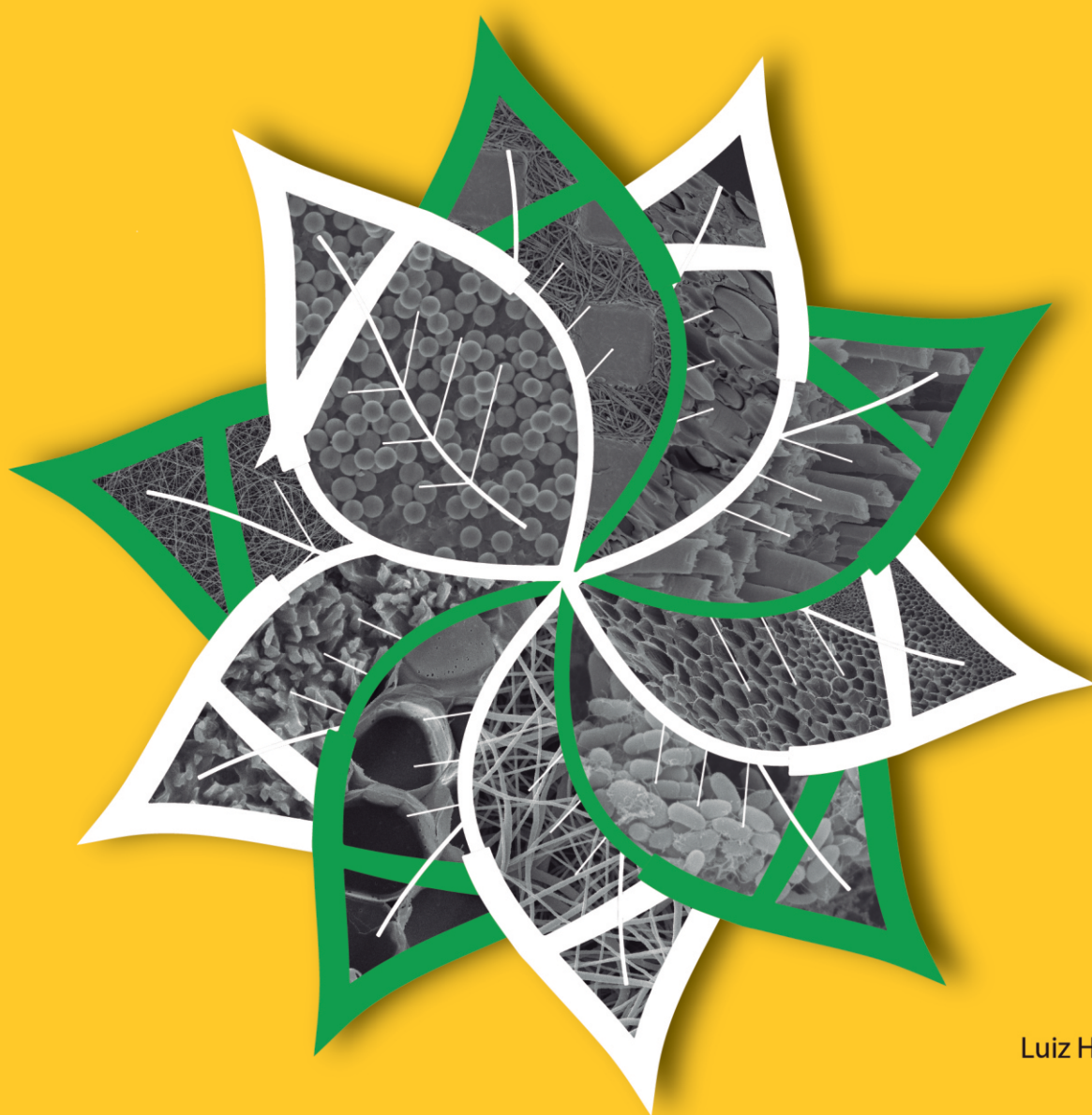


# Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio Anais do IX Workshop 2017



## Editores

Caue Ribeiro de Oliveira  
Elaine Cristina Paris  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Marcelo Porto Bemquerer  
Maria Alice Martins  
Odílio Benedito Garrido de Assis

