEMAN, *et al.*, 2007).

## 1.5 Espectrofotometria

Espectrofotômetros são aparelhos construídos para quantificar a fração de luz absorvida (ou transmitida) por determinada amostra em função do comprimento da onda luminosa. A utilização de espectrofotômetros, especificamente o leitor de microplacas, para a investigação do fenômeno da agregação foi proposto por O'Brian em 1962, onde foi investigado o fenômeno da coagulação do sangue. Muitos métodos fotométricos são utilizados em laboratórios para estudos rotineiros de coagulação. Entre eles, o teste de 1-agregação plaquetária e 2-coagulação ou de 3-clivagem do fibrinogênio são especialmente importantes devido à sua simplicidade. Como o número de amostras, que podem ser analisadas simultaneamente por métodos fotométricos é limitado a uns poucos, e devido às propriedades das amostras de sangue dependerem fortemente do tempo entre a coleta do sangue e a análise, o problema da interpretação correta dos resultados obtidos surge com muita frequência (WALKOMIAK, KESY e MICHALEC, 1997). Um instrumento já existente - como uma leitora de microplacas - poderia talvez resolver o problema com sucesso. Com o leitor de microplacas podemos acompanhar simultaneamente as mudanças na absorção da luz (ou transmissão) num número muito grande de amostras.

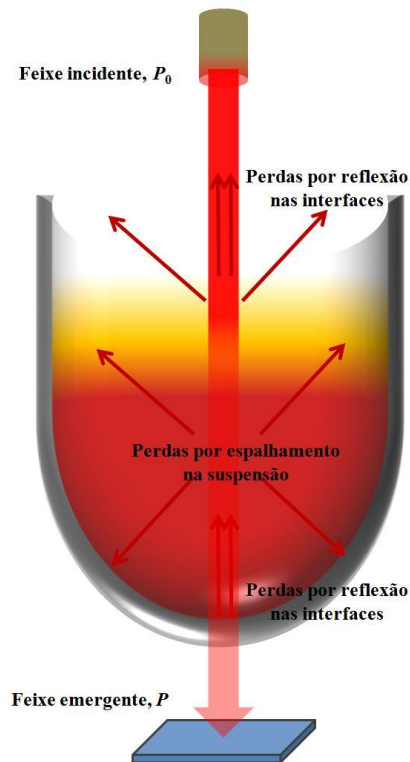


A espectroscopia de absorção está baseada na medida da transmitância (T) ou absorbância (absorvância ou absorvência) (A) de suspensões contidas em cubetas ou células transparentes com a distância percorrida pelo feixe em b (cm). De forma comum, a concentração c de uma amostra absorvente está relacionada linearmente à absorbância, conforme a relação combinada de Lambert-Beer dada pela equação:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (1.4)$$

onde  $I_0$  e  $I$  representam respectivamente a intensidade da radiação incidente e emergente e  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar e c é a concentração da fase em estudo. Essa equação é uma expressão matemática da lei empírica de Beer (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; BASHFORD e HARRIS, 1987).

Normalmente, a transmitância e a absorbância, são medidas em laboratório utilizando-se de um recipiente transparente, ou cubeta. Como mostra a figura 1.2, ocorre reflexão nas duas interfaces ar/amostra bem como na interface amostra/parede. A atenuação resultante do feixe de luz é substancial. Além disso, pode ocorrer atenuação de um feixe de luz por espalhamento por moléculas grandes e às vezes, por absorção das paredes do recipiente. Para observar esses efeitos, a potência do feixe transmitido pela amostra é comparada com a potência do feixe incidido sobre a amostra. A absorbância experimental, que se aproxima muito da real, é obtida através da lei de Beer (equação (1.4) (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).



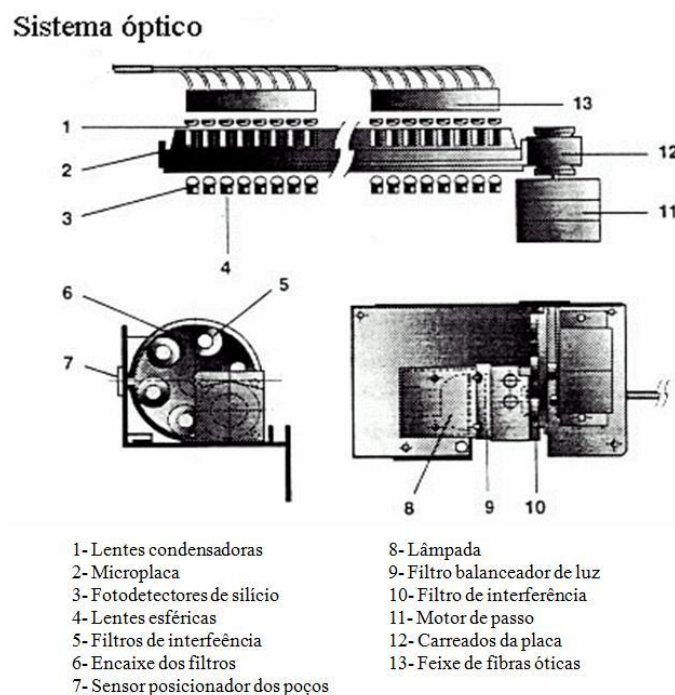
**Figura 1.2:** Perdas por reflexão e espalhamento (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Dentre os vários tipos de espectrofotômetros podemos citar como principais representantes o espectrofotômetro de monofeixe e o espectrofotômetro de feixe duplo. Ambos os espectrofotômetros possuem uma fonte de luz que é, em geral, uma lâmpada de tungstênio (W) para luz visível e uma de deutério ( $^2\text{H}$ ) para luz ultravioleta. O feixe de luz emitido é dirigido para um monocromador. A luz monocromática atinge a amostra sendo transmitida posteriormente para o fotomultiplicador onde é transformado em impulso elétrico, este impulso é amplificado eletronicamente e escalonado (transformado em absorbância, transmitância ou mesmo concentração) e depois oferecido ao operador através de um visor.

Os leitores de microplacas são equipamentos projetados para fazer a varredura, analisar e obter resultados numéricos de reações químicas conduzidas em microplacas. Esses equipamentos podem realizar leituras e medidas em multi-deteção, absorbância (absorvância ou absorvência), fluorescência e luminescência. Os leitores são configurados para leituras de placas de laboratório especiais, placas de Petri, cubetas, lâminas e varreduras de placas com números variados de poços. O leitor baseado na absorbância usa a luz para medir a capacidade de absorção de uma suspensão. Os leitores de microplacas são diferenciados tipicamente pelos tipos de ensaios ou de substâncias a ser analisados. Muitos leitores irão

lidar com múltiplas substâncias, tais como imunoenaios, ensaios de proteína e de ácidos nucleicos, ensaios enzimáticos, detecção de cálcio, etc.

O princípio de funcionamento do leitor é a determinação da absorvância (absorvância ou absorvência) de um feixe de luz que atravessa uma amostra. O feixe é guiado por um filamento de fibra ótica, que atravessa a seguir uma lente condensadora. O feixe condensado em seguida atravessa a amostra contida em um poço. Abaixo do poço, estão localizados os fotodetectores de silício (figura 1.3). A leitura pode ser realizada em vários poços simultaneamente através da colocação de uma placa. Antes da medida de cada poço, o leitor realiza uma leitura de todos os canais do fotômetro, essa medida é tomada como medida base ( $I_0$ ) para cada canal, este procedimento é semelhante à leitura do material de referência no espectrofotômetro, entretanto o objetivo é determinar a absorvância da placa. O leitor em seguida grava a medida para cada ( $I$ ) poço e calcula a absorvância utilizando a Lei de Lambert-Beer (1.4) (MARTINS, 2007a).



**Figura 1.3:** Descrição do sistema óptico do Leitor de Elisa (MARTINS, 2007a).

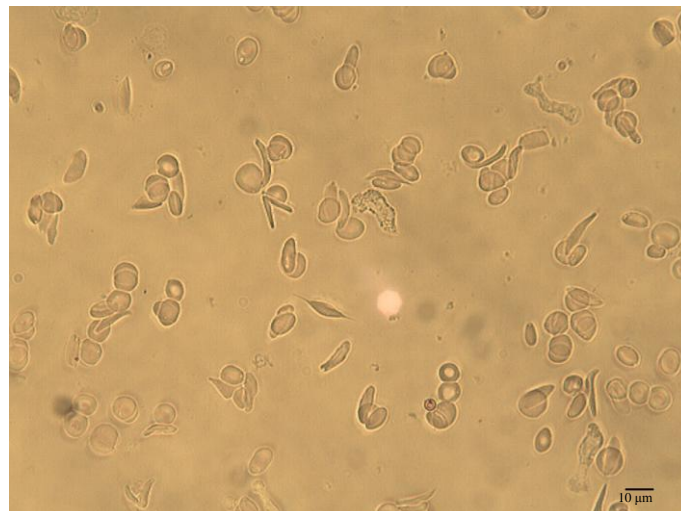
## 1.6 Anemia Falciforme

O conhecimento de uma doença marcada por episódios dolorosos e principalmente pela morte precoce existiu na África por muitos séculos. James Herrick (1910) identificou pela primeira vez as células falcêmicas em um estudante de medicina de Granada (Caribe). Várias observações relacionadas sobre a doença falciforme pontuam o panorama da primeira metade do século 20: Linus Pauling (1949) demonstrou mobilidade eletroforética anormal da hemoglobina de um indivíduo afetado. Vernom Ingram (1957) descobriu que a mutação gênica da doença era uma simples substituição na molécula de hemoglobina das células falcêmicas (hemoglobina S - HbS); Max Perutz (1960) decifrou a estrutura da hemoglobina, elucidando sua base molecular e suas funções; e Janet Watson (1948) notou que os sintomas apareciam em crianças apenas quando as concentrações de hemoglobina fetal (HbF) diminuía, estabelecendo a noção do efeito benéfico da HbF na manifestação da doença (STUART e NAGEL, 2004).

É sabido que, na população humana, ocorrem mais de 300 variantes genéticas da hemoglobina. A maioria dessas variações consiste de diferenças em apenas um resíduo de aminoácido. Os efeitos sobre a estrutura e a função da hemoglobina são, com frequência, pequenos, mas algumas vezes podem ser marcantes. Cada variante da hemoglobina é o produto da alteração de um gene. Os genes variantes são denominados alelos. Como, geralmente, os seres humanos possuem duas cópias de cada gene, um indivíduo pode ter duas cópias de um alelo (sendo, portanto, homocigoto para aquele gene), ou uma cópia de cada um, de dois alelos diferentes (heterocigotos) (NELSON e COX, 2002).

A Anemia Falciforme ocorre em indivíduos homocigotos para o alelo falciforme do gene que codifica a subunidade  $\beta$  da hemoglobina. Os indivíduos que recebem o alelo falciforme somente de um dos pais e são, portanto, heterocigotos, possuem uma condição mais discreta denominada traço falciforme; somente cerca de 1% de seus eritrócitos tornam-se falciformes na desoxigenação. Esses indivíduos podem levar uma vida completamente normal desde que evitem exercícios intensos ou outros tipos de estresse para o sistema circulatório (BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2007). Os eritrócitos falcêmicos contêm uma população significativa de células com densidades anormais, desidratadas e células potássio-deprimidas (HOLTZCLAW, JIANG, *et al.*, 2002), são em menor número (devido à fragilidade da hemácia SS) e anormais (devido à polimerização da hemoglobina S). Além de um aumento desproporcional do número de células imaturas, o sangue contém muitos eritrócitos longos,

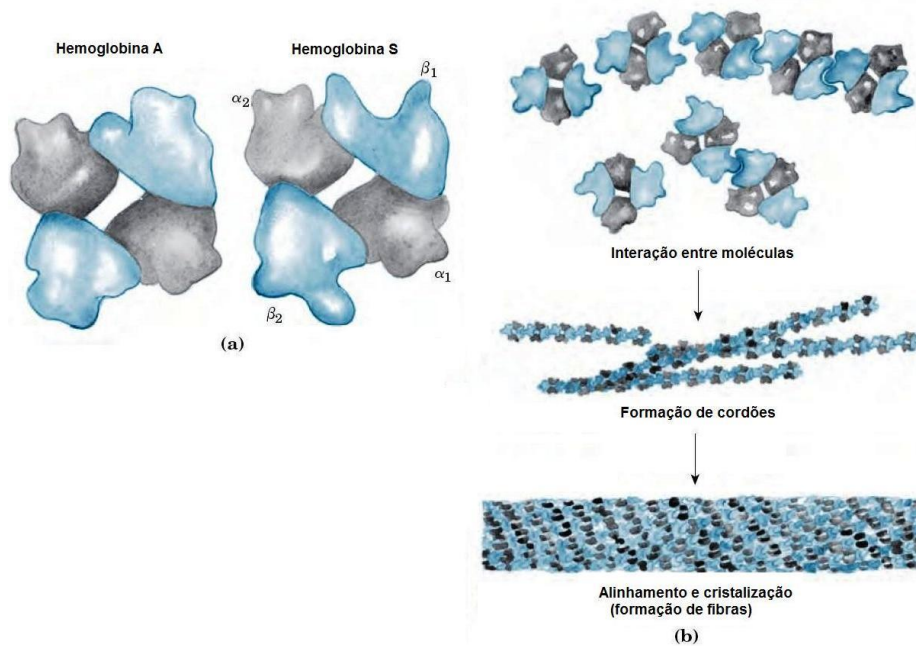
delgados e em forma de meia-lua, que se assemelham à lâmina de uma foice (figura 1.4). Quando a hemoglobina S é desoxigenada, ela se torna insolúvel e forma polímeros que se agregam em fibras tubulosas. A hemoglobina normal (hemoglobina A – HbA) permanece solúvel na desoxigenação. As fibras insolúveis da HbS, desoxigenada, são responsáveis pela deformação falciforme dos eritrócitos, e a proporção de células falcizadas aumenta muito com a desoxigenação do sangue. A polimerização da hemoglobina S (HbS) induzida pela hipóxia deforma a membrana do eritrócito e causa a perda maciça de cátions, bem como o aumento da expressão de moléculas de receptores de adesão (interação célula-endotélio vascular) na superfície da membrana (VERDUZCO e NATHAN, 2009). Esta polimerização se dá via mecanismo de nucleação e leva ao rápido crescimento da fibra, a qual depende diretamente da pressão parcial de oxigênio (HIGGINS, EDDINGTON, *et al.*, 2007).



**Figura 1.4:** Fotomicrografia de sangue SS com aumento de 40x destacando a presença de vários eritrócitos em forma de foice.

Essas propriedades alteradas da HbS resultam da substituição da base nitrogenada adenina (A) por timina (T) no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico (Glu – códon GAG) pelo aminoácido valina (Val – códon GTG) na superfície da cadeia variante da  $\beta$ -globina (STUART e NAGEL, 2004; NETO e PITOMBEIRA, 2002). O grupo R da valina não tem carga elétrica, em pH 7,4 e o do glutamato tem uma carga negativa. Por isso, a hemoglobina S tem duas cargas negativas a menos que a HbA, uma para cada uma das duas cadeias  $\beta$ . A substituição do resíduo Glu por Val cria um ponto de contato hidrofóbico adesivo na posição 6 da cadeia  $\beta$ , que fica na superfície externa da molécula. Essas regiões adesivas fazem com que as moléculas de

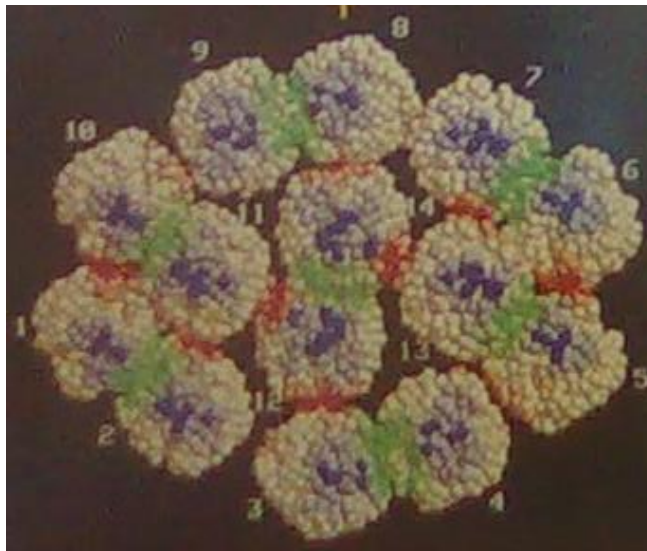
desoxiemoglobina se associem de maneira anormal umas com as outras formando longos agregados fibrosos característicos dessa doença (figura 1.5). A interação entre a Val na cadeia  $\beta$  de uma molécula e a região hidrofóbica formada pelos resíduos de Phe (fenilalanina) e Val na cadeia  $\beta$  de outra hemoglobina desoxigenada (estado T) leva a agregação da hemoglobina. Uma fibra de hemoglobina S (figura 1.6) é formada a partir de 14 cadeias de múltiplas moléculas de hemoglobina S interligadas (figura 1.7) (VOET e VOET, 2004).



**Figura 1.5:** Hemoglobina normal e falciforme. (a) Diferenças sutis entre as conformações da hemoglobina A e S resultam da troca de um único aminoácido nas cadeias  $\beta$ . (b) Em consequência dessa troca, a desoxiemoglobina S tem uma região hidrofóbica na superfície, que causa a agregação das moléculas em cordões, os quais se alinham formando fibras insolúveis (NELSON e COX, 2002).



**Figura 1.6:** Fibra de deoxiHbS 220Å de diâmetro. Micrografia eletrônica de uma fibra. O desenho indica a relação entre as vertentes interna e externa; cada esfera representa uma molécula HbS individual. As fibras possuem camadas repetidas a cada 64Å de distância e uma torção moderada que se repete a cada 350Å ao longo do eixo da fibra (VOET e VOET, 2004).



**Figura 1.7:** Modelo da vista de uma seção transversal da fibra de HbS, baseado na estrutura e reconstruções tridimensionais de microscopia eletrônica da fibras (VOET e VOET, 2004).

Indivíduos com anemia falciforme sofrem crises frequentes causadas por exercício físico. Tornam-se fracas, com respiração curta, apresentam *murmúrio cardíaco* e pulso acelerado. O teor de hemoglobina de seu sangue é de somente cerca da metade do valor normal, de 15 a 16g/100ml, pois as células falciformes são muito frágeis e se rompem com facilidade, resultando em anemia. Uma consequência ainda mais seria é o bloqueio anormal dos capilares pelas células longas (vasooclusão), o que pode causar dor intensa e interferir com a função normal dos órgãos – um fator importante para a morte precoce de muitas pessoas com a doença. Eritrócitos SS exibem elevada aderência às células endoteliais, os eritrócitos jovens (baixa densidade) são mais aderentes ao endotélio do que os densos. O mecanismo da vasooclusão por células falcêmicas mais aceito é um modelo de várias etapas, onde as células de baixa densidade se aderem primeiro às células endoteliais funcionando como armadilhas para a captura das células densas, causando a obstrução do vaso (TURHAN, WEISS, *et al.*, 2002).

Sem tratamento médico, as pessoas com anemia falciforme geralmente morrem na infância. O alelo falciforme é bastante comum em certas regiões da África. A pesquisa sobre a persistência de um alelo que é tão deletério a indivíduos homozigotos levou à descoberta de que esse alelo confere uma pequena, mas significativa resistência às formas letais da malária nos indivíduos heterozigotos, a configuração da célula quando desoxigenada, acompanhada pela perda de potássio e água torna o ambiente inóspito ao parasita *Plasmodium falciparum*. A seleção natural deu origem a uma população de alelos que equilibra os efeitos deletérios da condição homozigota com a resistência contra a malária pela condição heterozigota (MARTORANA, MOJOLI, *et al.*, 2007).



## **2 OBJETIVOS**

Investigar a capacidade resolutive de nova técnica utilizada para medir a agregação, sedimentação e compactação (ASC) do sangue de doadores e de pacientes com Anemia Falciforme.

### **2.1 Objetivo geral**

Padronizar a execução dos ensaios de ASC para determinar os melhores procedimentos, com menor nível de incerteza nos dados e maior confiabilidade nos resultados.

### **2.2 Objetivos específicos**

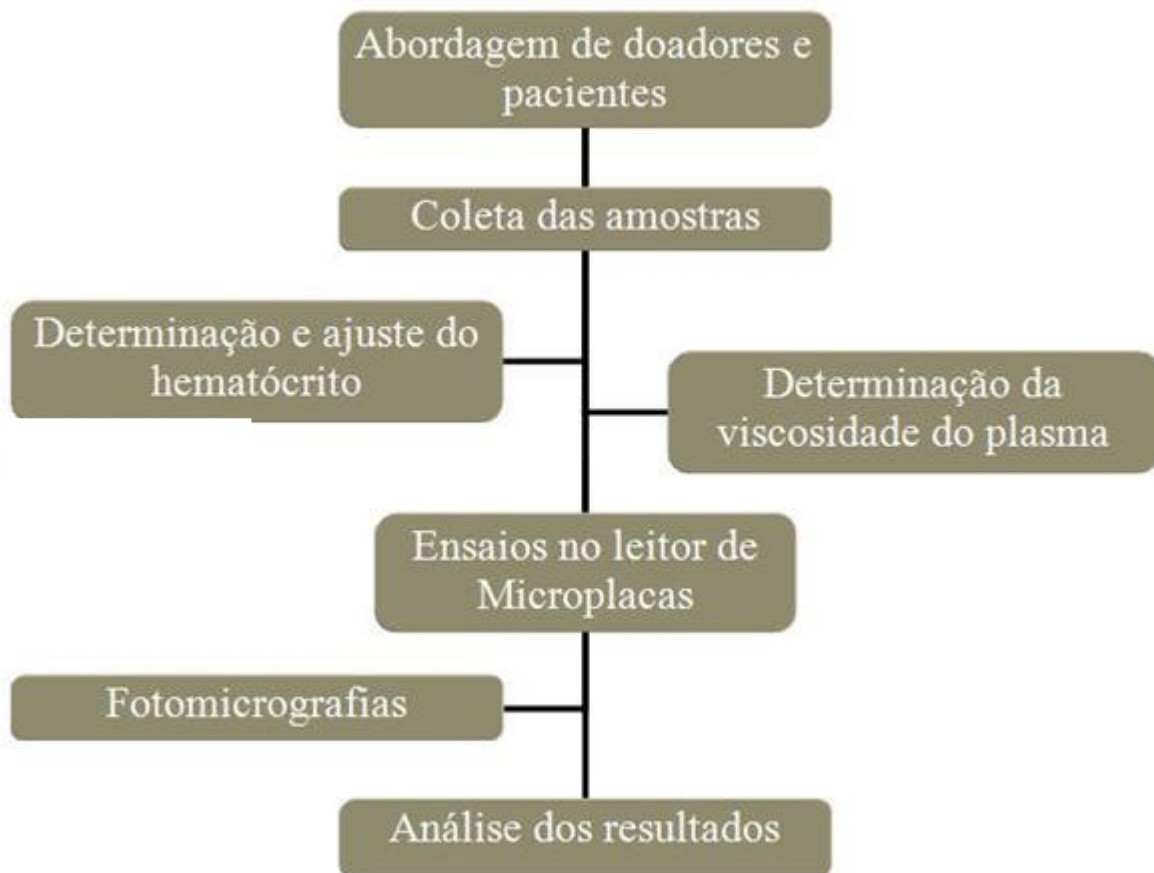
Determinar padrões de curvas do sangue de doadores e do sangue de pacientes com Anemia Falciforme, para obtenção de parâmetros que possibilite a comparação entre as curvas.

Analisar estatisticamente as diferenças nos dados experimentais de gênero, em função das pipetas utilizadas e entre sangue normal de doadores e patológico (Anemia Falciforme).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de amostras foi realizada através de uma parceria entre a Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) e a Fundação Hemominas de Belo Horizonte (HBH). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Fundação Hemominas (registro CEP 190) no segundo semestre de 2008. A Fundação Hemominas de Belo Horizonte disponibilizou 5ml de amostras de sangue de 50 doadores e de 16 pacientes com Anemia Falciforme atendidas no ambulatório da instituição.

O fluxograma abaixo apresenta, de maneira geral, os procedimentos adotados para realização do projeto.



**Figura 3.1:** Fluxograma representando a sequência das etapas realizadas para obtenção dos dados amostrais.

### 3.1 Procedimento de abordagem e inclusão de doadores e pacientes.

A abordagem dos doadores foi realizada no setor de triagem hematológica do HBH, após avaliação médica e antes da doação. O único critério utilizado para selecionar os voluntários para a pesquisa era não ser doador primário de sangue do HBH, ou seja, escolha dos doadores que já possuíam histórico na Fundação Hemominas. A coleta da amostra para o projeto foi feita durante a coleta de amostras para exames sorológicos e imuno-hematológicos.

A abordagem dos pacientes de Anemia Falciforme ocorreu quando estes se apresentavam para a coleta de sangue para exames laboratoriais no ambulatório do HBH. A coleta para o projeto ocorreu no momento da punção venosa para exames de rotina dos pacientes, perante a leitura, explanação do projeto e assinatura do Termo de Consentimento (APÊNDICE A) pelos pacientes. Os critérios de inclusão de pacientes de Anemia Falciforme foram:

- a. Ser portador de Anemia Falciforme (hemoglobinopatia SS);
- b. Ser maior de 18 anos de idade;
- c. Não ter feito uso de antibióticos nos últimos sete dias;
- d. Não ter tido febre ou infecção nos últimos sete dias e
- e. Não ter sido transfusionado com concentrado de hemácias nos últimos 60 dias.

A seleção dos pacientes aptos a participarem do projeto se deu mediante um questionário (ANEXO A), devidamente preenchido e assinado pelo paciente, com a finalidade de facilitar o processo de seleção. A inclusão das alíneas c e d foram sugeridas pelo HBH.

A escolha dos voluntários, tanto doadores quanto pacientes, para o projeto se deu de forma aleatória, garantindo a casualidade na obtenção das amostras e possibilitando a consistência na inferência estatística dos resultados.

### 3.2 Coleta e armazenamento das amostras.

Para a coleta das amostras, tanto dos doadores quanto dos pacientes, foram utilizados tubos de coleta a vácuo de 5ml contendo EDTA como anticoagulante e as amostras foram obtidas pelos técnicos do HBH perante consentimento prévio do doador ou paciente. A frequência de coletas de amostras dos doadores foi de duas amostras por dia e a de sangue SS dependeu da presença de pacientes de Anemia Falciforme nos ambulatórios do HBH.

Após a coleta as amostras foram estocadas em bolsa térmica contendo gelo e transportadas para o CETEC. Ao chegarem ao laboratório as amostras foram estocadas em um homogeneizador sob refrigeração de  $\sim 10^{\circ}\text{C}$  até o início dos ensaios. Todos os ensaios foram iniciados até no máximo duas horas após a coleta e finalizados no máximo até 5 horas após o seu início.

### 3.3 Determinação e ajuste do hematócrito.

O hematócrito de cada amostra foi determinado utilizando-se tubos capilares, massa selante, cartão de leitura de hematócrito e uma microcentrífuga (Centrimicro, modelo 211, marca FANEM).

Quatro tubos capilares foram preenchidos com sangue, selados com massa selante e centrifugados por 15 minutos. Após centrifugação os tubos foram lidos utilizando o cartão de leitura e o valor foi determinado pela média dos valores obtidos.

O ajuste do hematócrito foi realizado através da centrifugação do sangue, retirada do plasma e adição das células na proporção desejada para se obter uma fração de hemácias de 20% (v/v). Para obtenção do plasma, a amostra de sangue foi centrifugada por 15 minutos, rotação de 1250rpm em centrífuga de mesa (Excelsa Baby II, MODELO 211, marca FANEM). Após centrifugação, o plasma foi cuidadosamente retirado com uma pipeta automática, de forma a evitar a retirada de células, e seu volume medido.

Todos os ensaios de sangue foram realizados com fração volumétrica de hemácias de 20%. Este ajuste foi necessário para ficar dentro dos limites de medida dos equipamentos utilizados na pesquisa, em especial o leitor de E.L.I.S.A.

### 3.4 Determinação da viscosidade do plasma.

Para a determinação da viscosidade do plasma, 0,5ml de plasma foram injetados no porta-amostra de um viscosímetro cone-placa (modelo LVDVII+CP, marca BROOKFIELD). O porta-amostra do viscosímetro foi mantido a 37°C com auxílio de um banho termostático (modelo TC500, marca BROOKFIELD). Após a aplicação, o porta-amostra foi acoplado ao viscosímetro, e mantido por 5 minutos para se atingir equilíbrio térmico entre amostra e porta-amostra. Os ensaios iniciavam-se com o viscosímetro ajustado para a rotação de 100 rpm, sendo as leituras de viscosidade ( $\eta$  em mPa.s), taxa de cisalhamento ( $d\gamma/dt$  em  $s^{-1}$ ) e tensão de cisalhamento ( $\sigma$  em Pa) adquiridas a cada 30 segundos, durante 5 minutos. O valor de viscosidade apresentado é a média aritmética das medidas. A viscosidade do plasma não foi ajustada.

### 3.5 Ensaios no Leitor de Microplacas

As amostras foram aliqüotadas em microtubos de 1,5ml, etiquetadas e homogeneizadas sob refrigeração de ~10°C até a realização do ensaio. Para o ensaio no equipamento Leitor de Microplacas (modelo 680, marca BIORAD) para medidas de absorbância (A, unidade arbitrária) das suspensões, uma alíquota da amostra era retirada do homogeneizador, colocada em um recipiente (poço coaxial em “V”) para facilitar a pipetagem e dispensadas em microplaca “universal”, estéril com fundo em formato de “U”.

Os parâmetros nos ensaios com o Leitor de Microplacas incluíram temperatura de ensaio de 37°C, comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 650nm e realização de 170 leituras a cada 6 segundos. Cem microlitros de amostra de sangue eram aplicadas em cada micro-poço da placa do Leitor.

Para garantir a temperatura das amostras dentro dos micropoços, próximas de 37°C, aplicou-se 120µl de amostra em cada micro-poço e as manteve por 10min em repouso, dentro do leitor. Após os 10min as amostras eram ressuspensas com auxílio da pipeta multicanal eletrônica, reaplicadas nos micropoços adjacentes a quantidade de 100µl, utilizando a pipeta desejada, e então se dava início às leituras tomando o devido cuidado de não deixar bolhas de ar nas amostras.

Em cada ensaio foram feitas réplicas de cada amostra, que foram lidas simultaneamente, com a finalidade de obtermos um valor médio de leitura de modo a minimizar a influência de valores discrepantes. O número de réplicas variou de acordo com a quantidade de amostra disponibilizada para o estudo, com a quantidade variando de duas a oito.

Dois tipos diferentes de pipetas (marca GILSON) foram utilizados para a realização dos ensaios no Leitor de Microplacas: a pipeta multicanal automática eletrônica (figura 3.2-A) com 12 ponteiros de 200µl (modelo Concept) e a pipeta monocanal de deslocamento positivo (figura 3.2-B) (modelo Microman).



**Figura 3.2:** Fotografias das pipetas utilizadas nos ensaios de agregação. A – Pipeta multicanal eletrônica com 12 canais. B – Pipeta monocanal com deslocamento positivo. Nota-se a presença de um êmbolo na ponteira da pipeta B

O hematócrito para o ensaio no Leitor foi determinado e ajustado de acordo com o descrito no item 2.2 acima e conferido novamente após o ajuste do hematócrito.

Os resultados obtidos eram automaticamente registrados pelo computador e depois transferidos para software de planilha eletrônica (Excel) onde os dados foram tratados para obtenção de gráficos e outros estudos.

### 3.6 Microestrutura do sangue utilizando Microscopia Ótica.

Ao mesmo tempo em que se realizava o ensaio no Leitor de Microplacas, eram preparadas lâminas com sangue total para análise em microscópio óptico de luz transmitida (marca LEICA). As microestruturas do sangue de doadores e de pacientes com Anemia Falciforme foram investigadas. Foram realizados registros fotográficos digitais (MOTICAM 2300/2.0Mpixels) nos aumentos de 4x, 10x, 40x e 100x. As imagens obtidas foram nomeadas e registradas em computador com informações que garantissem a rastreabilidade da amostra.

Uma gota de sangue diluído (20%) foi aplicada sobre uma lâmina de vidro e coberta com lamínula. Todos os procedimentos para obtenção das fotomicrografias foram realizados à temperatura ambiente e as fotos foram tiradas do menor para o maior aumento em intervalos de tempo aleatórios.

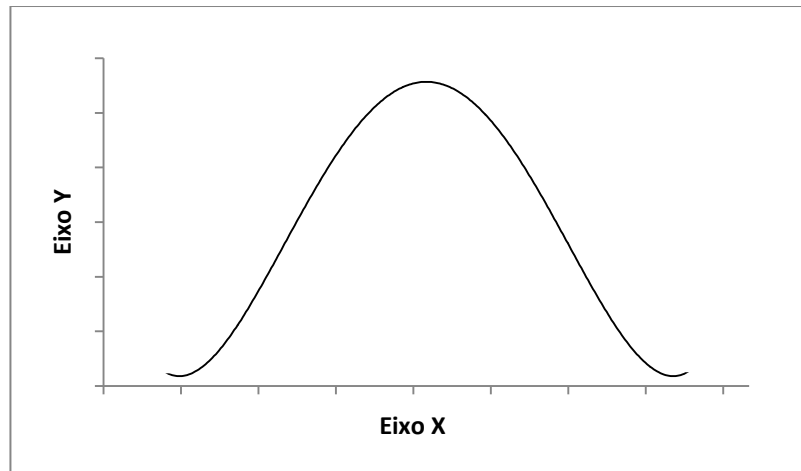
As fotos foram nomeadas de modo a identificarmos o tipo de sangue, o gênero do doador ou paciente, a data em que foi tirada e o aumento utilizado.

### 3.7 Análises estatísticas

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, testando dois grupos experimentais (doadores e pacientes com Anemia Falciforme) com 50 repetições para o grupo dos doadores (25 para cada gênero) e 16 repetições para o grupo dos pacientes (10 para o sexo feminino e 6 para o sexo masculino).

Respostas biológicas se distribuem dentro dos limites viáveis da seguinte maneira: freqüentemente na região central daquele intervalo, diminuindo paulatina e simetricamente para os extremos limítrofes. Assim sendo, respostas muito pequenas ou demasiadamente

grandes serão raras e, portanto, terão baixa frequência e, por sua vez, respostas ordinárias, comuns ou típicas aparecerão com maior frequência. Como resultado, um gráfico associando a frequência (Y) de cada resposta possível (X) seria como o padrão mostrado na figura 3.3. Dados biológicos normalmente apresentam este tipo de distribuição, advindo daí o nome de distribuição normal (SAMPAIO, 2007).