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Instrumentação  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA  
APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Caue Ribeiro  
Elaine Cristina Paris  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Marcelo Porto Bemquerer  
Maria Alice Martins  
Odílio Benedito Garrido de Assis

**Editores**

Embrapa Instrumentação

São Carlos, SP

2017

**Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:**

**Embrapa Instrumentação**

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br/instrumentação

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Wilson Lopes da Silva

Secretária executiva: Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Membros:

Carlos Renato Marmo

Cínthia Cabral da Costa

Cristiane Sanchez Farinas

Elaine Cristina Paris

Maria Alice Martins

Paulo Renato Orlandi Lasso

Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Letícia Longo

Editoração eletrônica: Valentim Monzane

**1ª edição**

1ª impressão (2017): tiragem 300

As opiniões, conceitos, afirmações e conteúdo desta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados internacionais de catalogação (CIP)**

**Embrapa Instrumentação**

---

Anais do IX Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio – 2017 – São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017.

ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Ribeiro, Caue. II. Paris, Elaine Cristina. III. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. IV. Bemquerer, Marcelo Porto. V. Martins, Maria Alice. VI. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VII. Embrapa Instrumentação.

## MICROSCOPIA DE DESFOCALIZAÇÃO COMO UMA FERRAMENTA DE ESTUDO DE PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE ERITRÓCITOS

Paula M. S. Roma<sup>1</sup>, Luiza C. Mourão<sup>2</sup>, Marcelo P. Bemquerer<sup>3</sup>, Erika M. Braga<sup>2</sup>, Ubirajara Agero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,

<sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, <sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) [paulamagda@ufmg.br](mailto:paulamagda@ufmg.br)

**Classificação:** Avaliação de Segurança de Nanoprodutos

### Resumo

A microscopia de desfocalização (MD) é uma ferramenta de microscopia óptica que tem sido empregada com sucesso para a avaliação de parâmetros morfológicos, químicos e mecânicos de objetos transparentes como os eritrócitos. Nesse sentido, já foi demonstrado, por meio dessa técnica, que proteínas de citoesqueleto de eritrócitos como a actina, as espectrinas e a proteína transmembranaral banda 3 (um transportador do tipo antiporte de cloreto e bicarbonato) são possíveis alvos de tais anticorpos. Resultados de MD evidenciaram que a adição de IgG anti-banda 3 e também de anticorpos presentes em plasmas de pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax* promoveram uma diminuição significativa da amplitude média de flutuações, em nanoescala, em altura (urms) de membranas de eritrócitos. A redução de amplitude foi mais pronunciada em indivíduos anêmicos com malária quando comparados a pacientes não anêmicos. Deste modo, a microscopia de desfocalização é uma ferramenta diagnóstica de alterações morfológicas e mecânicas de eritrócitos, que pode ser empregada em investigação de efeitos de nanoestruturas sobre eritrócitos, podendo contribuir para a avaliação de segurança de nanoprodutos.

**Palavras-chave:** Microscopia de desfocalização; Flutuações nanométricas de membrana; Eritrócitos; Malária; Nanotoxicidade.

### DEFOCUSING MICROSCOPY AS A TOOL TO INVESTIGATE THE MORPHOLOGY AND MEMBRANE FLUCTUATIONS OF RED-BLOOD CELLS

#### Abstract

Defocusing microscopy (DM) is an optical microscopy tool that furnish morphological and mechanical parameters of transparent objects (pure phase objects) like the red-blood cell. Proteins imbedded in and associated to red-blood cell membrane has been investigating as targets for IgG antibodies present in patients with malaria. Immunoproteomic data revealed that cytoskeletal proteins such as spectrin and actin, and the transmembrane chloride/bicarbonate anion exchanger protein (band 3) are possible targets of those antibodies. DM results showed that both anti-band 3 IgG and an anti-erythrocyte polyclonal antibody and antibodies present in the plasma of patients with malaria, either anemic or non-anemic, led to significant diminution of mean square intensity contrast fluctuation in the membrane. The reduction of membrane fluctuations was more pronounced for anemic patients than for those with malaria but non-anemic. Thus, one can use defocusing microscopy as a diagnostic tool for morphological and mechanical parameters of red-blood cells, including nanotoxicity studies.

**Keywords:** Defocusing microscopy; Nanoscale membrane fluctuations; Red-blood cells; Malaria; Nanotoxicity

**Publicação relacionada:** MOURÃO, L.C.; ROMA, P.M.S.; ABOOBACAR, J.S.S.; MEDEIROS, C.M.P.; DE ALMEIDA, Z.B.; FONTES, C.J.F.; AGERO, U.; MESQUITA, O.N.; BEMQUERER, M.P.; BRAGA, E.M. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. Malaria Journal, v. 15, article number 397, agosto 2016.

## 1 INTRODUÇÃO

A microscopia de desfocalização é uma técnica de obtenção e análise de imagem que pode ser aplicada para objetos transparentes. Eritrócitos são objetos bastante apropriados para a análise por microscopia de desfocalização, fornecendo parâmetros morfológicos como o aspecto tridimensional, volume e área superficial e parâmetros mecânicos como a amplitude média da flutuação de membrana. Eritrócitos humanos submetidos a osmolaridades diferentes tornam-se esféricos em meios hipotônicos, sendo que o grau de esfericidade diminui gradativamente com o aumento da osmolaridade. As flutuações de membrana que existem em uma escala manométrica são reduzidas em qualquer condição de estresse osmótico, seja por aumento ou por diminuição da quantidade de água na célula (ROMA et al., 2016). A associação entre a malária e a anemia é uma área importante de investigação, uma vez que modificações na membrana do eritrócito não infectado podem ocorrer devido à ligação de anticorpos IgG produzidos durante a infecção. Investigações de imunoproteômica podem revelar as proteínas que se ligam a esses anticorpos, após a separação proteica em eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massa (MOURÃO et al., 2016). Em um estudo realizado com pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, a principal espécie causadora de malária no Brasil, verificamos que imunoglobulinas G purificadas de pacientes promoveram uma diminuição na amplitude média de flutuação de membrana de eritrócitos de indivíduo sadio. A diminuição foi mais pronunciada para os plasmas de pacientes anêmicos quando comparados aos pacientes que não desenvolveram essa manifestação clínica (MOURÃO et al., 2016). Eritrócitos são ainda empregados como células modelo para o ensaio de toxicidade de nanoestruturas. Estudos na área de nanotoxicidade mostraram que grafeno e óxido de grafeno promovem hemólise com a liberação de hemoglobina. Ensaio clássico de viabilidade celular por meio do monitoramento óptico da redução do brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT) não puderam ser conduzidos devido às propriedades redutoras do grafeno e do óxido de grafeno (LIAO et al., 2016). Deste modo, a microscopia de desfocalização constitui uma ferramenta física promissora para a investigação do efeito de nanoestruturas sobre os eritrócitos, permitindo a avaliação de diversos parâmetros morfológicos e mecânicos em células individuais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Imunoproteômica

Para a focalização isoeletrica, 100 µg do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas não infectadas do tipo O+ foram dissolvidos em 125 µL de solução de reidratação (ureia a 8 mol.L<sup>-1</sup>, tiourea a 2 mol.L<sup>-1</sup>, detergente CHAPS a 4% em massa, azul de bromofenol a 0,0025 % em massa, ditiotreitol a 65 mmol.L<sup>-1</sup> e anfólitos Bio-Lyte 3-10 buffer BioRad 1X). As amostras foram incubadas, sob agitação, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e então centrifugadas, a 16.000 g, durante 30 minutos, a 22 °C. A focalização isoeletrica consistiu nas seguintes etapas: 500 V por 30 minutos, 1.000 V por 30 minutos, 4.000 V por uma hora e 4.000 V até 16.000 V/hora. Após a focalização isoeletrica, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A migração das proteínas foi realizada em um sistema do tipo Mini-Protean II (BioRad, Hercules, CA, EUA), a 50 V, por 30 minutos, e a 100 V até o final da corrida. Os géis foram transferidos para uma membrana de PVDF (Immun-Blot TM PVDF Membrane for Protein Blotting, 0,2 µm, BioRad), em tampão Tris a 25 mmol.L<sup>-1</sup>, glicina 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, metanol 20% v/v, pH 8,5), por 2 h a 100 V. Os géis foram tratados com anticorpos de pacientes com malária, anêmicos e não anêmicos por 12 h, a 4 °C, sob agitação. Após o tratamento com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase, a revelação das membranas foi feita utilizando-se 2 mL de *Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore-Merck, Bilerica, MA, EUA). Procedida a análise de imagens, a digestão tripsínica das bandas proteicas correspondentes às proteínas reconhecidas pelos soros dos pacientes foi conduzida em uma solução contendo ACN (10% v/v) e NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 40 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, durante 17 h a 37 °C. Os peptídeos obtidos foram identificados por sequenciamento de aminoácidos por espectrometria de massa (MALDI-ToF MS/MS, Autoflex, Bilerica, MA, EUA).