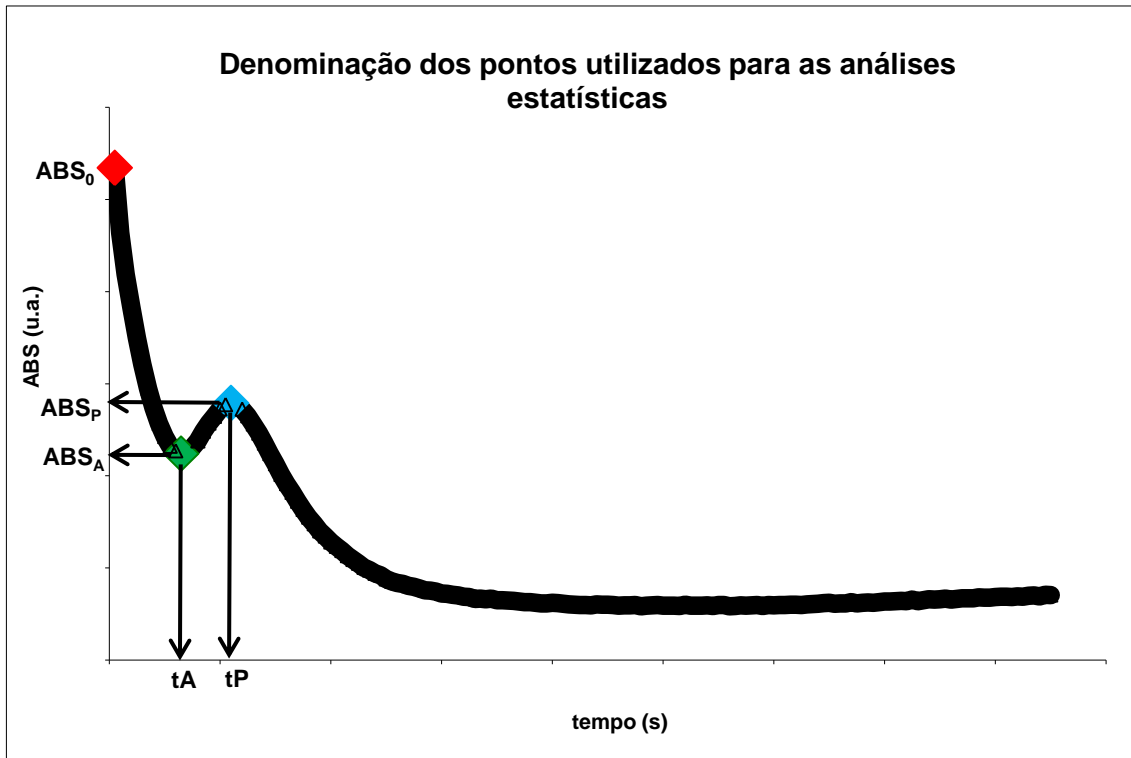
**Figura 3.3:** Gráfico representando a distribuição típica de respostas biológicas.

Devido à natureza da resposta da variável estudada ser quantitativa, contínua e com distribuição do tipo normal, as análises estatísticas foram feitas com base na estatística descritiva ( $\bar{X}$  - média,  $s$  - desvio padrão e  $CV$  - coeficiente de variação), comparação de médias por pareamento e análise de variância.

Para as análises foram determinados e nomeados três pontos de acordo com a figura 3.4:

- o ponto inicial, denominado de absorvância inicial ( $ABS_0$ );
- o primeiro ponto de inflexão da curva, denominado tempo de agregação ( $t_A$ ), cujos valores utilizados foram o tempo e a respectiva absorvância, denominada absorvância mínima ( $ABS_A$ ) e
- o segundo ponto de inflexão da curva, denominado de tempo do pico ( $t_P$ ), cujos valores utilizados também foram o tempo e a respectiva absorvância, denominada absorvância máxima ( $ABS_P$ ).





**Figura 3.4:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando os pontos utilizados para as análises estatísticas. Em vermelho o ponto denominado absorvância inicial ( $ABS_0$ ), em verde o ponto denominado tempo de agregação ( $t_A$ ) e em azul o ponto denominado tempo do pico ( $t_P$ ).

Para o cálculo dos intervalos de confiança utilizamos a fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3.1)$$

onde  $\bar{X}$  é o valor da média,  $s$  o valor do desvio padrão,  $n$  o número de repetições e o valor  $t_{n-1}$  é o valor obtido na tabela de distribuição de  $t$  de Student, com  $n-1$  graus de liberdade e probabilidade de erro ( $p$ ) igual a 0,05.

Devido ao delineamento experimental adotado, onde lidamos com dois tratamentos (pipetas) com grupos exclusivos para cada um deles (doadores e pacientes), utilizamos do método de comparação de pares para verificar se dentro de cada grupo experimental (doadores, doadoras, pacientes homens e pacientes mulheres) havia diferença entre as pipetas utilizadas. O valor mais provável dessa diferença estará contido no intervalo de confiança da média obtida. Se o valor zero também estiver contido neste intervalo, então a diferença média

entre os dois tratamentos não apresentará um valor significativo. Este método tem como vantagem simplificar os cálculos, pois gera apenas uma média e ainda exclui o efeito do gênero nos ensaios de agregação, evidenciando o efeito das pipetas, porém mantém o erro experimental (Sampaio, 2007).

Para compararmos os grupos experimentais, não podemos utilizar o pareamento, pois a comparação agora é feita entre grupos diferentes (doadores e pacientes), utilizando tratamentos iguais (pipetas). Como os ensaios foram realizados de acordo com os princípios básicos da experimentação (repetições de unidades experimentais, uniformidade da amostra, casualização das unidades amostrais, uniformidade de meio, uniformidade na aplicação dos tratamentos), cada grupo experimental possui uma média distinta (as quais serão feitas comparações), porém os desvios dentro de cada grupo foram variáveis, quando teoricamente deveriam ser iguais. Para estimarmos o valor mais provável deste desvio, utilizamos a análise de variância. O único objetivo da análise de variância é estimar a variância do erro ( $s^2$ ), para depois utilizá-la na comparação de médias. (Sampaio, 2007).

Para a obtenção do valor da variância do erro utilizamos da tabela 3.1, onde  $gl$  significa os graus de liberdade,  $n$  é o número total de amostras e  $t$  é o número total de tratamentos, que neste estudo é igual a dois, pois compararemos as médias dos dois grupos experimentais (doadores e pacientes).

**Tabela 3.1:** Tabela utilizada para calcular o valor da variância do erro ( $s^2$ ), onde  $n$  é o número total de amostras,  $t$  o número total de tratamentos realizados nas amostras e  $gl$  os graus de liberdade.

Análise de Variância			
Fonte de Variação (FV)	Graus de liberdade (gl)	Soma dos Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)
Total	$n-1$	$SQ_{Total}$ (3.2)	-
Tratamentos	$t-1$	$SQ_{tratamentos}$ (3.3)	-
Erro	Por diferença $gl_{erro} = gl_{Total} - gl_{Trat}$	Por diferença $SQ_{erro} = SQ_{Total} - SQ_{trat}$	$s^2 = \frac{SQ_{erro}}{gl_{erro}}$

Onde,

$$SQ_{Total} = \frac{\sum X^2 - (\sum X)^2}{n} \quad (3.2)$$

em que  $X$  é o valor de cada amostra obtido nos ensaios,  $\sum X^2$  corresponde à soma do quadrado de cada valor registrado,  $(\sum X)^2$  (conhecido por fator de correção) corresponde ao grande total (soma dos valores de todas as amostras) elevado ao quadrado e então dividido por  $n$  (total de amostras).

Analogamente, o valor da soma dos quadrados dos tratamentos ( $SQ_{tratamentos}$ ) é obtido substituindo-se  $X$  por  $T_i$ , onde  $T_i$  é a soma das  $r_i$  repetições do tratamento  $i$  :

$$SQ_{Tratamentos} = \sum \frac{T_i^2}{r_i} - \frac{(\sum X^2)}{n} \quad (3.3)$$

Com os valores da  $SQ_{Total}$  e  $SQ_{trat}$ ,  $SQ_{erro}$  será obtido pela diferença deles:

$$SQ_{erro} = SQ_{Total} - SQ_{trat} \quad (3.4)$$

e portanto, a variância do erro ( $s_{erro}^2$ ) será:

$$s_{erro}^2 = \frac{SQ_{erro}}{gl_{erro}} \quad (3.5)$$

A comparação entre as médias será feita através do cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias:

$$(\bar{X}_a - \bar{X}_b) = t_{erro} \sqrt{\frac{s_{erro}^2}{n_a} + \frac{s_{erro}^2}{n_b}} \quad (3.6)$$

Onde,  $s^2$  é o valor da variância do erro, calculado apartir da tabela 3.1.

As médias serão estatisticamente diferentes se o valor zero não estiver contido nos intervalos calculados.

As comparações foram realizadas entre os grupos, de acordo com o gênero e a pipeta utilizada, ou seja, resultados dos doadores com os resultados dos pacientes, ambos com a pipeta multicanal, resultados das doadoras com os resultados das pacientes, ambos com a mesma pipeta multicanal e assim sucessivamente.

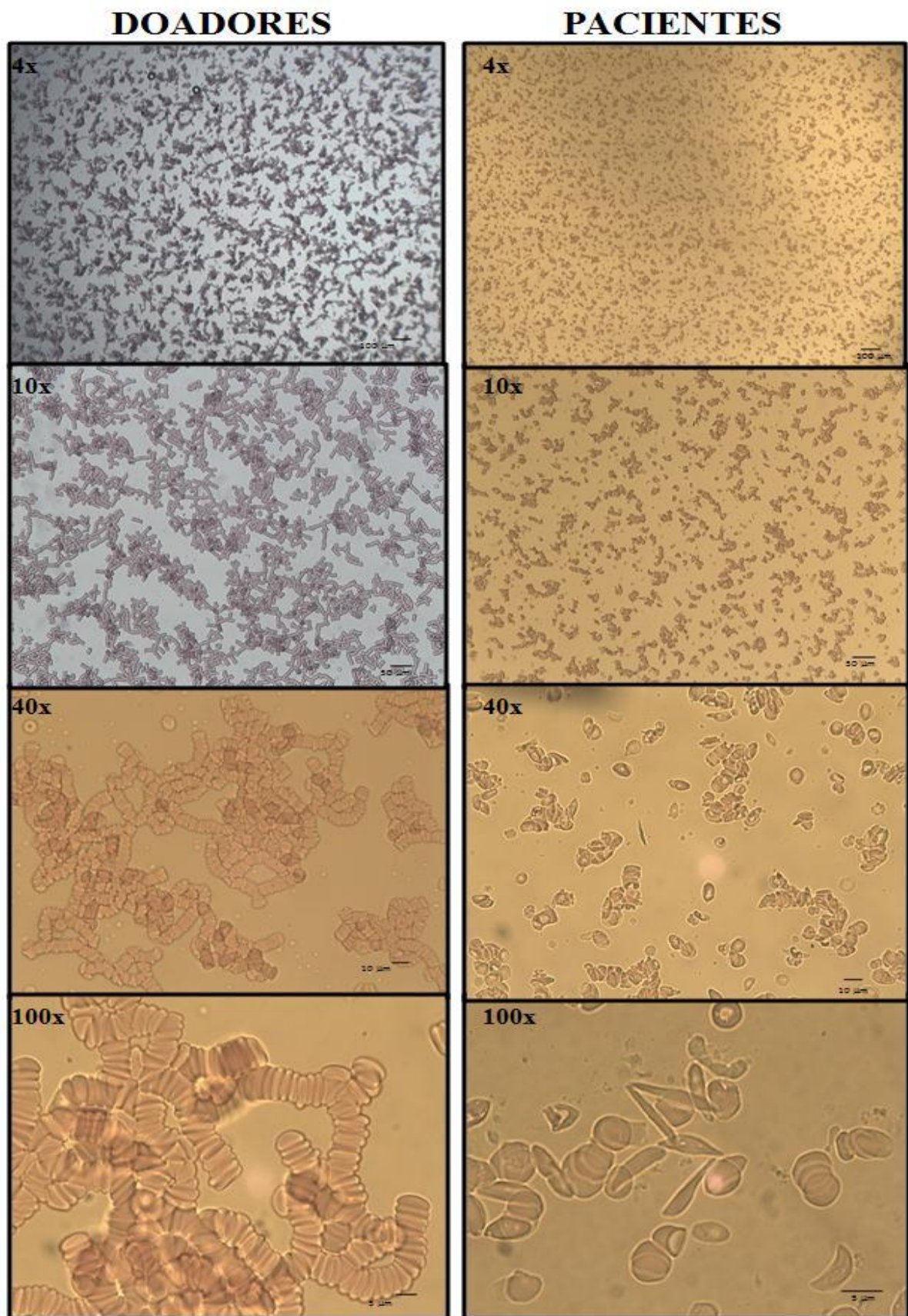
As médias foram comparadas utilizando o teste t de Student com probabilidade de erro menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A seguir são apresentados os resultados das fotomicrografias, da viscosidade do plasma e das curvas de agregação das amostras de sangue dos doadores e pacientes, bem como as análises estatísticas possíveis para os dados obtidos.

### **4.1 Fotomicrografias**

Para verificarmos diferenças visíveis na agregação eritrocitária entre o sangue de doadores e pacientes, foram obtidas fotomicrografias das amostras de sangue nos aumentos de 4x, 10x, 40x e 100x (figura 4.1).



**Figura 4.1:** Fotomicrografias óticas nos aumentos de 4x, 10x, 40x e 100x com sangue de doadores e pacientes, com as devidas escalas.

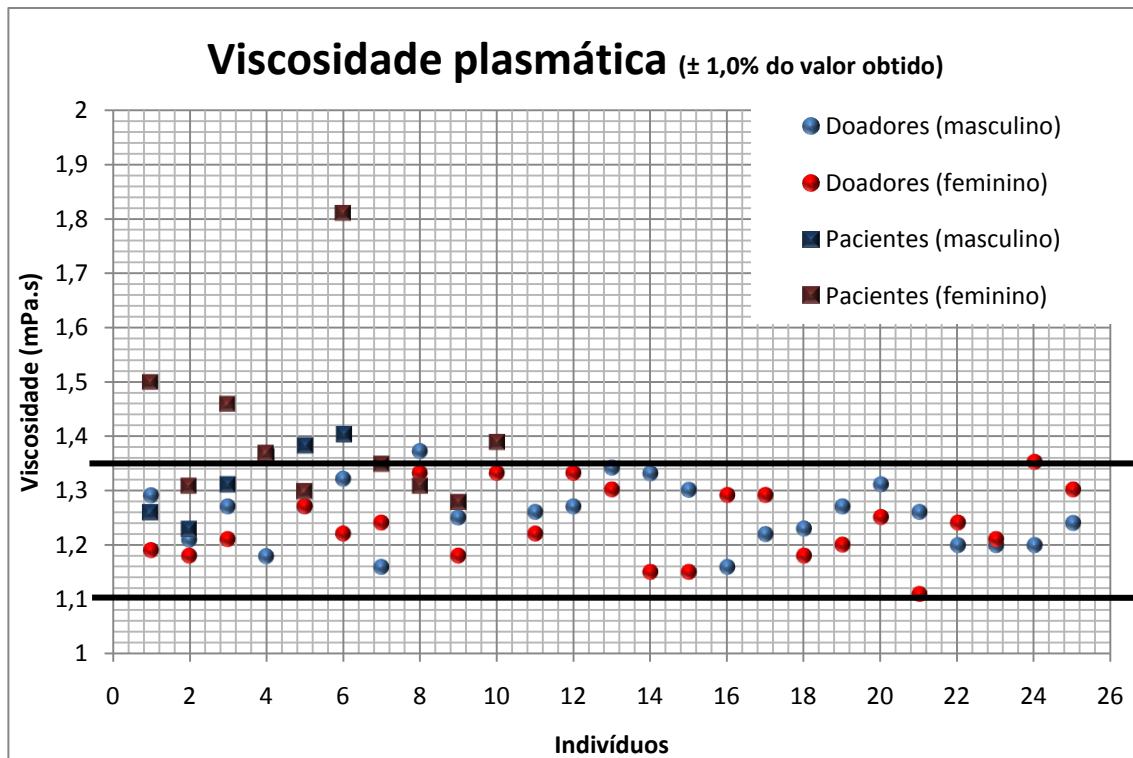
Os resultados evidenciam a diferença existente na agregação eritrocitária entre o sangue dos doadores e pacientes. Nota-se que nas amostras de sangue SS as células são mais dispersas e agregam pouco. Já nas amostra dos doadores, as hemácias formam “pilhas de moedas” e os rolos são bem definidos. É possível notar, na fotomicrografia dos doadores no aumento de 100x, o início da formação da estrutura tridimensional (gel).

Nota-se que em ensaios “*in vitro*”, ou seja, sem a presença da parede dos vasos, ocorre exatamente o oposto do fenômeno encontrado na literatura, onde há o aumento na agregação dos eritrócitos em portadores de Anemia Falciforme (JOHNSON e TELEN, 2008)

#### 4.2 Valores da viscosidade do plasma.

O plasma é um fluido newtoniano, ou seja sua viscosidade não depende da taxa de cisalhamento ( $d\gamma/dt$ ). O valor da viscosidade do plasma de indivíduos sadios a 37°C é de 1,10 a 1,35mPa.s independentemente da idade ou gênero podendo variar de acordo com as condições clínicas dos indivíduos (RAMPLING, 1989)

A figura 4.2 apresenta um gráfico com os valores experimentais da viscosidade do plasma dos 50 doadores e dos 16 pacientes com Anemia Falciforme, separados por gênero, obtidos com auxílio de um viscosímetro cone-placa conforme descrito anteriormente.



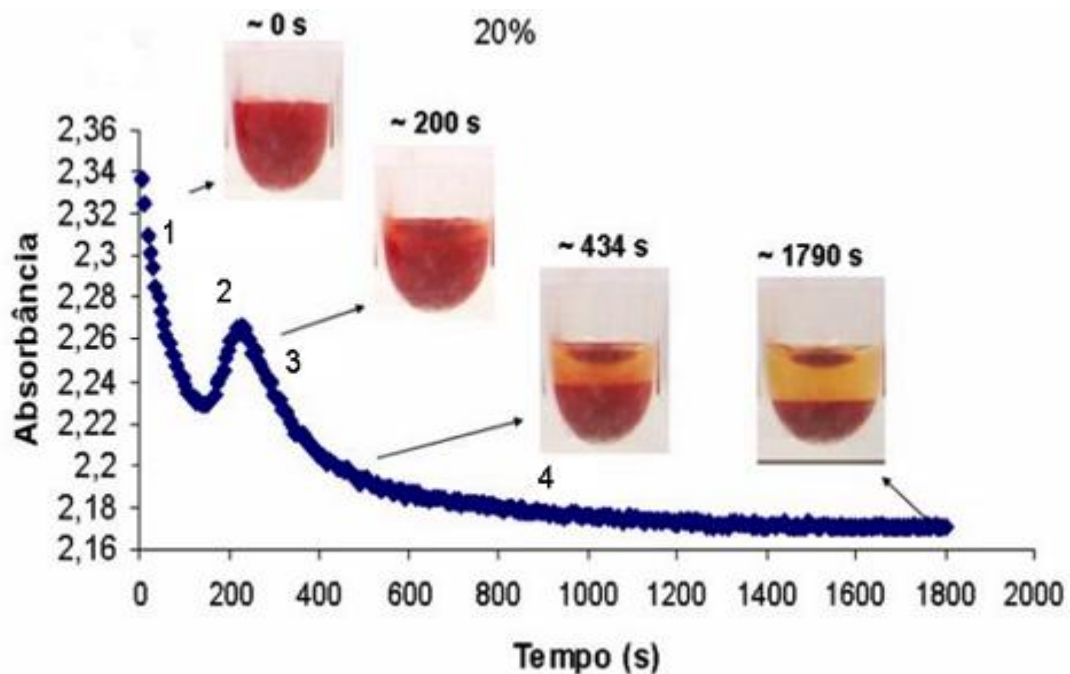
**Figura 4.2: Valores da viscosidade do plasma:** Gráfico representando os valores da viscosidade do plasma dos doadores e pacientes obtidos com viscosímetro cone-placa. Os valores entre as linhas representam os valores para a viscosidade do plasma de indivíduos saudáveis à temperatura de 37°C independente do gênero e da idade segundo Rampling (1989). A cor azul representa o sexo masculino e vermelho o sexo feminino. Os círculos representam os doadores e os quadrados os pacientes.

Os valores obtidos para o plasma dos doadores se encontram dentro do limite normal aceitável para o valor de viscosidade plasmática humana. Já os resultados com o plasma dos pacientes apresentaram alguns valores discrepantes como 1,5 e 1,81mPa.s.

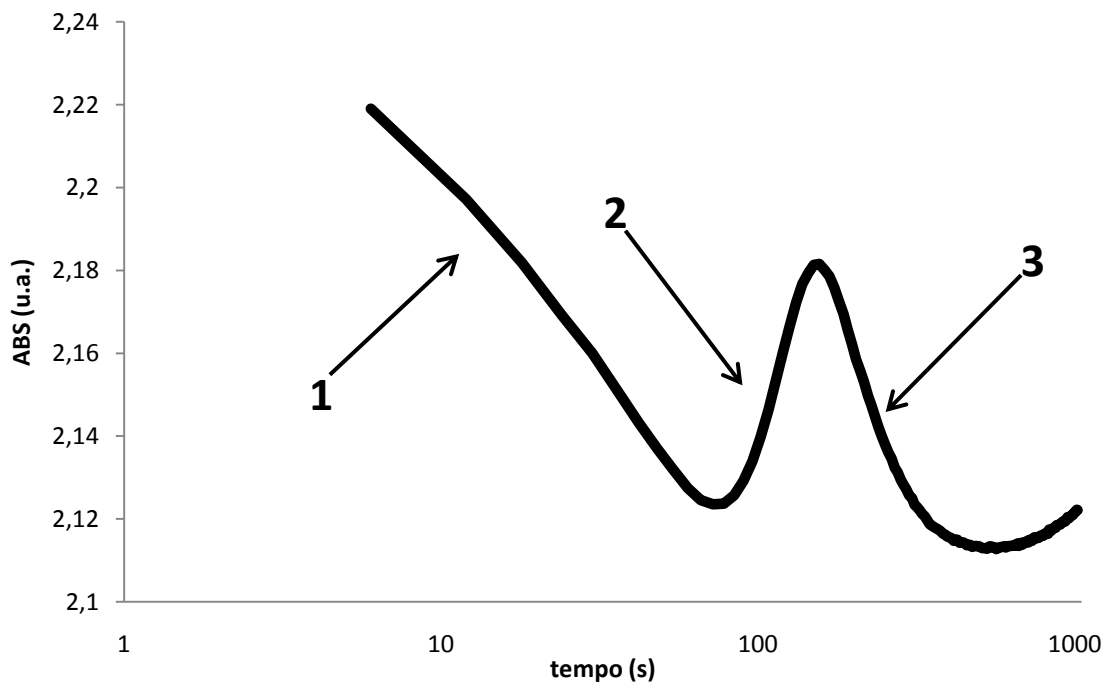


#### 4.3 Formato da curva de agregação-sedimentação-compactação do sangue.

As figuras 4.3 e 4.4 apresentam o tipo de curva de absorvância (A, unidades arbitrárias) em função do tempo (em segundos) obtido com o Leitor de Microplacas. Na figura 4.3 é apresentado um experimento onde micrografias dos estágios de sedimentação do sangue foram obtidas diretamente do micropoço da placa do Leitor de Microplacas com auxílio de um estereoscópio Motic com câmara digital acoplada, acionada a cada 10s. Dessa forma foi possível associar os estágios do processo de agregação-sedimentação-compactação com as imagens do estereoscópio (MARTINS, 2007a).



**Figura 4.3:** Dados experimentais obtidos no Leitor de Microplacas e imagens de estereoscopia de um micropoço de uma “placa de Elisa” com a amostra de sangue humano normal. Hematócrito de 20% (v/v) (Martins, 2007a)



**Figura 4.4:** Curva representando os fenômenos que ocorrem quando o sangue é deixado em repouso. 1 – Curva da formação dos rolos. 2 – Formação de agregados tridimensionais (gel). 3 – continuação da sedimentação dos agregados tridimensionais (gel) e compactação dos mesmos no fundo do poço.

Uma vantagem da utilização do Leitor é que o feixe de luz atravessa a amostra na direção da sedimentação e compactação do gel (figura 4.5) e não transversalmente ao fenômeno como é o caso dos espectrofotômetros uv-vis. O equipamento utilizado possui um feixe luminoso com diâmetro de alguns milímetros que passa no centro do micropoço. As reduções e aumentos na absorbância são diretamente relacionados com:

- a. A agregação das hemácias e formação de rolos individuais até aproximadamente 100s do início do processo. A redução da absorbância ocorre devido à perda de área de absorção porque hemácias livres possuem uma área total de absorção maior do que a área que ocupam quando organizadas em rolos (*roleaux*). Quanto maior é o valor da absorbância inicial ( $t=0s$ ), maior é a desagregação eritrocitária.
- b. Em seguida, a absorbância volta a subir porque ocorre contato entre os rolos que sedimentam, produzindo uma rede tridimensional desorganizada que caracteriza a formação de um gel, aumentando a concentração de hemácias/volume e aumentando a absorbância.

- c. A absorvância volta a cair na parte final da curva porque ocorre a contração dos agregados que formaram o gel, tendendo a aumentar os espaços vazios internos da rede e os agregados de glóbulos vermelhos aumentam sua compactação e densidade. Os aspectos geométricos são cruciais para a compactação das células vermelhas do sangue. (CARDOSO e CAMARGOS, 2002)



**Figura 4.5:** Esquema representativo da direção do feixe de luz que atravessa o micropoço, durante as leituras no leitor de microplacas.

O fato de estarem mais distribuídas homogeneamente durante a fase inicial de leitura faz com que a área de absorção da energia emitida pelo equipamento fique maior, aumentando o valor de absorvância inicial. Por outro lado, na medida em que o tempo passa, as células vão se organizando (formação dos rolos), a área de absorção vai diminuindo, aumentando as regiões sem hemácias, ou seja, espaços que retêm menos energia e assim a absorvância diminui.

Os rolos formados começam a se tocarem, formando uma rede tridimensional, que caracteriza a formação de um gel, um sólido amorfo sem organização de longa distância, fazendo com que a área de absorção da energia emitida pelo equipamento aumente, devido ao preenchimento dos espaços que anteriormente estavam sem eritrócitos, fazendo com que a absorvância aumente.

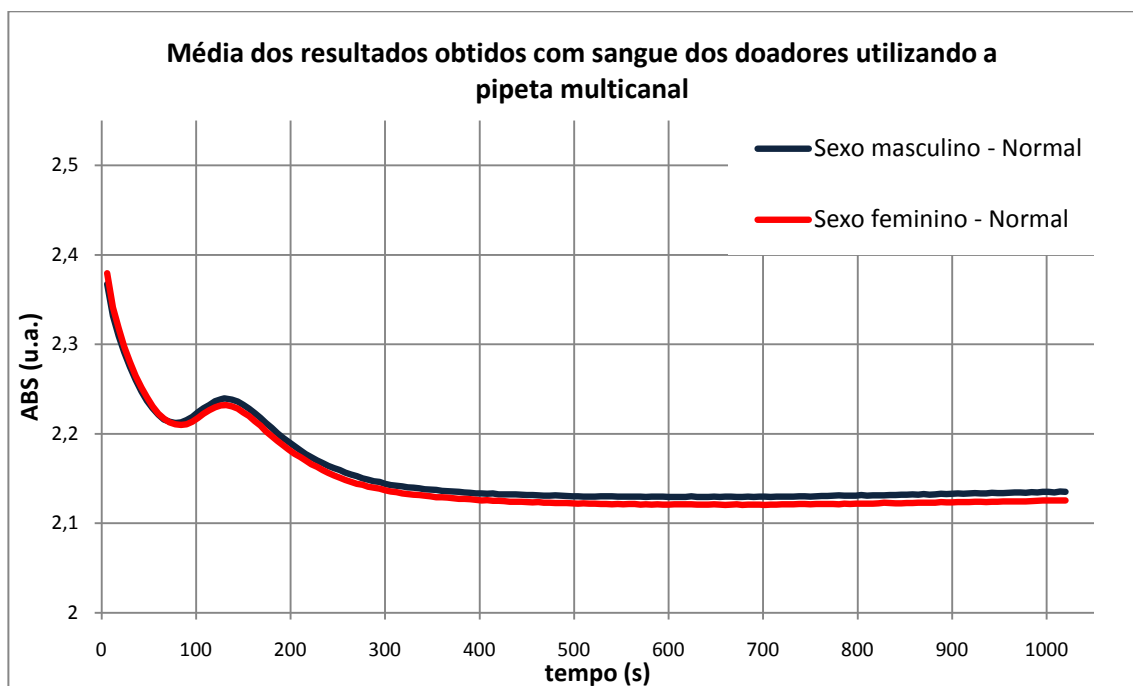
Porém, na medida em que a rede desorganizada é formada, o número de pontos de contato entre as hemácias aumenta, fazendo com que o gel se contraia; devido ao aumento dos pontos de contatos entre os rolos; formando estruturas compactas, criando, outra vez, espaços

livres de células (regiões que absorvem menos a energia emitida) e assim a absorvância volta a cair.

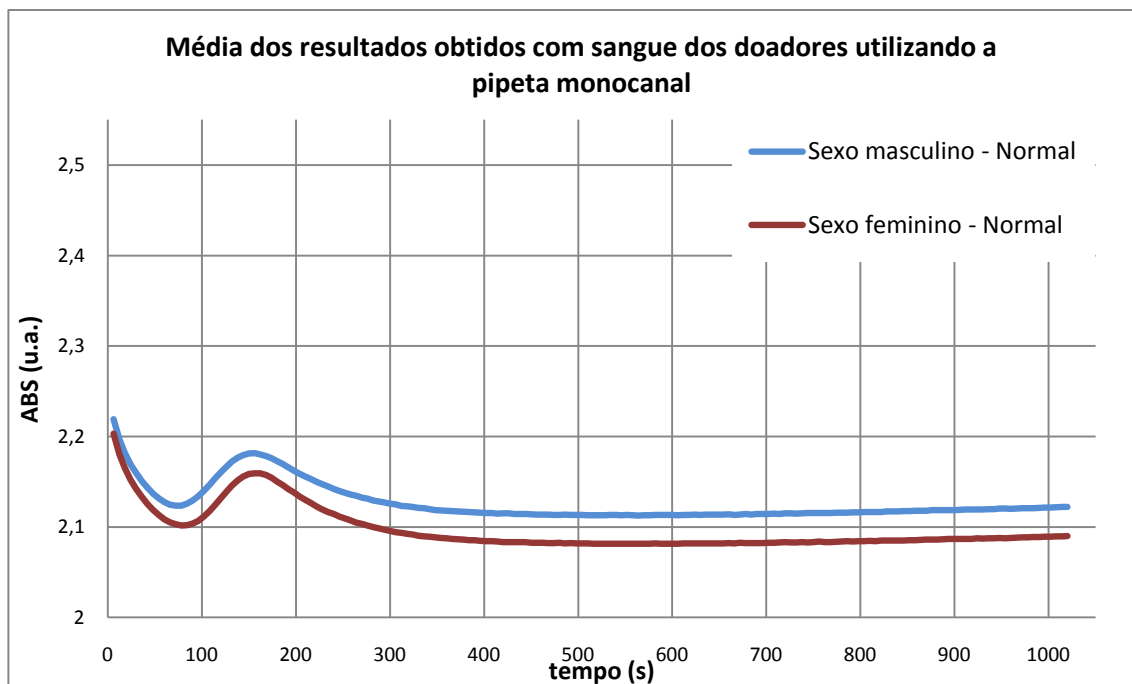
#### 4.3.1 *Curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores.*

Para cada amostra de sangue dos doadores do Hemominas foram realizados dois ensaios, um para cada tipo de pipeta, e cada ensaio com a quantidade máxima de réplicas possíveis. Os dados foram separados por tipo de pipeta e pelo gênero do voluntário.

As figuras 4.6 e 4.7 representam as curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras (doadores) de ambos os gêneros para cada tipo de pipeta utilizada.



**Figura 4.6:** Gráfico da absorvância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio das 50 amostras de sangue dos doadores, separados por gênero, utilizando a pipeta multicanal eletrônica. A curva em azul representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo masculino. A curva em vermelho representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo feminino.



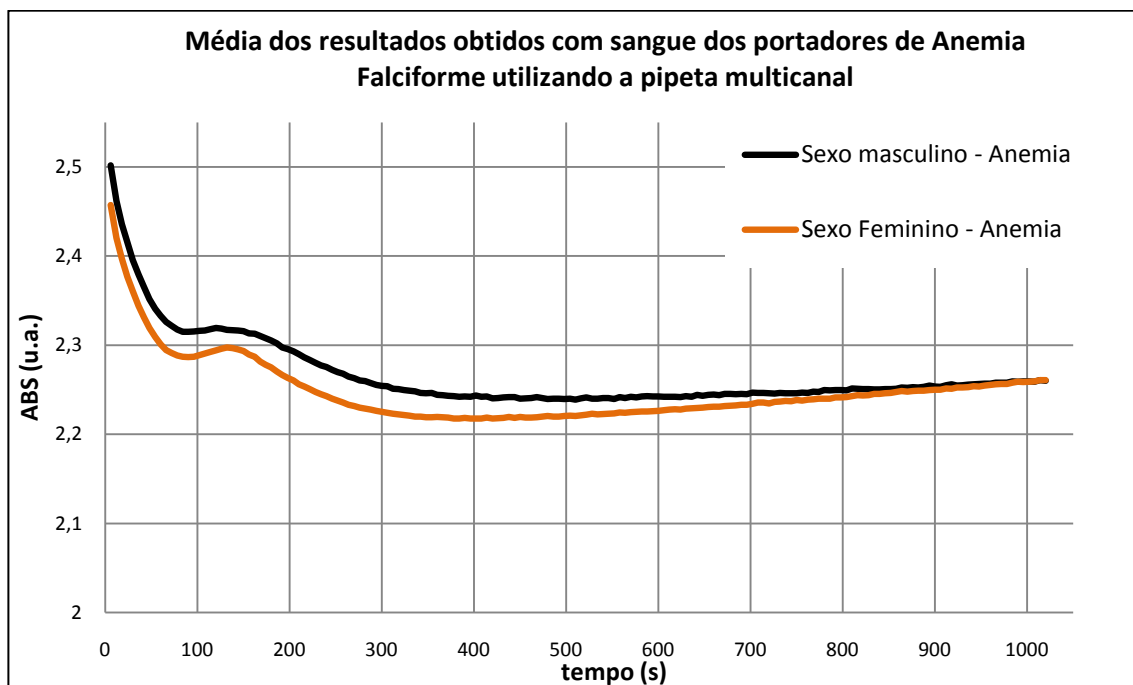
**Figura 4.7:** Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos doadores, separados por gênero, utilizando a pipeta monocal com deslocamento positivo. A curva em azul representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo masculino. A curva em vermelho representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos doadores do sexo feminino.

Nota-se que mesmo havendo uma diferença visível das curvas para as duas pipetas, o formato seguiu o esperado para a curva de agregação-sedimentação-compactação do sangue.