## 2.2. Microscopia de desfocalização

Os experimentos de microscopia de desfocalização foram conduzidos em um microscópio invertido modelo Nikon Eclipse TI, contendo um filtro que permitia a passagem de luz com comprimento de onda maior que 610 nm (NA 1.3, Nikon, Tokyo, Japan) e uma câmara ambiental (Chamlide ICCU:109, Live Instrument, Nowangu, Coreia do Sul), mantida a 37 °C. As imagens das hemácias foram capturadas com uma câmera CMOS (CMOS, Silicon Video® 642M, Epix), utilizando-se uma taxa de captura fixada em 300 *frames* por segundo, durante 10 segundos. A distância focal foi controlada pelo equipamento *Nikon Perfect Focus System* (Nikon, Tokyo, Japan). Para o experimento, um volume de 0,5 µL de sangue fresco, retirado de indivíduo não anêmico e que não contraiu malária, foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato a pH 7,4, contendo NaCl a 150 mmol.L<sup>-1</sup>) e albumina de soro bovino 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Esta solução tem um índice de refração de  $1,333 \pm 0,001$  e representa uma solução isotônica. A deposição dos eritrócitos no porta-amostras do microscópio foi conduzida a 37°C por 15 minutos. Então, imagens individuais de eritrócitos (dez células) foram registradas por 10 s. Imunoglobulinas G de plasmas de pacientes com malária, anêmicos e não anêmicos foram enriquecidos por cromatografia de afinidade (HiTrap™ Protein Column, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA). Foi ainda utilizado um anticorpo policlonal anti-hemácia [IgG *Anti human red blood cell (RBC) antibody* ABIN238043; antibodies online.com], cujo imunógeno consiste em hemácias humanas lavadas. Um anticorpo obtido contra um peptídeo sintético derivado da proteína transmembranal banda 3 foi obtido comercialmente. Um anticorpo que se liga a um antígeno de bacteriófago foi utilizado como controle negativo. Os anticorpos foram incubados com a suspensão de eritrócitos durante 30 minutos a 37 °C. A mesma célula foi analisada individualmente no microscópio invertido durante 10 s. A análise de dados foi conduzida com o programa computacional ImageJ *Plugins*, que forneceu os valores de flutuação quadrática média, antes e após a adição dos anticorpos. Medidas de flutuação de altura da membrana plasmática foram conduzidas a partir da equação que descreve a flutuação de contraste de intensidade quadrática média (ROMA *et al.*, 2016).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de imunoproteômica evidenciaram que os plasmas de pacientes com malária, anêmicos ou não anêmicos, reconheceram um número maior de proteínas na membrana do eritrócito quando comparados aos anticorpos de indivíduos controle, sem malária. Determinadas proteínas foram reconhecidas exclusivamente pelos anticorpos dos indivíduos com malária, tais como anquirina, dematina, proteína banda 7 e proteína 4.2. Verificou-se, ainda, que grande parte das bandas detectadas nos grupos com malária corresponderam às proteínas de citoesqueleto espectrina e actina (principalmente a beta), e à proteína transmembranal denominada de banda 3. A banda 3 é uma proteína presente na membrana do eritrócito que atua como catalisador de um transporte do tipo antiporte dos íons cloreto e bicarbonato. A banda 3 possui quatorze hélices que atravessam a membrana e regiões de ligação de anticorpos (REITHMEIER *et al.*, 2016). A evidência de que os anticorpos anti-banda 3 estavam aumentados nos plasmas de pacientes anêmicos, aliada ao fato de que essas imunoglobulinas têm sido associadas à remoção de hemácias senescentes em diferentes estudos (LUTZ *et al.*, 2012), levou-nos a utilizar um anticorpo monoclonal comercial anti-banda 3 nos ensaios de microscopia de desfocalização. Utilizamos, ainda, um anticorpo policlonal comercial anti-hemácia e os soros de pacientes anêmicos e não anêmicos. Diferenças significativas foram ainda observadas quando comparamos as amplitudes médias das flutuações nanométricas (*urms*) das superfícies das hemácias antes e após a adição de anticorpos anti-banda 3 e anti-hemácia (Figura 1). Houve uma redução na *urms* após a adição do anticorpo IgG anti-banda-3 (*urms* antes:  $21,33 \pm 3,75$  versus *urms* depois:  $18,54 \pm 2,27$ ;  $p = 0,0103$ ), o que também ocorreu em relação à adição do anticorpo IgG anti-hemácia (*urms* antes:  $18,80 \pm 2,12$  versus *urms* depois:  $11,39 \pm 4,71$ ;  $p = 0,0078$ ). A adição de anticorpos purificados do plasma de pacientes não anêmicos e de pacientes anêmicos promoveu uma redução da flutuação de 11% (*urms* de  $25,50 \pm 3,35$  para  $22,66 \pm 2,80$  nm;  $p = 0,0331$ ) e de 21% (*urms* de  $24,01 \pm 5,16$  para  $18,95 \pm 7,34$  nm;  $p = 0,0007$ ), respectivamente. Em contrapartida, os anticorpos inespecíficos não causaram mudanças significativas nos parâmetros morfológicos e mecânicos dos eritrócitos.



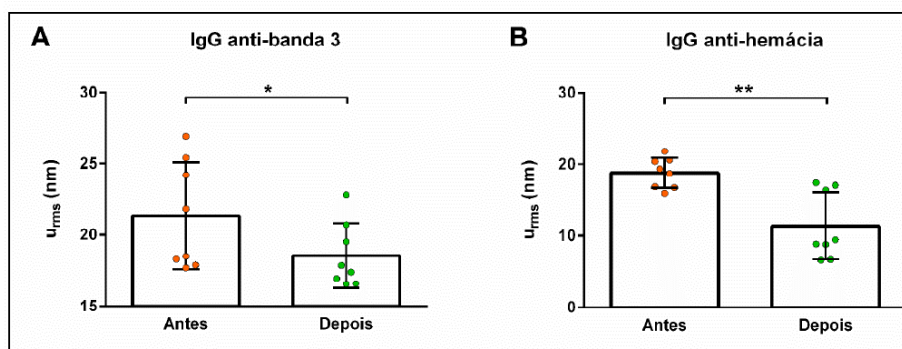


Figura 1. Avaliação dos efeitos dos anticorpos anti-banda 3 e anti-hemácia sobre a amplitude média de flutuações ( $u_{rms}$ ) de membranas de eritrócitos. Os valores representam média e desvio padrão de medidas de oito células.  $p^* = 0,0103$ ,  $p^{**} = 0,0078$

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados de imunoproteômica e de microscopia de desfocalização convergem para sugerir que a proteína banda 3 possa ser um dos alvos de anticorpos nos plasmas de pacientes com malária, sendo que ambas as metodologias sugerem efeitos mais pronunciados em indivíduos anêmicos quando comparados com o grupo de pacientes anêmicos. O efeito dos anticorpos sobre o transporte antiporte de cloreto e bicarbonato no eritrócito está sendo investigado. Os resultados evidenciam que a microscopia de desfocalização é uma ferramenta de diagnóstico de alterações celulares, que pode também ser empregada para a avaliação do efeito de nanoestruturas sobre objetos transparentes como os eritrócitos.

#### AGRADECIMENTOS

Embrapa, Capes, CNPq, FAPEMIG.

#### REFERÊNCIAS

- LIAO, K.H et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 3, n. 7, pp. 2607-2615, 2011.
- LUTZ, H.U. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v.39, n. 5, p.321-327, 2012.
- MOURÃO, L.C. et al. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malaria Journal*, v. 15, article number 397, 2016.
- REITHMEIER, R.A.F. et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, n. 7, pp. 1507-1532, 2016
- ROMA, P.M.S. et al. Profiling of individual human red blood cells under osmotic stress using defocusing microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 21, n. 9, article number 090505, 2016.