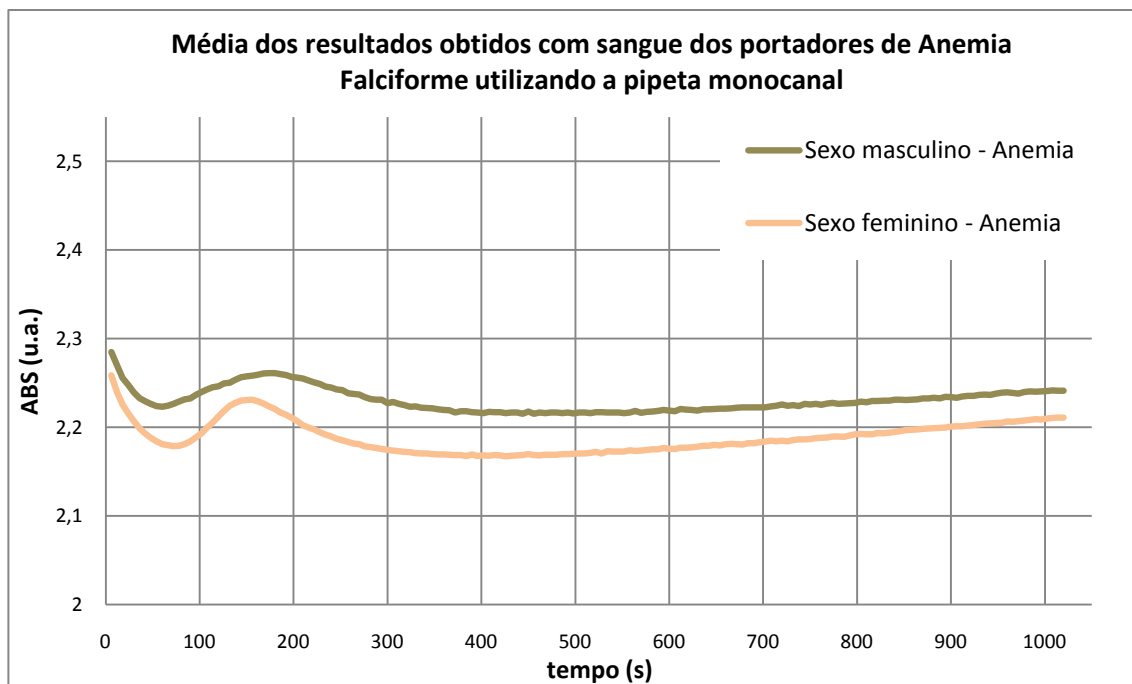
#### 4.3.2 Curvas obtidas das amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme.

Para as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do ambulatório do Hemominas também foram realizados dois ensaios, um para cada tipo de pipeta, com a quantidade máxima de réplicas possíveis. Os dados também foram separados por tipo de pipeta e pelo gênero do voluntário.

As figuras 4.8 e 4.9 representam as curvas obtidas pelo valor médio de todos os resultados obtidos com amostras dos pacientes, para ambos os gêneros e para cada tipo de pipeta.



**Figura 4.8:** Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme, separados por gênero, utilizando a pipeta multicanal eletrônica. A curva em preto representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo masculino. A curva em laranja representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos pacientes com de Anemia Falciforme do sexo feminino.

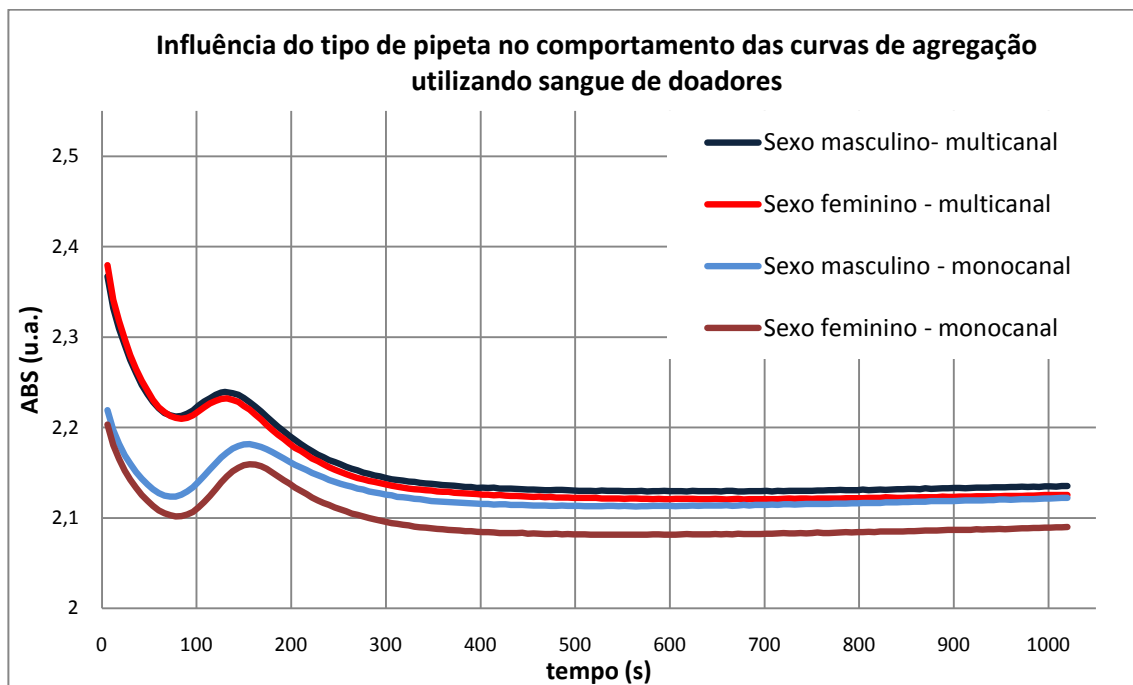


**Figura 4.9:** Gráfico da absorbância em função do tempo demonstrando o comportamento das curvas obtidas pelo valor médio de todas as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme, separados por gênero, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo. A curva em cinza representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados, utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo masculino. A curva em laranja representa a média obtida de todos os resultados dos ensaios realizados utilizando amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme do sexo feminino.

Mesmo havendo diferença entre as curvas para os dois tipos de pipetas e levando-se em consideração as características das hemácias falcêmicas, o formato das curvas ASC dos pacientes se parece com o formato das curvas ASC dos doadores.

#### 4.4 Influência do tipo de pipeta.

Pela figura 4.10 é possível observar diferenças entre os ensaios realizados com a pipeta multicanal eletrônica e a pipeta monocanal com deslocamento positivo. Nota-se um valor alto da absorvância inicial ( $ABS_0$ ) nos ensaios com a multicanal em relação à monocanal. Por outro lado, o pico de formação do gel é mais pronunciado com a aplicação feita pela pipeta monocanal com um êmbolo (deslocamento positivo, específica para líquidos viscosos), que por contato direto empurra o líquido para fora, do que quando a aplicação é feita pela pipeta multicanal tradicional.



**Figura 4.10:** Gráfico da absorvância em função do tempo evidenciando a diferença no comportamento das curvas de agregação obtidas com sangue de doadores utilizando as pipetas multicanal eletrônica e monocanal com deslocamento positivo.

O valor de absorvância inicial é mais alto para a pipeta multicanal, devido ao formato cônico das ponteiros utilizadas (figura 4.11), pois na medida em que as amostras são empurradas, a área superficial da ponteira diminui gradativamente, aumentando a pressão, o que gera uma alta taxa de cisalhamento na parte final da ponteira, fazendo com que as hemácias fiquem dispersas no início do ensaio. As ponteiros utilizadas na pipeta monocanal (figura 4.12) possuem formato cilíndrico, devido a este formato a pressão exercida sobre o sangue se mantém praticamente constante durante a ejeção do fluido e de acordo com os



resultados, o cisalhamento causado pela pressão exercida é menor do que o cisalhamento causado pela ponteira cônica.



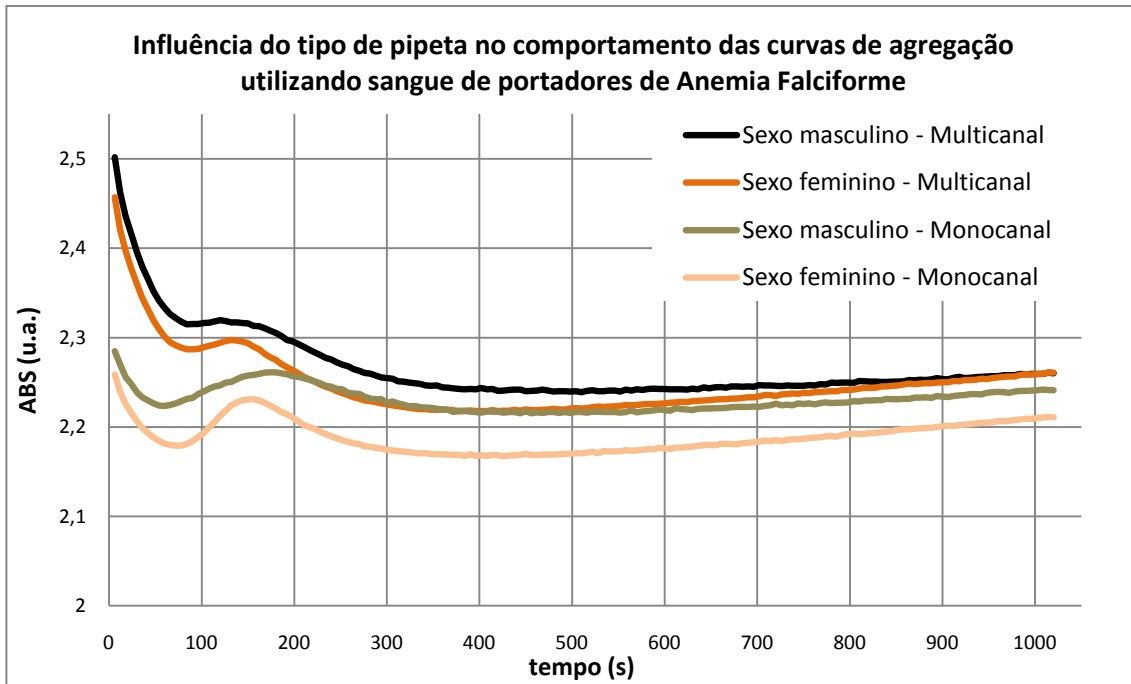
**Figura 4.11:** Ponteira utilizada nos ensaios realizados com a pipeta multicanal eletrônica, seu destacando o formato cônico e a ausência do êmbolo interno.



**Figura 4.12:** Ponteira utilizada nos ensaios realizados com a pipeta monocanal específica para líquidos viscosos, destacando seu formato cilíndrico e a presença do êmbolo interno.

O fato do pico de formação do gel ser mais pronunciado na pipeta monocanal também está associado ao grau de organização das células no início do ensaio, pois como na pipeta monocanal as hemácias iniciam em um estado mais avançado de organização (menor valor de  $ABS_0$ ), a rede tridimensional (gel) tende a ficar mais complexa, mais desorganizada e com menos espaços sem células.

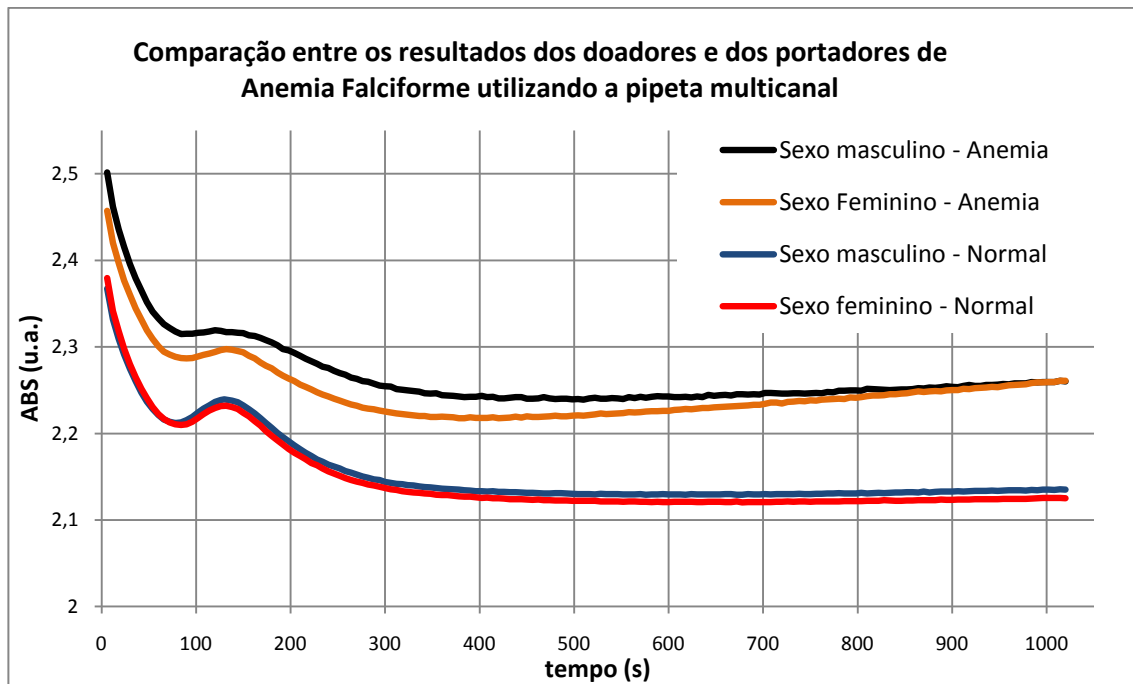
A mesma diferença entre as pipetas ocorrem com sangue dos pacientes com Anemia Falciforme (figura 4.13), onde o fenômeno de formação do pico é mais pronunciado nos resultados obtidos com a pipeta monocanal com deslocamento positivo.



**Figura 4.13:** Gráfico da absorbância em função do tempo mostrando o comportamento das curvas obtidas com sangue de pacientes com Anemia Falciforme. Nota-se a diferença no comportamento das curvas de agregação utilizando as pipetas multicanal eletrônica e monocanal com deslocamento positivo.

#### 4.5 Diferenças entre os grupos amostrados.

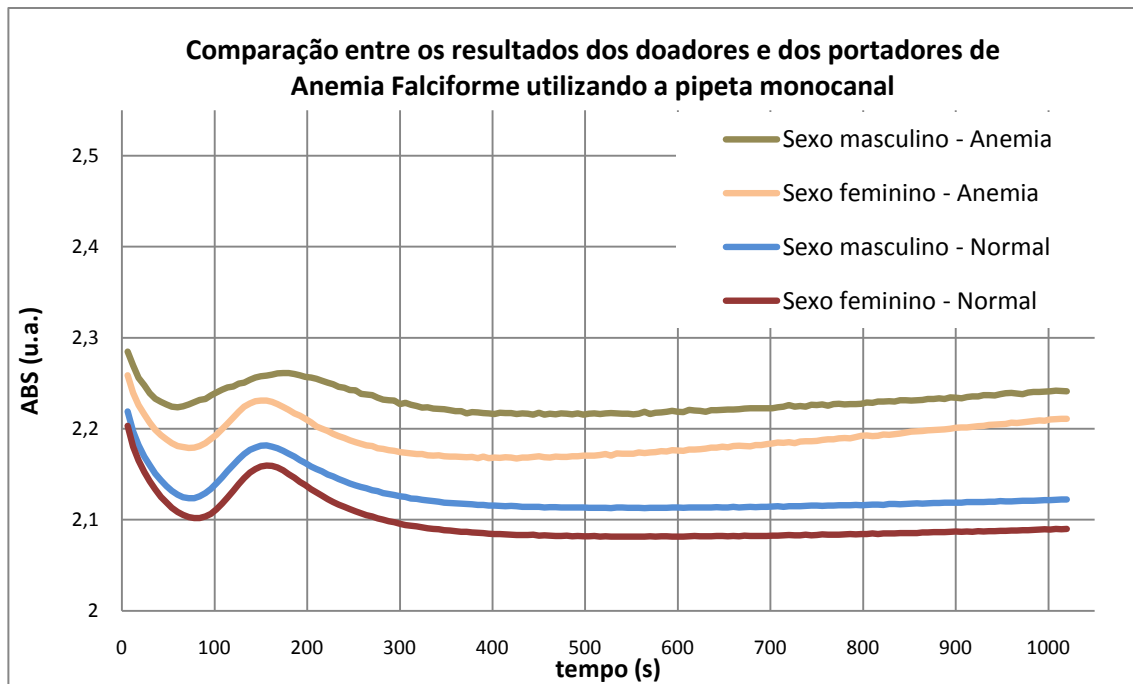
Para verificar possíveis diferenças entre os resultados dos grupos (doadores e pacientes com Anemia Falciforme), as curvas obtidas pelo valor médio de todos os ensaios, foram plotadas em dois gráficos, separados pelo tipo de pipeta utilizada (figuras 4.14 e 4.15).



**Figura 4.14:** Gráfico da absorvância em função do tempo, indicando a diferença entre as curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores e dos pacientes com Anemia Falciforme, utilizando a pipeta multicanal eletrônica.

Devido ao fato da hemoglobina falciforme, quando polimerizada, causar o enrijecimento da membrana, as células falcêmicas não agregam *in vitro*, além de se tornarem muito sensíveis. Fato este que pode ser observado nas figuras 4.14 e 4.15, onde as curvas para as amostras de sangue SS estão acima das curvas das amostras de sangue normal.

Como as células falcêmicas não agregam e são mais suscetíveis a hemólise (aumentando a concentração de hemoglobina no plasma), isto ocasiona aumento no valor da absorvância, fazendo com que as curvas dos pacientes com Anemia Falciforme possuam valores maiores, deslocando-se para cima.



**Figura 4.15:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a diferença entre as curvas obtidas das amostras de sangue dos doadores e dos pacientes com Anemia Falciforme, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo.

Um fato interessante é a curva para o gênero masculino estar sempre acima das curvas do gênero feminino, em todos os resultados, ou seja, apesar de não haver diferença estatística os resultados obtidos nos mostram que o sangue dos homens agrega menos que das mulheres.

Os dados que obtivemos neste trabalho não nos fornece subsídios para afirmar o porquê deste fenômeno. Porém, há a hipótese da diferença ser causada pela quantidade de fibrinogênio.

## 5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores médios ( $\bar{X}$ ), os desvios padrão (s), os coeficientes de variação (CV) e os intervalos de confiança da comparação entre as médias obtidas para os valores de viscosidade do plasma,  $ABS_0$ ,  $tA$ ,  $ABS_A$ ,  $tP$  e  $ABS_P$  são apresentados a seguir.

### 5.1 Estatística descritiva da viscosidade plasmática

Os valores da viscosidade do plasma de cada amostra, foram separados em planilhas eletrônicas, de acordo com o gênero e grupo experimental e depois foram calculados os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação, utilizando o programa *Excel*.

A tabela 5.1 apresenta a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da viscosidade do plasma dos doadores.

**Tabela 5.1:** Estatística descritiva dos valores da viscosidade do plasma ( $\eta$ ) das amostras de sangue dos doadores.  $\bar{X}$  - representa o valor médio, s - o desvio padrão e CV - o coeficiente de variação dos dados.

<b>Viscosidade do plasma dos doadores (mPa.s)</b>			
	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Doadores (total)</b>
$\bar{X}$	1,25	1,24	1,25
s	0,06	0,06	0,06
CV	0,05	0,05	0,05

As médias se encontram dentro do intervalo determinado por Rampling (1989) para indivíduos sadios e de acordo com os coeficientes de variação os dados apresentam baixa instabilidade, ou seja, variam muito pouco.

A tabela 5.2 apresenta a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da viscosidade do plasma dos pacientes.

**Tabela 5.2:** Estatística descritiva dos valores da viscosidade do plasma das amostras de sangue dos pacientes.  $\bar{X}$  - representa o valor médio, s - o desvio padrão e CV - o coeficiente de variação dos dados.

<b>Viscosidade do plasma dos pacientes</b>			
	Masculino	Feminino	Pacientes (total)
$\bar{X}$	1,32	1,41	1,38
s	0,07	0,16	0,14
CV	0,05	0,11	0,10

Para as amostras de indivíduos com Anemia Falciforme, o valor médio da viscosidade plasmática das mulheres e do total de pacientes ultrapassou o valor proposto por Rampling (1989).

Se comparados os valores entre doadores e pacientes, notamos que nos resultados dos pacientes os valores são maiores que dos doadores e os valores do desvio padrão e coeficiente de variação apresentaram maior variabilidade.

Os intervalos de confiança calculados são apresentados na tabela 5.3, para as médias obtidas com as amostras do plasma dos doadores e na tabela 5.4 para as amostras do plasma dos pacientes. Todos os intervalos foram calculados com probabilidade de erro (p) igual a 0,05 (5%).

**Tabela 5.3:** Tabela com os intervalos de confiança das médias obtidas com os valores da viscosidade do plasma dos doadores, separados por gênero, com probabilidade de erro (p) igual a 0,05.

<b>Intervalo de confiança da média (viscosidade do plasma dos doadores)</b>		
Masculino	1,25 ± 0,02	p = 0,05
Feminino	1,24 ± 0,03	
Doadores (total)	1,25 ± 0,02	

**Tabela 5.4:** Tabela com os intervalos de confiança das médias obtidas com os valores da viscosidade do plasma dos doadores, separados por gênero, com probabilidade de erro (p) igual a 0,05.

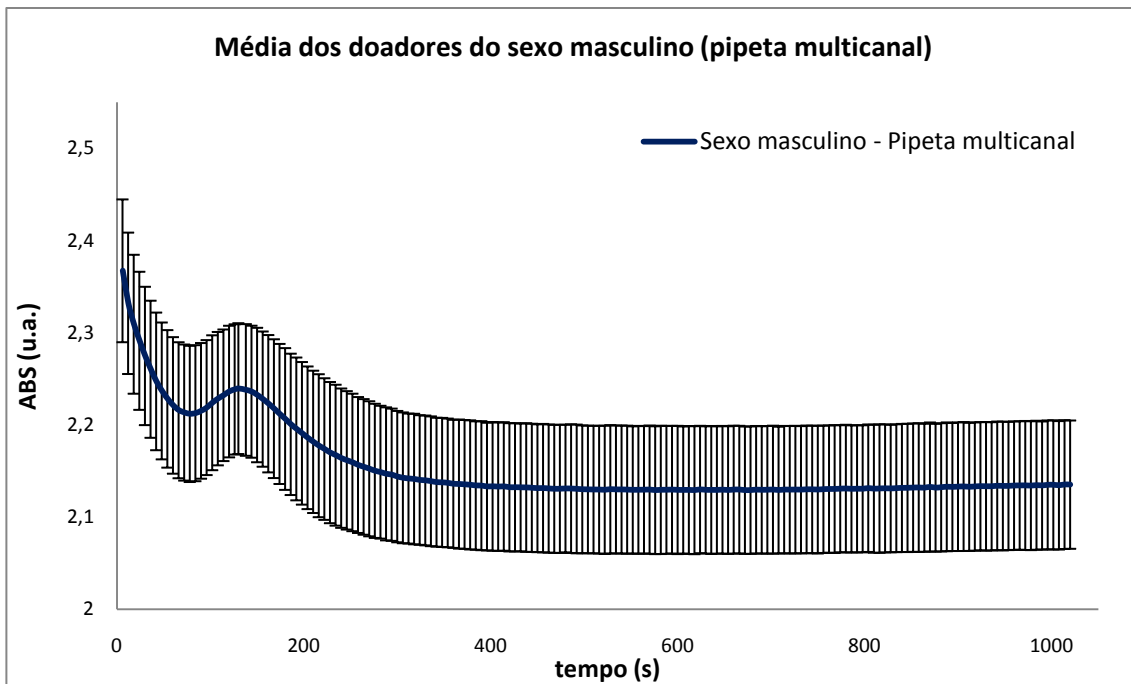
<b>Intervalo de confiança da média (viscosidade do plasma dos pacientes)</b>		
Masculino	1,32 ± 0,07	p = 0,05
Feminino	1,41 ± 0,11	
Pacientes (total)	1,38 ± 0,07	

Com os resultados podemos concluir que as médias obtidas com os valores da viscosidade plasmática dos doadores realmente se encontram dentro do limite proposto por Rampling (1989), onde 95% dos doadores possuem viscosidade plasmática entre 1,23 e 1,27mPa.s e que as médias da viscosidade plasmática dos pacientes se encontram fora deste intervalo, onde 95% dos pacientes possuem viscosidade plasmática entre 1,31 e 1,45mPa.s. Nota-se também que a amplitude do intervalo de confiança dos pacientes é maior que dos doadores.

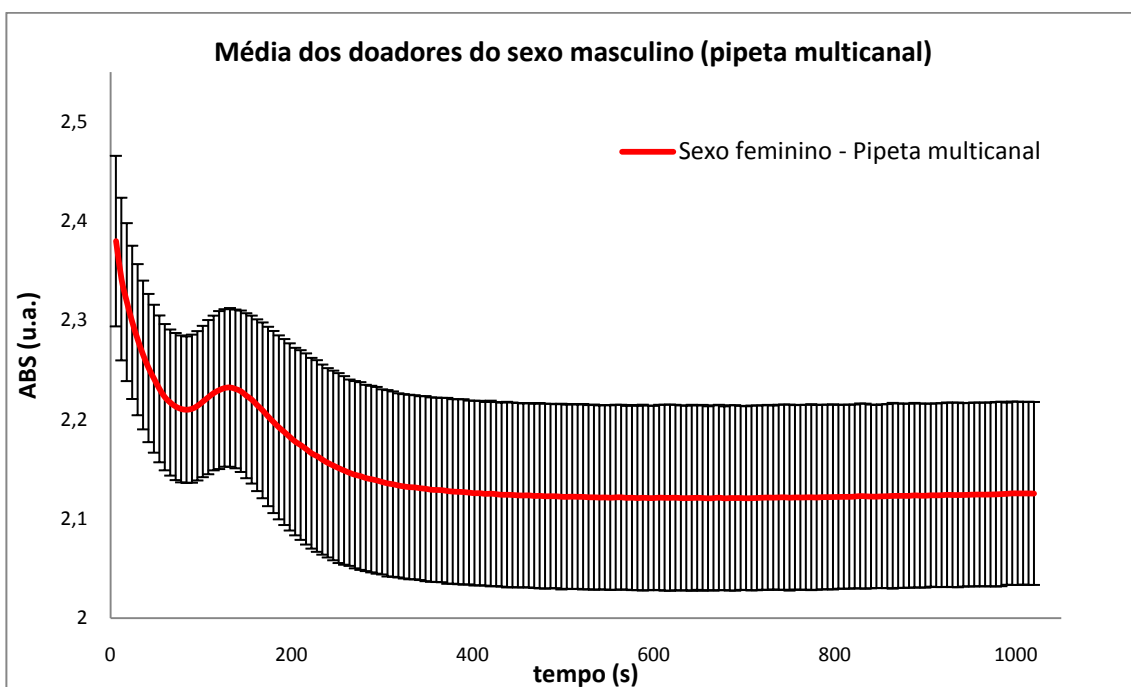
## 5.2 Estatística descritiva para as amostras de sangue dos doadores

Os dados obtidos no leitor de microplacas também foram agrupados em planilhas eletrônicas de acordo com o gênero e o grupo experimental. Desses valores foram calculados, média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada agrupamento (mulheres doadoras, homens doadores, pacientes mulheres e pacientes homens).

As figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 apresentam gráficos com os valores médios e os desvios padrão de cada ponto gerado pelo leitor de microplacas, separados por gênero e tipo de pipeta utilizada, obtidos com as amostras de sangue dos 50 doadores.

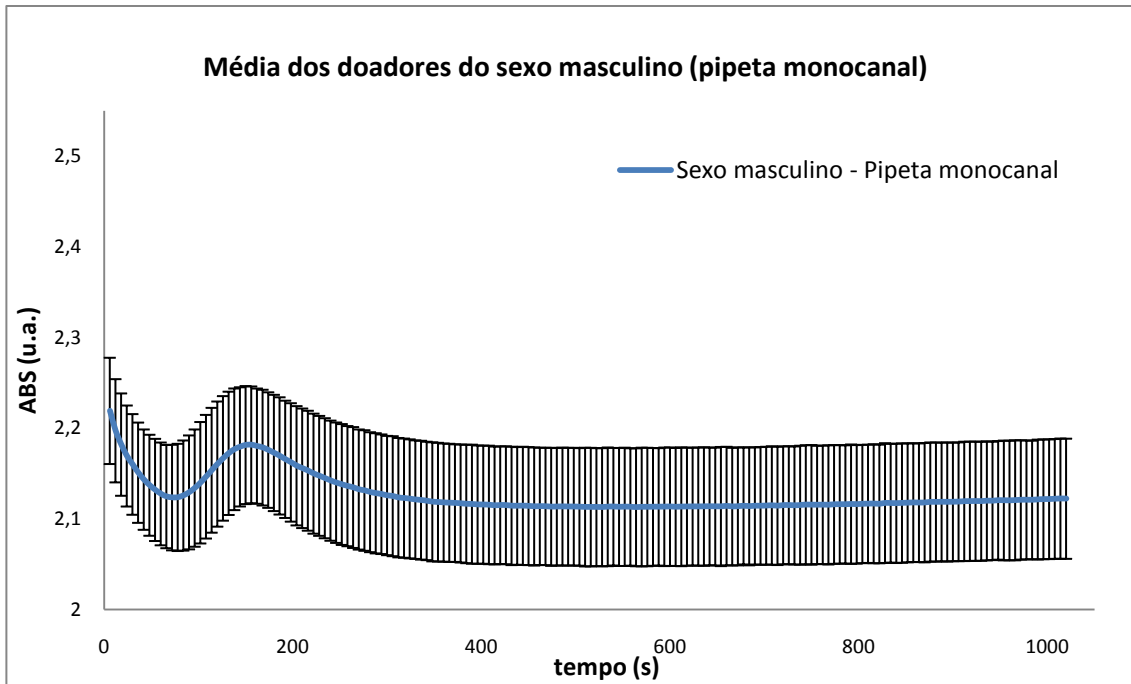


**Figura 5.1:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo masculino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.

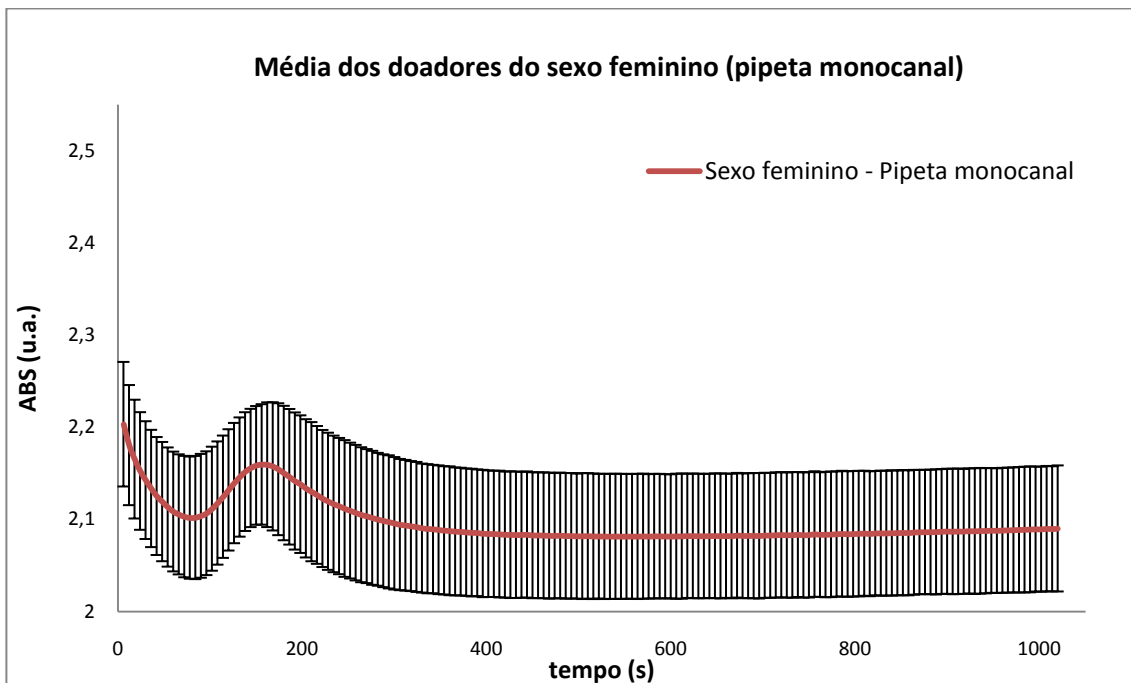


**Figura 5.2:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo feminino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.





**Figura 5.3:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo masculino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.



**Figura 5.4:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos 25 resultados das amostras dos doadores do sexo feminino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.

Nota-se que mesmo fazendo uso de um equipamento automático, como é a pipeta multicanal eletrônica, ocorre variabilidade nos resultados (CV) e de acordo com as tabelas 5.5 e 5.6 podemos afirmar que esta instabilidade varia de ponto para ponto, sendo iguais em alguns deles.

**Tabela 5.5:** Estatística descritiva dos pontos  $ABS_0$ ,  $ABS_A$ ,  $ABS_P$ ,  $tA$  e  $tP$  para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta multicanal eletrônica.  $\bar{X}$  representa a média,  $s$  o desvio padrão e CV o coeficiente de variação.

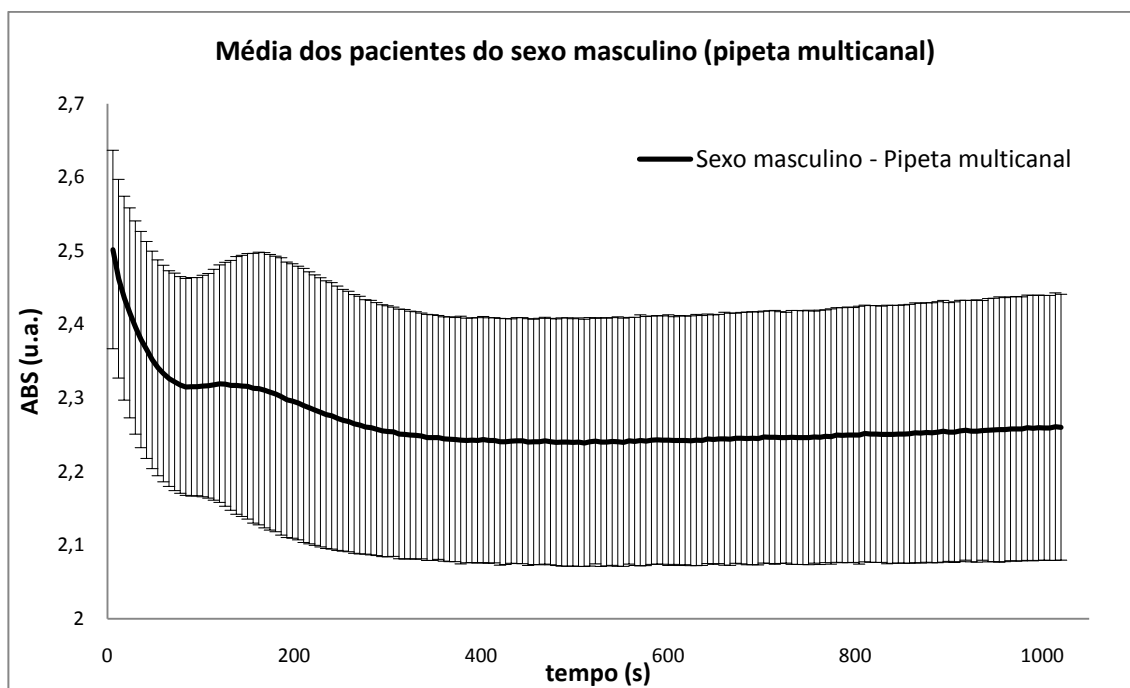
<b>Pipeta multicanal eletrônica (doadores)</b>					
<b>Masculino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,38	78,43	2,21	133,21	2,25
$s$	0,08	10,03	0,07	17,33	0,07
CV	0,03	0,18	0,03	0,13	0,03
<b>Feminino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,38	82,59	2,21	134,11	2,24
$s$	0,09	11,75	0,07	19,39	0,08
CV	0,04	0,14	0,03	0,14	0,04

**Tabela 5.6:** Estatística descritiva dos pontos  $ABS_0$ ,  $ABS_A$ ,  $ABS_P$ ,  $tA$  e  $tP$  para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta monocanal eletrônica.  $\bar{X}$  representa a média,  $s$  o desvio padrão e CV o coeficiente de variação.

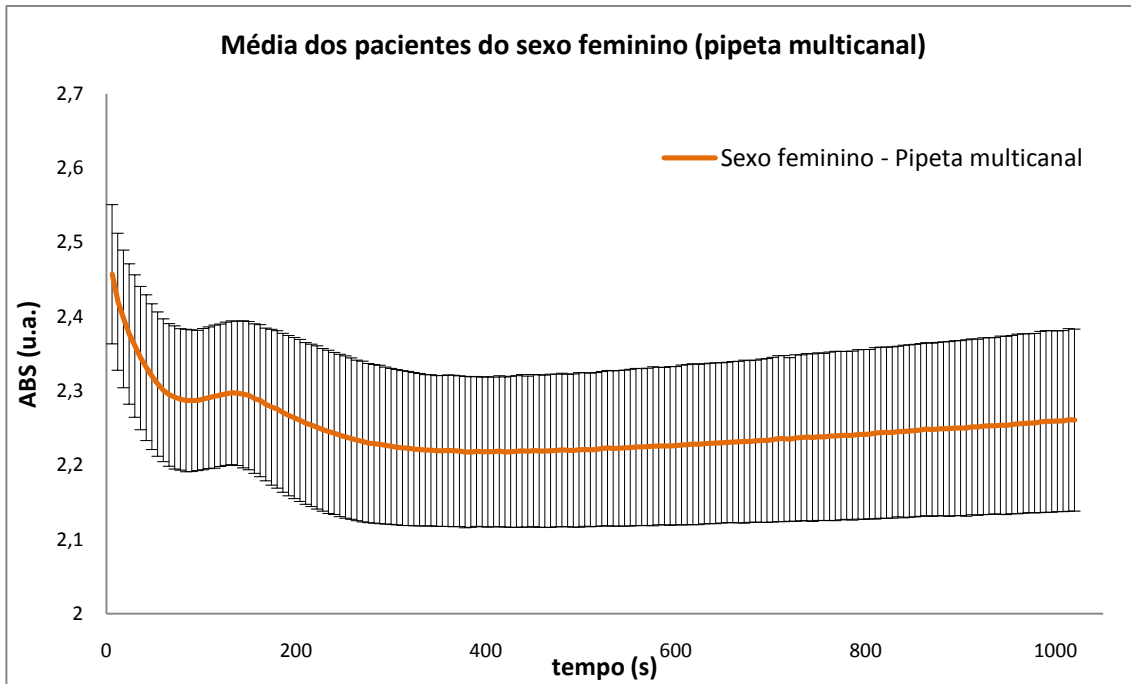
<b>Pipeta monocanal com deslocamento positivo (doadores)</b>					
<b>Masculino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,23	79,58	2,12	154,65	2,20
$s$	0,06	12,68	0,06	23,09	0,07
CV	0,03	0,16	0,03	0,15	0,03
<b>Feminino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,20	81,46	2,10	155,46	2,17
$s$	0,07	12,76	0,07	18,40	0,07
CV	0,03	0,16	0,03	0,12	0,03

### 5.3 Estatística descritiva para as amostras de sangue dos pacientes

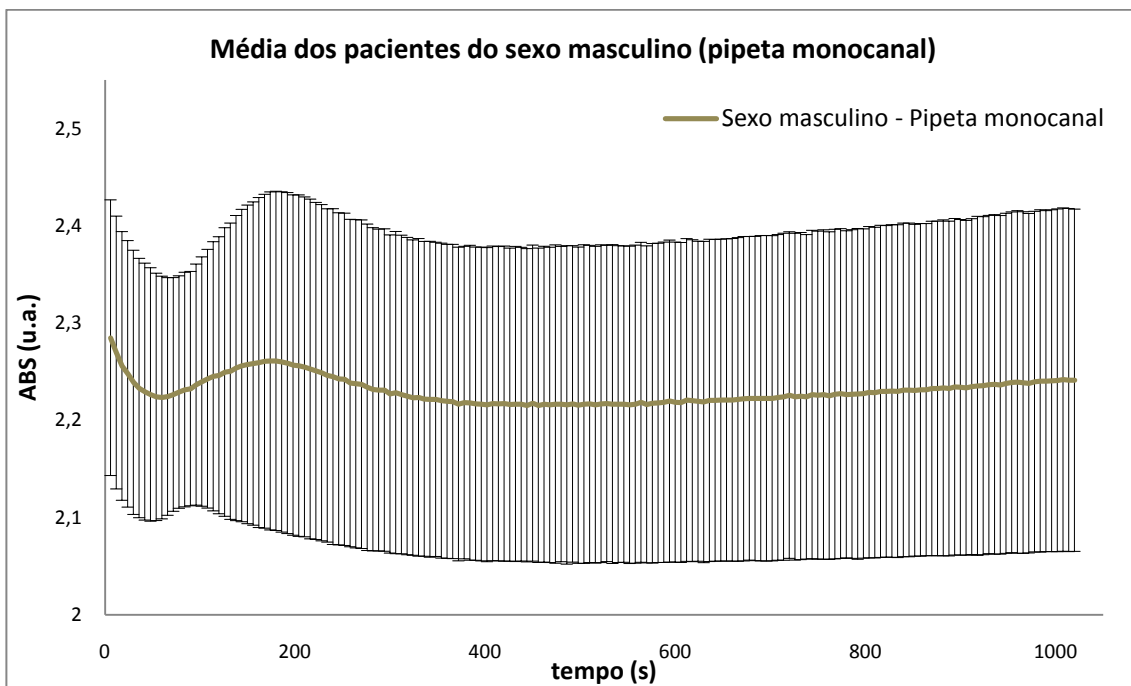
As figuras 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam gráficos com os valores médios e os desvios padrão de cada ponto gerado pelo equipamento, separados por gênero e tipo de pipeta utilizada, obtidos com as amostras de sangue dos 16 pacientes com Anemia Falciforme.



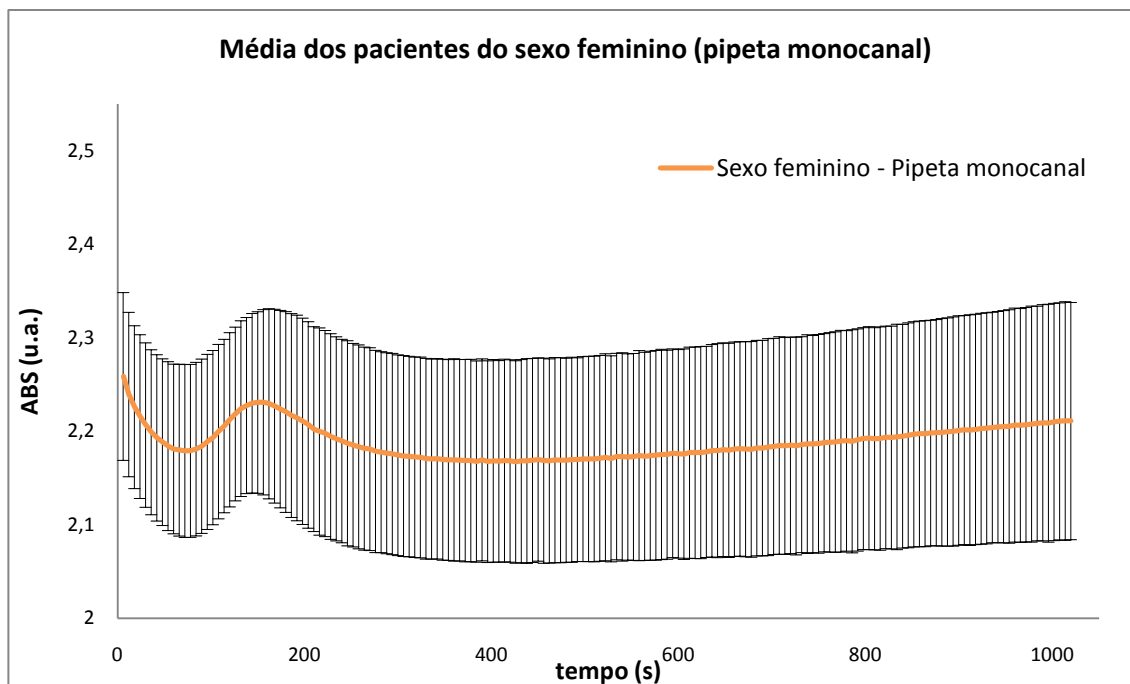
**Figura 5.5:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos seis resultados das amostras dos pacientes do sexo masculino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.



**Figura 5.6:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos dez resultados das amostras dos pacientes do sexo feminino, utilizando a pipeta multicanal eletrônica, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.



**Figura 5.7:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos seis resultados das amostras dos pacientes do sexo masculino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.



**Figura 5.8:** Gráfico da absorvância em função do tempo, demonstrando a curva obtida com o valor médio de cada ponto gerado dos dez resultados das amostras dos pacientes do sexo feminino, utilizando a pipeta monocanal com deslocamento positivo, bem como seus respectivos desvios padrão. A linha colorida contínua representa a média dos pontos gerados pelo equipamento e as barras verticais os desvios padrão do respectivo ponto.

Ao comparar os gráficos dos pacientes, notamos maior variabilidade nos resultados dos pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino. Este fato está possivelmente relacionado ao pequeno número de amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme.

As tabelas 5.7 e 5.8 apresentam os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação para os pontos  $ABS_0$ ,  $ABS_A$ ,  $ABS_P$ ,  $t_A$  e  $t_P$  dos dados conseguidos com as amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme. Os dados estão separados por tipo de pipeta e pelo gênero dos pacientes.

**Tabela 5.7:** Estatística descritiva dos pontos  $ABS_0$ ,  $ABS_A$ ,  $ABS_P$ ,  $tA$  e  $tP$  para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta multicanal eletrônica.  $\bar{X}$  representa a média,  $s$  o desvio padrão e  $CV$  o coeficiente de variação.

<b>Pipeta multicanal eletrônica (pacientes)</b>					
<b>Masculino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,50	90,00	2,31	137,27	2,33
$s$	0,13	12,00	0,15	27,57	0,17
$CV$	0,05	0,13	0,06	0,20	0,07
<b>Feminino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,46	86,03	2,28	138,72	2,30
$s$	0,10	9,14	0,10	28,58	0,10
$CV$	0,03	0,11	0,04	0,21	0,04

**Tabela 5.8:** Estatística descritiva dos pontos  $ABS_0$ ,  $ABS_A$ ,  $ABS_P$ ,  $tA$  e  $tP$  para ambos os gêneros, obtidos com a pipeta monocanal eletrônica.  $\bar{X}$  representa a média,  $s$  o desvio padrão e  $CV$  o coeficiente de variação.

<b>Pipeta monocanal com deslocamento positivo (pacientes)</b>					
<b>Masculino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,29	61,71	2,22	158,71	2,29
$s$	0,14	16,72	0,13	46,91	0,15
$CV$	0,06	0,27	0,06	0,30	0,07
<b>Feminino</b>					
	$ABS_0$	$tA$ (s)	$ABS_A$	$tP$ (s)	$ABS_P$
$\bar{X}$	2,26	73,94	2,18	153,71	2,24
$s$	0,09	11,89	0,09	19,48	0,10
$CV$	0,04	0,16	0,04	0,13	0,04

Quando comparados aos dados dos doadores, os dados dos pacientes apresentam maior variação e da mesma forma, a instabilidade variou de ponto para ponto sendo iguais em alguns deles.

Nota-se que os dados do sexo masculino para ambas as pipetas apresentam maior instabilidade, ou seja, os dados variam mais que os dados do sexo feminino. Fato possivelmente relacionado ao pequeno número de amostras (seis) do sexo masculino analisadas.

## 5.4 Comparação entre pares (pareamento)

A comparação entre os tipos de pipetas utilizados, para determinarmos a existência de diferença significativa entre elas, nos permite utilizar o método do pareamento, pois a comparação será feita dentro do mesmo grupo experimental. Esta metodologia simplifica os cálculos e, neste caso, anula o efeito do gênero nas comparações.

Nesta análise podem surgir valores negativos, pois no método de comparação entre pares é feito a subtração de uma média pela outra, porém este valor negativo em nada interfere na análise pois o que nos permite inferir sobre nossos resultados é o intervalo de confiança.

As tabelas 5.9 e 5.10 apresentam os intervalos de confiança da diferença entre as pipetas para cada ponto determinado de acordo com cada grupo experimental.

**Tabela 5.9:** Intervalos de confiança, obtidos pelo método de comparação de pares, dos pontos  $ABS_0$ ,  $tA$ ,  $ABS_A$ ,  $tP$ , e  $ABS_P$ , com os resultados das amostras de sangue dos doadores, separados pelo gênero.  $p$  é a probabilidade de erro.

Intervalo de confiança da comparação entre as pipetas (doadores)		
Masculino		
$ABS_0$	$0,14 \pm 0,02$	$p < 0,001$
$tA$	$0 \pm 3$	$p = 0,05$
$ABS_A$	$0,09 \pm 0,02$	$p < 0,001$
$tP$	$-19 \pm 6$	$p < 0,001$
$ABS_P$	$0,04 \pm 0,01$	$p < 0,001$
Feminino		
$ABS_0$	$0,17 \pm 0,03$	$p < 0,001$
$tA$	$1 \pm 4$	$p = 0,05$
$ABS_A$	$0,11 \pm 0,03$	$p < 0,001$
$tP$	$22 \pm 5$	$p < 0,001$
$ABS_P$	$0,07 \pm 0,03$	$p < 0,001$

Dentro do grupo dos doadores, apenas o ponto “tempo de agregação” ( $tA$ ), para ambos os gêneros, não apresenta diferença entre as pipetas utilizadas. Já os demais diferem-se de acordo com a pipeta utilizada com probabilidade de erro menor que 0,1%.

**Tabela 5.10:** Intervalos de confiança, obtidos pelo método de comparação de pares, dos pontos ABS<sub>0</sub>, tA, ABS<sub>A</sub>, tP, e ABS<sub>P</sub>, com os resultados das amostras de sangue dos pacientes com Anemia Falciforme. p é a probabilidade de erro.

<b>Intervalo de confiança da comparação entre as pipetas (pacientes)</b>		
<b>Masculino</b>		
ABS <sub>0</sub>	0,20 ± 0,11	<b>p&lt;0,001</b>
tA	27 ± 9	<b>p&lt;0,001</b>
ABS <sub>A</sub>	0,09 ± 0,07	p=0,05
tP	<b>-21 ± 23</b>	p=0,05
ABS <sub>P</sub>	0,06 ± 0,04	p=0,05
<b>Feminino</b>		
ABS <sub>0</sub>	0,19 ± 0,04	<b>p&lt;0,001</b>
tA	11 ± 8	p=0,05
ABS <sub>A</sub>	0,09 ± 0,03	<b>p&lt;0,001</b>
tP	-17 ± 14	p=0,05
ABS <sub>P</sub>	0,05 ± 0,03	p=0,05

No grupo dos pacientes com Anemia Falciforme, apenas o ponto “tempo do pico” (tP) para o sexo masculino, não apresenta diferença entre as pipetas utilizadas. Todos os demais intervalos confirmam a diferença entre as pipetas com probabilidades de erro iguais a 5% e 0,1%, de acordo com cada ponto.

Estes resultados nos permite afirmar que podemos diferenciar os resultados obtidos com as duas pipetas, porém tomando o devido cuidado de escolher os pontos em que o intervalo de confiança é menor que a média (intervalos em preto) e excluir os intervalos maiores que a média (intervalos em vermelho). Outro fator relevante nos resultados é que o valor de “t” calculado nos permite afirmar que a probabilidade de erro foi menor que 0,1 %, ou seja, probabilidade de erro foi de um para mil em alguns pontos.



## 5.5 Comparação entre os gêneros dentro dos grupos experimentais

Para a comparação entre os gêneros nos dois grupos experimentais, utilizamos a análise de variância para obtenção do valor do desvio do erro experimental e do intervalo de confiança da diferença entre duas médias para compará-las.

A tabela 5.11 apresenta os intervalos de confiança da diferença entre as médias dos pontos pré-estabelecidos dos sexos masculino e feminino do grupo dos doadores, separados pelo tipo de pipeta utilizada.

**Tabela 5.11:** Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos sexos masculino e feminino, do grupo dos doadores.

<b>Intervalo de confiança da diferença entre as médias dos doadores</b>		
<b>Pipeta multicanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	<b>0,01 ± 0,05</b>	p = 0,05
tA	<b>3 ± 5</b>	
ABS <sub>A</sub>	<b>0,00 ± 0,04</b>	
tP	<b>0 ± 9</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>0,00 ± 0,04</b>	
<b>Pipeta monocanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	<b>-0,02 ± 0,04</b>	p = 0,05
tA	<b>2 ± 6</b>	
ABS <sub>A</sub>	<b>-0,03 ± 0,04</b>	
tP	<b>1 ± 11</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>-0,03 ± 0,04</b>	

Pelos resultados apresentados não existe diferença significativa entre as curvas médias de homens e mulheres do grupo dos doadores, não importando qual pipeta fora utilizada. De acordo com a tabela 5.11, todos os intervalos de confiança englobam o valor zero, confirmando a insignificância dos resultados apresentados, com probabilidade de erro de 5%.

A tabela 5.12 apresenta os intervalos de confiança da diferença entre as médias dos pontos pré-estabelecidos dos sexos masculino e feminino do grupo dos pacientes, separados pelo tipo de pipeta utilizada.

**Tabela 5.12:** Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos sexos masculino e feminino, do grupo dos pacientes.

<b>Intervalo de confiança da diferença entre as médias dos pacientes</b>		
<b>Pipeta multicanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	p = 0,05
tA	<b>5 ± 9</b>	
ABS <sub>A</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	
tP	<b>6 ± 29</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	
<b>Pipeta monocanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	p = 0,05
tA	<b>-10 ± 12</b>	
ABS <sub>A</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	
tP	<b>9 ± 32</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>0 ± 0,1</b>	

Para os pacientes, também não existe diferença significativa entre as curvas médias dos sexos feminino e masculino para os ensaios de agregação-sedimentação-compactação das hemácias, independente do tipo de pipeta utilizada.

#### 5.6 Comparação entre os grupos experimentais do mesmo gênero.

Para verificar se os resultados de cada grupo diferem estatisticamente, calculamos o valor do desvio padrão do erro experimental através da análise de variância e comparamos a diferença entre as médias pelo cálculo do intervalo de confiança.

A tabela 5.13 apresenta os valores dos intervalos de confiança obtidos pela diferença das médias dos pontos determinados entre doadores e pacientes do sexo masculino separados pela pipeta utilizada.

**Tabela 5.13:** Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos doadores e pacientes do sexo masculino. Probabilidade de erro (p) de 5%.

<b>Diferença entre doadores e pacientes do sexo masculino</b>		
<b>Pipeta multicanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	0,15 ± 0,1	
tA	-11 ± 8	
ABS <sub>A</sub>	0,12 ± 0,09	p = 0,05
tP	<b>10 ± 16</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>0,1 ± 0,1</b>	
<b>Pipeta monocanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	0,09 ± 0,07	
tA	-16 ± 11	
ABS <sub>A</sub>	0,12 ± 0,07	p = 0,05
tP	<b>11 ± 24</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>0,08 ± 0,09</b>	

De acordo com a tabela 5.13 é possível diferenciar os resultados entre doadores e pacientes do sexo masculino apenas nos pontos ABS<sub>0</sub>, tA, ABS<sub>A</sub> independente da pipeta utilizada.

Na curva ASC os pontos ABS<sub>0</sub>, tA, ABS<sub>A</sub> correspondem ao fenômeno da agregação das hemácias, ou seja, estatisticamente apenas a primeira etapa do processo de agregação-sedimentação-compactação do sangue é diferente entre doadores e pacientes com Anemia Falciforme do sexo masculino.

A tabela 5.14 apresenta os valores dos intervalos de confiança obtidos pela diferença das médias dos pontos determinados entre doadoras e pacientes do sexo feminino separados pela pipeta utilizada.

**Tabela 5.14:** Intervalos de confiança da diferença entre as médias dos doadoras e pacientes do sexo feminino. Probabilidade de erro (p) de 5%.

<b>Diferença entre doadoras e pacientes do sexo feminino</b>		
<b>Pipeta multicanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	-0,08 ± 0,07	
tA	<b>-2 ± 7</b>	
ABS <sub>A</sub>	-0,07 ± 0,06	p = 0,05
tP	<b>-4 ± 16</b>	
ABS <sub>P</sub>	<b>-0,06 ± 0,07</b>	
<b>Pipeta monocanal</b>		
ABS <sub>0</sub>	-0,07 ± 0,06	
tA	<b>7 ± 9</b>	
ABS <sub>A</sub>	-0,09 ± 0,06	p = 0,05
tP	<b>0 ± 13</b>	
ABS <sub>P</sub>	-0,09 ± 0,06	

Os resultados mostram que para o sexo feminino, utilizando a pipeta multicanal, há a distinção entre as curvas das doadoras e das pacientes apenas nos pontos ABS<sub>0</sub> e ABS<sub>A</sub> e utilizando a pipeta monocanal o ponto ABS<sub>P</sub> também ocorre diferença significativa.

Nos resultados do sexo feminino apenas os valores de absorvância (ABS<sub>0</sub> e ABS<sub>A</sub>) nos permite diferenciar estatisticamente as curvas das duas pipetas e assim como nos homens, permite diferenciar apenas a etapa inicial do processo de agregação-sedimentação-compactação do sangue.

## 6 CONCLUSÕES

Com a utilização do protocolo proposto neste trabalho conseguimos um padrão de curvas que descrevem o comportamento do sangue em repouso e determina as fases de agregação, sedimentação e compactação das hemácias.

A técnica utilizada foi capaz de detectar, com grande sensibilidade, diferenças no cisalhamento ocasionado pelas ponteiros utilizadas, no momento de ejeção das amostras nos micropoços, com probabilidade de erro de um para mil (0,001).

Os valores de viscosidade plasmática obtidos dos doadores estão de acordo com os valores apresentados na literatura e a viscosidade do plasma dos pacientes com Anemia Falciforme são mais elevados.

Utilizando-se os pontos propostos não foi possível observar diferença significativa entre os gêneros do mesmo grupo.

Dependendo dos pontos analisados os resultados para as duas pipetas utilizadas são diferentes estatisticamente para os dois grupos estudados. Porém a pipeta monocanal tem a vantagem de reduzir os valores de absorbância, trazendo as curvas ASC para a faixa de absorbância ideal do equipamento, além de pronunciar a formação do gel e evitar a formação de bolhas nas amostras durante a aplicação no micropoço.

Entre os grupos estudados (doadores e pacientes com Anemia Falciforme) a técnica utilizada foi capaz de diferenciar apenas a etapa inicial (agregação) das amostras de sangue para ambas pipetas.

O tempo demonstrou ser um parâmetro ineficiente para as análises estatísticas, pois na maioria dos resultados tanto o tA como o tP não nos mostram diferenças significantes entre as análises.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a diferença entre os pontos críticos da curva ASC (absorbância no final da agregação -  $ABS_A$  e absorbância no final da compactação -  $ABS_{400}$ , i.e, absorbância após 400 segundos).

Dosar a quantidade de fibrinogênio presente nas amostras.

Prosseguir o estudo quantitativo de amostras dos pacientes com Anemia Falciforme para cada gênero.

Analisar amostras de sangue de outras doenças que alterem a reologia do sangue como o diabetes.

Verificar a ação de drogas na reologia de sangue patológico através desta técnica espectrofotométrica.

Fazer o modelamento matemático da curva de agregação, sedimentação, compactação do sangue.

Dosar a quantidade de proteínas totais das amostras de plasma.

## 8 REFERÊNCIAS

- AUGUSTA, B. Erythrocyte Membrane Damage in Hemolytic Anemias. In: HARRIS, J. R. Blood Cell Biochemistry. [S.l.]: Plenum, 1990. Cap. 15.
- BARTOSZ, G. Erythrocyte Membrane Changes during Aging in Vivo. In: HARRIS, J. R. Blood Cell Biochemistry. New York: Plenum, 1990. Cap. 3.
- BASHFORD, C. L.; HARRIS, D. A. Spectrophotometry & spectrofluorimetry a practical approach. [S.l.]: IRL Press, 1987.
- BASKURT, O. K. et al. (Eds.). Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Amsterdam: IOS Press, 2007.
- BASKURT, O. K.; MEISELMAN, H. J. Blood Rheology and Hemodynamics. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, New York, v. 29, p. 435-50, 2003.
- BASKURT, O. K.; YALCIN, O.; MEISELMAN, H. J. Hemorheology and vascular control mechanisms. Clinical Hemorheology and Microcirculation, p. 169-178, 2004.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 6ª. ed. New York: Freeman, 2007.
- BISHOP, J. J. et al. Rheological effects of red blood cell aggregation in venous network: A review of recent studies. Biorheology, v. 38, 2001.
- BRUN, J.-F.; CONNES, F.; VARLET-MARIE, E. Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity. Science & Sports, Montpellier, v. 22, p. 251-266, 2007.
- BURTON, A. C. Sangue, o fluido circulante. In: BURTON, A. C. Fisiologia e Biofísica da Circulação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. Cap. 2-5, p. 15-56.
- CARDOSO, A. V. et al. Microplate Reader Analysis of Triatomine Saliva. Materials Research, v. 10, p. 31-36, 2007.
- CARDOSO, A. V.; CAMARGOS, A. O. Geometrical Aspects During Formation of Compact Aggregates of Red Blood Cells. Materials Research, v. 5, 2002.
- CARVALHO, J. A. A. Mecânica de fluidos aplicada a escoamento do sangue na microcirculação. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2006.

- CHIEN, S. Electrochemical and ultrastructural aspects of red blood cell aggregation. *Bibliotheca anatomica*, v. 11, p. 244-250, 1973.
- FABRY, T. L. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*, v. 70, p. 1572-1576, November 1987.
- GRZEGORZEWSKI, B.; KOWALINSKA, E. Optical Properties of Human Blood Sediment. *ACTA Physica Polonica A*, v. 101, p. 201-209, 2002.
- HERRICK, J. B. Peculiar Elongated and Sickle-shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 74, p. 179-184, 2001.
- HIGGINS, J. M. et al. Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluid device. *PNAS*, v. 104, p. 20496-500, 2007.
- HOLTZCLAW, D. J. et al. Rehydration of high-density sickle erythrocyte in vivo. *Blood*, v. 100, p. 3017-25, 2002.
- HOUSSAY, A. B.; CINGOLANI, H. E. *Fisiologia humana de Houssay*. 7<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- INGRAM, V. M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. *Nature*, v. 180, p. 326-28, 1957.
- JAYAVANTH, S.; SINGH, M. Computerized analysis of erythrocyte aggregation from sequential video-microscopic images under gravitational sedimentation. *ITBM-RBM*, v. 25, p. 67-74, 2004.
- JOHNSON, C.; TELEN, M. J. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Hematologica*, v. 93, p. 481-6, 2008.
- KATCHALSKY, A. et al. Interactions of basic polyelectrolytes with the red blood cell. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 33, p. 120-138, 1959.
- LIU, Y.; LIU, K. K. Rheology of red blood cell aggregation by computer simulation. *Journal of Computational Physics*, Evaston, p. 139-154, jun. 2006.
- LOMINADZE, D.; DEAN, W. D. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte membrane. *FEBS Letter*, v. 517, p. 41-44, 2002.
- MAEDA, N. et al. Interaction between plasma high molecular weight proteins and erythrocyte aggregation. *Fist world congress of biomechanics*, California, v. 2, p. 247, 1990.



- MARTINS, G. S. Estudo da Agregação e Sedimentação Eritrocitária Utilizando Diferentes Técnicas Experimentais. Universidade Federal de ouro Preto. Ouro Preto, p. 124. 2007a.
- MARTINS, G. S. et al. Influência do fibrinogênio bovino na adesão e agregação eritrocitária. Revista Matéria, v. 12, p. 193-205, 2007.
- MARTORANA, M. C. et al. Sickle cell anemia: haemorheological aspects. Ann Ist Super Sanità, v. 43, p. 164-170, 2007.
- MONTE, G. U.; PALHARES, R. B.; DA MOTTA, E. V. Correlação anatomoclínica. São Paulo: Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 78, 2002.
- MURADOR, P.; DEFFIUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. Revista braselria de hematologia e hemoterapia, Botucatu, v. 29, p. 168-178, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Leninger Princípios de Bioquímica. 3ª. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NETO, G. C. D. G.; PITOMBEIRA, M. D. S. Aspectos noleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 23 maio 2002.
- NEU, B.; MEISELMAN, H. J. Depletion-Mediated Red Blood Cell Aggregation in Polymer Solutions. Biophysical Journal, v. 83, p. 2482-90, 2002.
- PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular disease. Science, v. 110, p. 543-48, novembro 1949.
- PERUTZ, M. F. et al. Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. Nature, v. 185, p. 416-22, 1960.
- PEPEL, A. S.; JOHNSON, P. C. Microcirculation and Hemorheology. Annual Reviews on Fluid Mechanics, v. 37, p. 43-69, 2005.
- PRIEZZHEV, A. V.; FIRSOV, N. N.; LADEMANN, J. Light backscattering diagnostics of red blood cell aggregation in whole blood samples. In: TUCHIN, V. V. Handbook of optical biomedical diagnostics. Moscow: SPIE PRESS, 2002. Cap. 11, p. 651-674.
- RAMPLING, M. W. Plasma-protein induced aggregation of erythrocytes: its causes, estimation, and effects on blood flow. Studia Biophysica, v. 134, p. 91-94, 1989.

- ROSSETT, J. J.; ABATTI, P. J. Análise da passagem da célula vermelha do sangue através de poros cilíndricos. *Tendências em matemática aplicada e computacional*, Curitiba, 3, n. 1, 2002. 193-202.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3ª. ed. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2007. 265 p.
- SAMSEL, R. W.; PERELSON, A. S. Kinetics of rouleaux formation. *Biophysical Journal*, Providence, v. 37, p. 493-514, February 1982.
- SCHIMID-SCHÖBEIN, H. et al. Microrheology and protein chemistry of pathological red cell aggregation (blood sludge) studied in vitro. *Biorheology*, v. 10, p. 213-227, 1973.
- SCHIMID-SCHÖBEIN, H.; MALOTTA, H.; STRIESOW, F. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods of assessment. *Tijdschr NVKC*, v. 15, p. 88-37, 1990.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª. ed. [S.l.]: Bookman, 2002.
- STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sick cell disease. *Lancet*, v. 364, p. 1343-60, 2004.
- TURHAN, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. *PNAS*, v. 99, p. 3047-51, March 2002.
- VERDUZCO, L. A.; NATHAN, D. G. Sick cell disease and stroke. *Blood*, v. 114, p. 5117-5125, 2009.
- VILELA, G. G. *Bioquímica do sangue*. Rio de Janeiro: Livraria Odeon, 1941.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 3ª. ed. [S.l.]: Wiley, 2004.
- WALKOMIAK, B.; KESY, A.; MICHALEC, L. Microplate Reader - a convenient tool in studies of blood coagulation. *Thrombosis research*, v. 87, p. 95-103, 1997.
- WATSON, J.; STAHPAN, A. W.; BILELLO, F. P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 215, p. 419-23, 1948.
- YAROSLAVSKY, A. N. et al. Optics of blood. In: TUCHIN, V. V. *Handbook of optical biomedical diagnostics*. Massachusetts: SPIE PRESS, 2002.

## 9 APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento utilizado para coleta de amostras na Fundação Hemominas.



1  
Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais CETEC  
Setor de Análises Químicas  
Laboratório de Reologia

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

*Pesquisa:* ESTUDO DA AGREGAÇÃO ERITROCITÁRIA E SEDIMENTAÇÃO DO SANGUE

REGISTRO NO CEP-HEMOMINAS: 190

#### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Pesquisador Responsável: Antonio Valadão Cardoso – Laboratório de Reologia da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC - Tel 31-34892320.

Endereço do CETEC: Av. José Cândido da Silveira, 2000-Horto, Belo Horizonte, MG, CEP 31.170-000.

**O objetivo** da pesquisa é avaliar a agregação das hemácias e sedimentação do sangue, automatizada, de alta exatidão e precisão. Serão colhidas amostras de doadores de sangue e de pessoas com Doença Falciforme, e os resultados serão comparados. Desta forma, poderemos entender melhor a interação entre as hemácias com hemoglobina SS. Isto não trará nenhum benefício imediato, mas poderá ajudar a compreender melhor a Doença Falciforme.

Caso você aceite participar deste projeto, você não terá nenhum custo. Iremos colher 5 mL (mililitros) de seu sangue, através da punção (picada) da veia, quando você for doar sangue ou colher sangue para fazer exames solicitados pelo seu médico. Isto será feito por um profissional treinado, mas em alguns casos pode acontecer hematoma (cor roxa) no local da punção. A amostra de seu sangue será estocada no Laboratório de Reologia da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, e será usada apenas para os fins propostos nesta pesquisa (agregação das hemácias e sedimentação do sangue).

Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não participar desta pesquisa, pois não será prejudicado em seu atendimento caso não queira participar. Também não sofrerá nenhum prejuízo se decidir participar mas desistir depois.

Qualquer dúvida que você tiver, você poderá entrar em contato com Arnaldo Nakamura Filho (Laboratório de Reologia) no telefone 31-34892292, nos horários de 08-12hs e 14-17 hs, de segunda a sexta-feira, para esclarecimentos.

Eu, \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_ anos, após esclarecimentos, aceito participar da pesquisa.

#### *Endereço Residencial*

Rua: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Local \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 10 ANEXOS

ANEXO A – Questionário utilizado para seleção de pacientes aptos a participarem do projeto



***Nova técnica para medir agregação eritrocitária e sedimentação do sangue***

**Projeto PPSUS – FAPEMIG EDT – 83299/06**

**Aprovado: - Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais**

**(Parecer: ETIC 0345/06, CAAE – 0345.0.203.000-06)**

**- Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hemominas (46/2008)**

**Coordenador: Antônio Valadão Cardoso – Pesquisador STQ – Tel: (31) 3489-2320**

**antonio.cardoso@cetec.br**

### QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Idade: \_\_\_\_\_
3. Sexo:     Feminino     Masculino
4. É portador de Hemoglobina SS?     Não     Sim
5. Recebeu transfusão de concentrado de hemácias (ou papa de hemácias ou sangue) no último mês?     Não     Sim
6. Teve febre, infecção ou usou antibióticos nos últimos 7 dias?     Não     Sim
7. Está em uso de hidroxiuréia (ou hydréia)?     Não     Sim
8. Está sentindo dores no abdome, toráx, ossos ou articulações (barriga, peito, ossos ou juntas)?  
 Não     Sim
9. Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura