

Maria Strecht Monteiro Mata de Almeida

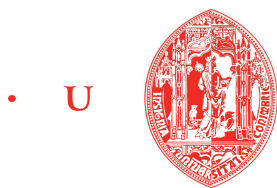
ESTUDOS DO ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO, ESCALAS E OUTRAS MULTIPLICIDADES EM BIOMEDICINA

Tese de doutoramento na área científica de Sociologia, especialidade Sociologia da Cultura, do Conhecimento e da Comunicação, orientada pelo Professor Doutor João Arriscado Nunes e pelo Professor Doutor Alexandre Quintanilha e apresentada à Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



• U • C •

FEUC FACULDADE DE ECONOMIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Strecht Monteiro Mata de Almeida

Estudos do Envelhecimento Eritrocitário, Escalas e Outras Multiplicidades em Biomedicina

Tese de doutoramento na área científica de Sociologia,
especialidade Sociologia da Cultura, do Conhecimento e da
Comunicação, apresentada à Faculdade de Economia da
Universidade de Coimbra.

Orientadores: Professor Doutor João Arriscado Nunes e Professor Doutor Alexandre Quintanilha.

Coimbra, 2012

AGRADECIMENTOS

Esta tese é a expressão de um percurso de investigação acompanhado por uma série de contingências, desvios e afirmações. Nesse caminho, que inclui um “êxodo” disciplinar da biofísica para a sociologia – chame-se-lhe evolução de interesses científicos –, são devidos vários agradecimentos.

Como não poderia deixar de ser, começo por mencionar Alexandre Quintanilha. O primeiro e mais profundo agradecimento é-lhe devido e são várias as razões para isso. Desde logo pelo alerta para os riscos que corria na mudança que entendi fazer, depois pelo respeito por essa minha vontade e, finalmente, pelo apoio para que tomasse forma. Aqui incluída, a sugestão de alguém da área dos estudos sobre a ciência que pudesse orientar o trabalho.

Segue assim um agradecimento especial a João Arriscado Nunes que aceitou fazê-lo. Ficam na memória reuniões em jeito de conversa mais ou menos informal e relativamente às quais não posso deixar de referir o quanto sempre aprendi (e me surpreendi) com as suas ajudas/orientações claras, prontas e extensamente documentadas.

Mas devo fazer uma outra referência especial. Eu tinha “chegado” aos estudos sobre a ciência convencida do interesse que a bibliometria pode trazer neste campo, não conhecendo os seus procedimentos na prática. Por indicação de João Arriscado Nunes, acabei assim por me cruzar com Tiago Santos Pereira, a quem agradeço as dicas sobre como o fazer; esta tese inclui uma análise bibliométrica e desenvolve-se em grande parte a partir dela pelo que a sua terá sido uma daquelas ajudas aparentemente pequenas, mas que, nas suas consequências acabam por ter uma dimensão muito maior.

Por último, um genérico Muito Obrigada a várias outras pessoas que de diferentes formas ajudaram a definir o percurso...

Todas as traduções de excertos que se citam ao longo do texto, a menos que tenha sido usada uma fonte já traduzida (de acordo com a lista final de referências bibliográficas), são da responsabilidade da autora.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Acrónimos	xv
Introdução. Seguir a Construção do Conhecimento Científico para Compreender a Dinâmica da Ciência	1
PARTE I. PARA UMA “HISTÓRIA NATURAL” DO PROJECTO	9
Capítulo 1. Entre Referenciais (Em Jeito de Etnografia)	11
1.1. Um problema no quadro da biofísica	11
1.2. Primeiro momento. Estudo da resposta osmótica de eritrócitos de diferente idade	12
1.3. Segundo momento. Explorando condições de envelhecimento acelerado	26
1.4. E então?	29
Capítulo 2. Explorando Questões de Escala numa Análise de Dinâmica da Ciência	30
2.1. Centralidade das questões de escala na compreensão do vivo	30
2.1.1. Algumas observações sobre tamanho de seres vivos	32
2.1.2. Escalas, tamanho e complexidade	33
2.1.3. Entre o todo e as partes – falando de método	35
2.1.4. Integrando conhecimento/s	38
2.1.5. Explorando questões de escala	
2.2. Instrumentos para a análise	41
2.2.1. Do modelo kuhniano do conhecimento científico à teoria do actor-rede e mais	41
2.2.2. Escalas, “sistemas experimentais” e “plataformas biomédicas” (ou por que importam as questões de escala)	46
PARTE II. ESCALAS NOS ESTUDOS DO ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO	51
Capítulo 3. Para uma Panorâmica dos Estudos do Envelhecimento do Eritrócito	53
3.1. O cenário biológico: eritrócitos e envelhecimento eritrocitário	53
3.2. Diferentes escalas de observação	56
3.2.1. Escalas de comprimento e de tempo	57
3.2.2. Do envelhecimento do eritrócito ao envelhecimento do	

eritrócito em indivíduos idosos ao envelhecimento do indivíduo	58
3.3. Um retrato bibliométrico	59
3.3.1. Crescimento do campo de investigação	61
3.3.2. Explorando redes	67
3.3.3. Sumarizando...	73
3.4. Anotações sobre a evolução da compreensão do envelhecimento eritrocitário	73
3.4.1. Seguindo/abrindo caminhos...	75
3.4.2. Procurando marcadores de envelhecimento	76
3.4.3. Decifrando mecanismos	77
3.4.4. Promovendo debate	77
3.4.5. Um novo desenho emerge?	78
3.5. E então?	88
Capítulo 4. Estudos do Envelhecimento do Eritrócito entre o Laboratório de Investigação e a Clínica	89
4.1. O eritrócito “tem um tempo de vida”	89
4.2. Curvas de sobrevivência de eritrócitos – um papel importante da análise matemática	93
4.3. Transfusão e armazenamento de sangue em banco	96
4.3.1. Envelhecimento, armazenamento e lesão de armazenamento	96
4.3.2. “Idade” do sangue	97
4.3.3. Explorando a ideia de transfusão de células novas	98
4.4. Entre o laboratório de investigação e a clínica	99
Capítulo 5. Estudos do Envelhecimento do Eritrócito no Contexto dos Estudos Biológicos do Envelhecimento	101
5.1. Eritrócitos e o “eritrócito como modelo”	101
5.2. Lugar do eritrócito na história inicial da investigação do envelhecimento celular	102
5.2.1. O que mostram os números...	104
5.2.2. ...e os registos promissórios	104
5.3. Iniciativas colaborativas	106
5.4. O modelo eritrocitário do envelhecimento	108
Capítulo 6. Outros Cenários dos Estudos do Envelhecimento Eritrocitário	111
6.1. Narrativas na formação científica	112
6.2. Narrativas na interface com o público	119
PARTE III. SOBRE O PAPEL DE SISTEMAS EXPERIMENTAIS NA DINÂMICA DA CIÊNCIAS	123
Capítulo 7. Entre sistemas experimentais, controvérsia e mudança	125
7.1. À procura de isolar células de diferentes idades	126
7.2. Entre marcadores de idade e sinais para a remoção de células velhas	132
7.3. Diferentes objectos e controvérsias	133
Capítulo 8. “No Nível de Dez Angström” – Trocando Escalas para uma Visão Completa?	135

8.1. Visualizações	135
8.2. Modos de ver, argumentar e compreender	138
Capítulo 9. Uma Biografia do “Eritrócito em Envelhecimento”	146
Conclusões	151
Referências	157
Anexo. Análise Bibliométrica – Métodos	171

RESUMO

Em última análise, esta tese trata da dinâmica da biomedicina. Fá-lo a partir do caso da investigação realizada em torno do processo de envelhecimento de uma célula do sangue – o eritrócito –, desde os seus primórdios pelo início do século XX até ao presente. Estudado no âmbito de disciplinas científicas diversas e que incluem a hematologia, a bioquímica ou ainda a fisiologia, o problema do envelhecimento eritrocitário foi sendo esclarecido e reconfigurado. Estes trabalhos importam não só em termos do conhecimento a respeito destas células, sua biologia e contextos clínicos relacionados, mas também pela sua utilização como modelo experimental. Pelos anos oitenta, o eritrócito de mamíferos parecia constituir um modelo promissor no estudo do envelhecimento biológico. Muitos dos trabalhos de investigação foram realizados nessa perspectiva, tendo sido organizadas algumas iniciativas colaborativas para explorar esta possibilidade.

O estudo que aqui se apresenta considera em especial o desenvolvimento de abordagens experimentais na investigação relativa a este problema. Ao longo das últimas décadas, as práticas tornaram-se num dos importantes centros de atenção nos estudos sobre a ciência e este trabalho situa-se nessa linha, focando-se nos objectos epistémicos e explorando o papel de sistemas experimentais na dinâmica de produção de conhecimento. A investigação realizada em torno do envelhecimento eritrocitário refere-se, no seu todo, a uma multiplicidade de escalas em relação com a natureza do objecto em estudo. Decorre daí uma diversidade de equipamentos e arranjos experimentais utilizados bem como de áreas disciplinares envolvidas e nas quais se utilizam linguagens diferentes. É assm importante perceber como se articulam e integram conhecimentos. Importa ainda entender apropriações/deslocamentos na produção de conhecimento.

Em grande parte baseado na análise de dados bibliométricos e também de narrativas em textos publicados, o presente estudo considera ainda como etnografia uma breve experiência laboratorial anterior focada no mesmo problema. Procurou fazer-se um mapeamento do campo de estudos, tendo-se analisado com maior detalhe duas circunstâncias particulares – os cruzamentos da investigação laboratorial com o mundo da clínica e o recurso ao eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento. Deste trabalho de análise dos estudos relacionados com o envelhecimento eritrocitário, explorando a sua origem e evolução temporal e

em que esses são dissecados numa variedade de escalas implicadas, alguns aspectos mereceram uma reflexão particular. Primeiro, o estabelecimento de sistemas experimentais (para a separação de células com base na idade e para a identificação de células de diferentes idades), explorando-se essas tentativas do ponto de vista de mudanças no próprio entendimento do fenómeno. Depois, as práticas de visualização, explorando-se nesse contexto a articulação de conhecimentos referentes a diferentes escalas, níveis de organização e de análise. Finalmente, as diferentes vertentes dos estudos do envelhecimento eritrocitário, argumentando-se que correspondem a diferentes modos de existência de um objecto biomédico. É assim proposta uma biografia do “eritrócito em envelhecimento” como um objecto múltiplo, analisado em diferentes modos e escalas.

ABSTRACT

Ultimately, the present thesis is about the dynamics of biomedicine. It draws on the case of research carried out around the aging process of a specific blood cell – the erythrocyte –, since its early times in the beginning of the twentieth century until present time. Studied under different scientific disciplines, including hematology, biochemistry, or physiology, the problem of erythrocyte aging has been elucidated and reconfigured. These studies matter not only in terms of the knowledge acquired regarding these cells, their biology and related clinical contexts, but also by its use as an experimental model. In the 1980s, the mammalian erythrocyte seemed to be a promising model for the study of biological aging. Much research was done from this standpoint. Some collaborative initiatives were organized to explore this possibility.

The study presented herein considers in particular the development of experimental approaches in research regarding this problem. Over the last decades, practices became one of the main concerns of science studies. This work follows this trend, focusing on the epistemic objects and exploring the role of experimental systems in the dynamics of knowledge production. As a whole, the research around erythrocyte aging refers to a multiplicity of scales in relation to the nature of the object under study. A diversity of apparatus and experimental arrangements, as well as disciplinary fields, in which different languages are used, emerged. It is therefore important to understand how to articulate and integrate knowledge. It is also important to understand appropriations/displacements in knowledge production.

Mostly based in the analysis of bibliometric data and also narratives in published texts, the present study also considers as ethnography a brief former laboratorial experience focused on the same problem. A mapping of the research field was attempted. Two particular circumstances were analysed in more detail – the intersections between laboratorial research and the clinical realm, as well as the use of the erythrocyte as a model for aging studies. In this analysis of the studies related to erythrocyte aging, its beginnings and temporal evolution and in which these investigations are dissected in a variety of scales implicated, some aspects deserved special consideration. First, the establishment of experimental systems for the separation of the cells based on their age, and for the identification of cells of different ages, exploring these efforts from the standpoint of shifts in the understanding of the phenomenon. Also, the imaging practices, exploring in this

context the articulation of knowledge referring to different scales, levels of organization and analysis. Finally, the different aspects of erythrocyte aging studies, arguing that these correspond to different modes of existence of a biomedical object. A biography of the “aging erythrocyte” as a multiple object, analysed under different modes and scales, is thus proposed.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Autores mais produtivos na investigação sobre envelhecimento eritrocitário, dados PM e WoS.	64
Tabela 3.2.	Revistas mais produtivas sobre envelhecimento eritrocitário, dados PM e WoS.	65
Tabela 3.3.	Referências mais citadas nos artigos sobre envelhecimento eritrocitário, dados WoS.	66
Tabela 3.4.	Características partilhadas pelos fenómenos de envelhecimento do eritrócito e de apoptose celular de acordo com descrições correntes.	81
Tabela 3.5.	Autores mais produtivos dos documentos referentes ao termo <i>eryptosis</i> , dados WoS.	83
Tabela 3.6.	Revistas mais produtivas relativamente ao termo <i>eryptosis</i> , dados WoS.	85
Tabela 3.7.	Referências mais citadas nos artigos referentes ao termo <i>eryptosis</i> , dados WoS.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Antigo espectrómetro de ressonância paramagnética electrónica da U.Porto.	17
Figura 1.2.	Estrutura química da sonda de spin TEMPONE.	19
Figura 1.3.	Diagrama esquemático das determinações de volume por RPE.	20
Figura 1.4.	Espectros de RPE de TEMPONE em suspensões de eritrócitos humanos.	21
Figura 1.5.	Fracções eritrocitárias em gradiente descontínuo de densidade de arabinogalactano.	23
Figura 1.6.	Imagens do desdobrável dos cursos graduados em biologia organizados no CCE da U.Porto em 1991.	28
Figura 3.1.	Eritrócitos humanos por microscopia electrónica de varrimento.	54
Figura 3.2.	Escalas temporais e espaciais implicadas no estudo do eritrócito e envelhecimento eritrocitário.	58
Figura 3.3.	Evolução temporal do número anual de artigos sobre envelhecimento eritrocitário, dados PM e WoS.	62
Figura 3.4.	Rede de co-autorias na investigação sobre envelhecimento eritrocitário, dados PM e WoS.	68
Figura 3.5.	Mapa de co-citações artigo-artigo, dados WoS.	69
Figura 3.6.	Mapa semântico relativo ao envelhecimento eritrocitário, dados PM.	71
Figura 3.7.	Mapa semântico relativo ao envelhecimento eritrocitário, dados WoS.	72
Figura 3.8.	Evolução temporal do número anual de artigos que incluem o termo eryptosis, dados PM e WoS.	82
Figura 3.9.	Rede de co-autorias relativa aos artigos que incluem o termo eryptosis, dados WoS.	84
Figura 3.10.	Mapa semântico relativo aos artigos que incluem o termo eryptosis, dados WoS.	87
Figura 3.11.	Cronologia dos estudos envelhecimento eritrocitário.	88
Figura 4.1.	Figura 1 de Shemin & Rittenberg (1946) mostrando a evolução temporal da concentração de ^{15}N no sangue.	92
Figura 8.1.	Eritrócitos humanos de diferentes formas por microscopia	137

electrónica de varrimento.

- Figura 8.2. Distribuição de texto e figuras no artigo de Bessis e Boisfleury (1970). 140
- Figura 8.3. Figura 4 de Bratosin *et al.* (1997) evidenciando em microscopia electrónica de varrimento a eritrofagocitose selectiva de células velhas. 144

LISTA DE ACRÓNIMOS

U.Porto	Universidade do Porto
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
RPE	Ressonância Paramagnética Electrónica
ICBAS	Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
NATO	<i>North Atlantic Treaty Organization</i>
ICRO	<i>International Cell Research Organization</i>
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
TEMPONE	N-oxi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona
CCE	Centro de Citologia Experimental
CEMUP	Centro de Metalurgia e Materiais da Universidade do Porto
EMBO	<i>European Molecular Biology Organization</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
IUPS	<i>International Union of Physiological Sciences</i>
ISHPSSB	<i>International Society for the History, Philosophy and Social Studies of Biology</i>
TAR	Teoria do actor-rede
PM	PubMed
WoS	<i>Web of Science</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico

Introdução. Seguir a Construção de Conhecimento Científico para Compreender a Dinâmica da Ciência

O presente trabalho situa-se na área dos estudos sobre a ciência e explora aspectos de dinâmica da produção de conhecimento científico a partir de um caso concreto no quadro das ciências da vida e da biomedicina – a investigação em torno do envelhecimento de uma célula do sangue, o eritrócito. A investigação relacionada com o processo de envelhecimento eritrocitário emergiu na primeira metade do século XX, em relação com o interesse em melhor conhecer a base de determinadas anemias – as anemias hemolíticas –, tendo ficado bem estabelecido por meados do século que o eritrócito humano circulante, na saúde e em condição normal, apresenta um tempo de vida de aproximadamente 120 dias e, ainda, que é removido de circulação por idade. A decifração de mecanismos subjacentes, quer do fenómeno de envelhecimento, quer da identificação e remoção selectiva das células velhas, foi mobilizando investigadores de tradições diversas. Entre a hematologia, a bioquímica ou ainda a fisiologia, o problema foi sendo esclarecido e reconfigurado. Pelos anos oitenta, o eritrócito humano (e mais genericamente o eritrócito de mamíferos) – uma célula enucleada, desprovida de material genético e de maquinaria de síntese proteica – parecia constituir um modelo experimental promissor no estudo do envelhecimento biológico. Muitos dos estudos levados a cabo neste período são feitos neste contexto, tendo sido organizadas por esta altura várias iniciativas colaborativas com vista a explorar essa possibilidade. Outras linhas de investigação são salientes desde os primeiros tempos, como é o caso do estudo da preservação de células armazenadas em banco de sangue para transfusão; neste âmbito, para além do envelhecimento da célula surge relevante um conceito específico e usualmente referido como “lesão de armazenamento”. É importante a referência a este dado pelo que pode indicar da complexidade de vertentes em causa.

Há várias perguntas que se podem colocar desde já sobre o modo como se desenvolveu o campo de estudos. Como se articulam questões fundamentais e questões de âmbito clínico? Como circula o conhecimento produzido? De que forma o desenvolvimento de uma dada linha de pesquisa se reflecte nas restantes? Que circunstâncias determinam, sejam elas internas ou externas, a mobilização para a investigação em torno de um dado tema, ou de um aspecto específico no

âmbito de um tema? Estas são interrogações genéricas, não específicas deste campo de estudos, mas que também aqui se colocam e que também aqui podem encontrar resposta. A investigação que se apresenta organizou-se a partir destes eixos principais: saber como se articulam e se integram conhecimentos, entender deslocamentos.

O trabalho aproveita uma anterior experiência de laboratório focada no fenómeno de envelhecimento eritrocitário: um estudo realizado no quadro das ciências naturais, mais especificamente na área da biofísica e a partir do problema da regulação do volume da célula. A dada altura, os meus interesses de investigação evoluíram num outro sentido, o do estudo da dinâmica da construção de conhecimento científico. Agora, o caso dos trabalhos à volta do problema envelhecimento eritrocitário parecia constituir um ponto de partida importante e rico para explorar diversos aspectos sociológicos da prática científica na área das ciências da vida e da biomedicina, proporcionando várias possibilidades de entrada para uma melhor compreensão da sua dinâmica. Interessou-me particularmente seguir o apelo a diferentes escalas que acompanha os estudos do fenómeno de envelhecimento biológico. A co-existência de diferentes níveis de organização é um dado bem conhecido dos sistemas vivos e incontornável no seu estudo. Uma breve incursão pela literatura publicada da investigação relacionada com o problema do envelhecimento eritrocitário permite facilmente perceber a multiplicidade de escalas a que no seu todo se refere. Essa multiplicidade decorre da natureza do objecto de estudo, acarreta uma diversidade de equipamentos e arranjos experimentais, implicando uma variedade de áreas disciplinares e de investigadores que utilizam linguagens diferentes; em última análise, será expectável que tenha expressão no conhecimento construído.

Vejamos então algumas questões mais específicas que se podem levantar, considerando esta multiplicidade de escalas. Saber como é integrada a informação desde o nível molecular até ao do organismo, saber como surge a rede de relações de indivíduos e grupos, assim como de práticas, são aspectos que merecem atenção e se podem enunciar pelas interrogações seguintes:

- de que forma se enquadram os estudos do envelhecimento celular no contexto mais alargado dos estudos do envelhecimento?
- quais as escalas (e as mudanças de escala) que o estudo implica?
- como evoluem conteúdos e actores?

As questões anteriores são perguntas fundamentais relativas ao campo de investigação em análise; claro está que na sua base existe o interesse em melhor conhecer a dinâmica das ciências da vida e da biomedicina e saber o que o caso poderá revelar a esse respeito. A ideia subjacente é pois não só caracterizar a área de estudo que se desenvolveu em torno do fenómeno de envelhecimento eritrocitário como também, tentativamente e a um nível mais alargado, extrapolar acerca dessa dinâmica.

A investigação que desenvolvi aproveita então uma experiência laboratorial breve (e já longínqua) focada no envelhecimento eritrocitário. O interesse pela área dos estudos sobre a ciência surgiu no âmbito dessa fase inicial de trabalho experimental. A certa altura esse trabalho cruzou-se com uma tarefa (pessoal) de cuidador em situação prolongada de doença e essa circunstância facilitou outros modos de ver. Assim, a percepção de que a investigação de laboratório é essencial mas não basta fazê-la (ou que haja quem a ela se dedique), importa também estudar o que é feito, olhá-lo “de fora”, perceber o seu contexto, o seu curso e o modo com progride o conhecimento produzido, notar a multiplicidade de abordagens que um problema suscita. Um pouco porque tinha algum conhecimento sobre esse campo de investigação, mas sobretudo, e como referi atrás, porque o caso da investigação relacionada com o envelhecimento eritrocitário me parecia rico na perspectiva de uma contribuição em estudos sobre a ciência entendi considerá-lo. Procurei então interpretar (ou transformar) essa experiência anterior em trabalho etnográfico. Como ficará claro ao longo do texto, trata-se de uma parcela restrita e situada do estudo. Na verdade, o resultado dessa tentativa será mais um trabalho auto-etnográfico e retrospectivo. Sair do campo e estudá-lo, deixar o papel de actor para (sobre registos e memórias) tentar o papel de observador foi o desafio dessa tarefa. De facto, um desafio que acabou por ser maior do que antecipei. Alguma inquietude com estas circunstâncias – uma mudança de interesses de investigação marcada por contingências em que o envolvimento pessoal não pode ser ignorado e sobretudo esta dualidade de observador e actor observado presentes em parte do estudo (por muito restrita que seja e mesmo que o foco não seja o indivíduo mas a sua experiência) – constituiu uma preocupação bem presente. Uma conversa mais ou menos informal veio a dada altura esclarecer e tranquilizar a respeito. A sociologia não é mais do que a transformação de problemas pessoais em questões públicas dizem-me

naturalmente, referindo a enunciação de Charles Wright Mills (1959). Como é bem sabido entre sociólogos, a ideia defendida por Mills é a de que a “imaginação sociológica” é uma forma de pensamento singular que procura a articulação da biografia do indivíduo com a história e a sociedade em que vive. Nas suas palavras, a ciência social “trata de problemas de biografia, de história e de suas intersecções no seio das estruturas sociais” (ibidem: 143). A referência à “imaginação sociológica” permitiu-me uma leitura mais objectiva do êxodo disciplinar. Na tentativa de uma leitura etnográfica desse trabalho laboratorial anterior é claro que haverá sempre alguma parcialidade de análise. Vários investigadores têm recorrido a trabalho que assenta na própria experiência e referem esse aspecto. Em *“Under the Medical Gaze: Facts and Fictions of Chronic Pain”* (Greenhalgh, 2001), por exemplo, a auto-etnografia é a escolha da autora, antropóloga, que a defende como meio especialmente produtivo para o seu projecto sobre (ou a partir de) um “encontro médico”. Como salienta a investigadora, neste tipo de trabalho, que quebra barreiras entre observador e observado, o foco é a experiência. De resto, Greenhalgh afirma que “o auto-etnógrafo não proclama produzir conhecimento objectivo” (ibidem: 54), antes um conhecimento situado, de uma parcialidade inevitável e assumida. Será também assim essa pequena narrativa que faço dos estudos do envelhecimento eritrocitário que se iniciavam na Universidade do Porto e em que participei, uma narrativa assente numa experiência nesse grupo e que assim, procurando ser objectiva, não se reclama desinteressada.

O trabalho que aqui se apresenta é então um estudo de caso que procura uma análise da dinâmica da ciência na área das ciências da vida e biomedicina a partir da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário. Vale a pena explorar um pouco mais de que modo, este caso surgia interessante, ou de que forma parecia poder proporcionar evidência vantajosa.

Em primeiro lugar, porque estes estudos têm uma relevância alargada que não se confina à investigação de uma particularidade biológica. O problema do envelhecimento eritrocitário é em si indiscutivelmente importante e interessante no contexto das ciências da vida, mas para além disso, como referido no início, há desde a sua origem o cruzamento de uma questão biológica com uma variedade de situações clínicas. A sua importância está de resto bem patente em tentativas de identificação como “biomarcadores de risco”, relativamente a várias condições, de diferentes parâmetros que nestas células sofrem alteração pelo processo de

envelhecimento, conforme trabalhos levados a cabo em estudos mais recentes. Igualmente ilustrativo será o caso da tentativa de implementação da transfusão de eritrócitos novos como rotina em determinadas abordagens terapêuticas, conforme estudos levados a cabo pelos anos oitenta. O mesmo sucede ainda com o interesse e a necessidade em conhecer quais as alterações que ocorrem em células armazenadas em banco de sangue para transfusão, já mencionados no início, bem como perceber o significado de tais alterações; neste caso, porque aquilo que ocorre no indivíduo pós-transfusão parece ter relação com o tempo de armazenamento das células e invoca questões de regulação. A multiplicação de questões que se desenvolvem a partir do fenómeno de envelhecimento eritrocitário proporciona terreno para explorar diferentes aspectos da dinâmica de produção de conhecimento científico, no laboratório de investigação e para além dele.

Depois, porque os estudos em eritrócitos importam, não só pelo conhecimento estrutural e funcional a respeito destas células, na sua biologia e nos contextos clínicos relacionados, como também porque em muitos casos são feitos na perspectiva da sua utilidade como modelo experimental de estudo. A situação é frequente em estudos da membrana, sendo a membrana eritrocitária normalmente apresentada como modelo prático de membrana plasmática em células animais; mas interessa aqui especificamente o caso da investigação relacionada com o envelhecimento eritrocitário. Como já adiantado anteriormente, muitos estudos levados a cabo no eritrócito surgem assim enquadrados – o eritrócito de mamíferos seria um modelo privilegiado em estudos do envelhecimento. Em muitos destes trabalhos, os autores defendem a escolha do modelo pela sua simplicidade e, assim, melhor compreensão de um fenómeno que a níveis de organização superiores seria mais difícil. O interesse da escolha para trabalho laboratorial do eritrócito de mamíferos (e particularmente do eritrócito humano) será claro: para além da relativa simplicidade estrutural destas células, a acessibilidade do material biológico, assim como, no caso dos estudos do envelhecimento, a “facilidade” de separação destas células por idades, terão vindo a ser determinantes do recurso aos eritrócitos como células modelo. Extensamente utilizado como modelo experimental nas ciências da vida e biomedicina, o eritrócito de mamíferos como modelo não tem sido, no entanto e apesar de uma atenção crescente ao estudo de modelos experimentais, muito explorado dos pontos de vista de história, filosofia ou estudos sociais da ciência.

A investigação aqui apresentada preocupou-se com estas várias vertentes dos estudos do envelhecimento eritrocitário. Da análise resulta que estas correspondem a diferentes modos de existência de um objecto biomédico, o “eritrócito em envelhecimento”. A questão de perceber como se articulam estes conhecimentos acabou por ser um dos interesses da pesquisa.

No plano teórico e conceptual, são várias as inspirações que precisam ser mencionadas. A investigação tem a sua ênfase nos objectos epistémicos, sendo que a necessidade de ligar a dinâmica da ciência às práticas de laboratório, na linha da chamada viragem prática dos estudos sobre a ciência, alicerça toda a análise. Este aspecto encontra suporte no trabalho de Hans-Jörg Rheinberger (1997) sobre o papel de sistemas experimentais na tomada de forma do conhecimento, na definição de disciplinas científicas ou na alteração de fronteiras disciplinares. Rheinberger descreve os sistemas experimentais como arranjos que incluem todas as condições necessárias para um processo de pesquisa na sua globalidade, representando assim as realizações sociais mais básicas da actividade científica. Para uma descrição da dinâmica da biomedicina, Peter Keating e Alberto Cambrosio, por sua vez, propõem a noção de “plataforma biomédica” (2003) que definem como uma configuração específica de instrumentos, actores humanos, materiais e programas, assente na produção e estabilização de novos objectos e procedimentos no seio de um dado sistema experimental e com ênfase em aspectos de regulação. Notando na sua análise que os sistemas experimentais, na acepção de Rheinberger, não cobrem toda a gama de práticas em biomedicina, Keating e Cambrosio observam que a estabilização de sistemas experimentais no campo das ciências da vida permite a sua apropriação em contextos para além do dos laboratórios de investigação e, nesse sentido, para estes investigadores, os sistemas experimentais precedem as plataformas biomédicas. A relação entre sistemas experimentais e plataformas biomédicas ocupa um lugar importante na investigação sociológica sobre a dinâmica da produção de novos conhecimentos e novos objectos nas ciências da vida e da sua apropriação em contextos biomédicos. Interessou-me explorar esta ideia em relação com a natureza multi-escalar dos seres vivos e o que essa implica no seu estudo e no seu conhecimento. A tomada de atenção às questões de escala no âmbito da investigação das práticas biomédicas é de resto uma orientação para a qual recentemente, Kontopodis e

colaboradores (2011) chamam a atenção, no editorial de um número especial da *Science, Technology, & Human Values*, nesse tópico.

A investigação realizada assenta na ideia da importância de olhar as práticas de laboratório, indo ainda buscar inspiração ao quadro da Teoria do actor-rede (cf. Law & Hassard, 1999), principalmente no reconhecimento da importância dos textos. “O texto é a arma secreta da ciência” (Law, 1986: 67) e, assim, centrar análise nesses textos será útil para melhor perceber a dinâmica da produção de conhecimento científico. A importância da bibliometria como instrumento de análise radica aqui. Grande parte da análise que apresento sobre o campo dos estudos do envelhecimento eritrocitário apoia-se num estudo bibliométrico global desse campo focado em aspectos de produtividade e de relações.

A tese está estruturada em três partes. A Parte I – *Para Uma “História Natural” do Projecto* – é ponto de partida e apontamento de cariz metodológico da investigação realizada, apresentando o projecto tal como este se iniciou e evoluiu. Assim, o Capítulo 1 – *Entre Referenciais (Em Jeito de Etnografia)* – descreve uma passagem pelo laboratório em projectos envolvendo o problema do envelhecimento eritrocitário, procurando uma reinterpretação dessa experiência do ponto de vista dos estudos sobre a ciência. O Capítulo 2 – *Explorando Questões de Escala numa Análise de Dinâmica da Ciência* – apresenta um contexto teórico da investigação e introduz métodos e ferramentas de estudo.

A Parte II – *Escalas nos Estudos do Envelhecimento do Eritrócito* – é essencialmente uma análise crítica do conjunto dos estudos do envelhecimento eritrocitário, sua origem e evolução temporal. O Capítulo 3 – *Para uma Panorâmica dos Estudos do Envelhecimento do Eritrócito* – apresenta uma descrição da área na qual se explora o modo como o problema se desenvolveu na sequência da evidência de que a remoção destas células de circulação se faz por idade, bem como as linhas de investigação que foram sendo seguidas no seu estudo até ao presente; nesse propósito, a análise de textos publicados e o estudo bibliométrico do campo complementam-se. O Capítulo 4 – *Estudos do Envelhecimento do Eritrócito entre o Laboratório de Investigação e a Clínica* – trata especificamente do estudo do envelhecimento eritrocitário em contextos clínicos, desde a consolidação do problema no contexto do interesse em melhor compreender a base de anemias hemolíticas (e algumas práticas terapêuticas relacionadas) à preservação de células armazenadas em banco de sangue. O Capítulo 5 – *Estudos do*

Envelhecimento do Eritrócito no Contexto dos Estudos Biológicos do Envelhecimento – foca-se num modo de existência particular do “eritrócito em envelhecimento”, o eritrócito como modelo experimental em estudos do envelhecimento e procura enquadrá-lo no contexto alargado da biogerontologia. O Capítulo 6 – *Estudos do Envelhecimento Eritrocitário – Explorando Outros Cenários* – é uma breve fuga do laboratório para outros cenários onde a produção de conhecimento científico tem também presença. Primeiro, tratando do modo como o tópico do envelhecimento eritrocitário surge em diferentes contextos disciplinares da formação de nível pré-graduado e, nomeadamente, nos textos aí usados; depois, explorando alguns casos relativos à comunicação com públicos não especializados. Em última análise, a Parte II apresenta um retrato dos estudos do envelhecimento eritrocitário dissecados numa variedade de escalas implicadas.

A Parte III – *Sobre o Papel dos Sistemas Experimentais na Dinâmica da Ciência* – constitui o principal corpo argumentativo da tese, procurando em textos breves reflectir e debater o lugar de sistemas experimentais na dinâmica da ciência. Os diferentes capítulos nesta terceira parte do texto são baseados em aspectos que ressaltaram da análise que a precede. O Capítulo 7 – *Entre Sistemas Experimentais, Controvérsia e Mudança* – parte do desenvolvimento de diferentes processos de fraccionamento de eritrócitos por idade, ou de identificação de células de diferente idade, e controvérsia associada, discutindo esses aspectos do ponto de vista de mudanças no entendimento do próprio envelhecimento eritrocitário. O Capítulo 8 – *“No Nível de Dez Angström” – Trocando Escalas para uma Visão Completa?* – toma o caso de práticas de visualização nos estudos do envelhecimento do eritrócito e explora a partir dele a articulação e integração de conhecimentos que se referem a diferentes níveis de organização e de análise. O Capítulo 9 – *Uma Biografia do “Eritrócito em Envelhecimento”* – apresenta e discute o “eritrócito em envelhecimento” como um objecto biomédico múltiplo, emergindo dos diferentes modos de existência e escalas em que se ensaia.

Por último, apresenta-se uma tentativa de conclusões (apontando perspectivas futuras), relativamente ao caso dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário e a partir dele.

PARTE I
PARA UMA “HISTÓRIA NATURAL” DO PROJECTO

Capítulo 1. Entre Referenciais (Em Jeito de Etnografia)

Toda a experimentação é implementada tecnicamente. [...] As coisas epistémicas que fundam as ciências experimentais emergem do depósito do técnico e do seu potencial para compor. Donde se segue que uma e outra vez se prestam a tornar-se reincorporadas nesse depósito.

– Rheinberger, 1997: 141

Entremos no laboratório. Será importante fazê-lo se queremos perceber na sua essência a dinâmica da ciência e o modo como evolui o conhecimento científico. O que se segue foca-se nas práticas, na forma como vão sendo feitas opções ou mobilizados recursos técnicos, observando nesse sentido a contribuição de um grupo de investigação da Universidade do Porto (U.Porto) nos estudos do envelhecimento eritrocitário. É uma narrativa a partir de uma curta experiência nesse grupo como membro e, assim, entre referenciais.

1.1. Um problema no quadro da biofísica

Seja este o ponto de partida: em meados dos anos oitenta, alguém, estudante do curso de Mestrado em Química Teórica da responsabilidade da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), tinha levado a cabo uma investigação sobre a aplicação ao estudo do eritrócito da espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (Matos, 1984) – ou espectroscopia de RPE¹ como passarei a referir de modo mais abreviado –, os resultados que tinham sido obtidos nesse âmbito com a população eritrocitária total eram interessantes e havia curiosidade em saber o que se passava no caso de células de diferentes idades. A questão desta heterogeneidade da população eritrocitária era na altura um tema de certa forma novo e mobilizador – tinham surgido renovadas possibilidades de abordagem experimental ao problema do envelhecimento destas células em concreto, eram múltiplas as iniciativas em torno do seu estudo. O trabalho que me

¹ A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica, RPE – *electron paramagnetic resonance, EPR* –, é também frequentemente referida como espectroscopia de ressonância de spin electrónico, RSE – *electron spin resonance, ESR*; sendo as duas designações correntes, ao longo deste texto é usada a primeira.

foi proposto pelo final dos anos oitenta no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), unidade orgânica da U.Porto, e assim realizei na área da biofísica – estudar a resposta osmótica de eritrócitos de diferente idade com recurso à espectroscopia de RPE – evoluiu, pelo início dos anos noventa, para um projecto que não desenvolvi em extensão, apenas iniciei, que pretendia explorar o eritrócito sob condição de stress e, particularmente, algumas alterações associadas ao envelhecimento eritrocitário em condições reconhecidas como sendo de envelhecimento acelerado. Estes dois momentos de trabalho experimental serão aqui explorados como estudo de laboratório. Vejamos então com maior detalhe cada um desses momentos.

1.2. Primeiro momento. Estudo da resposta osmótica de eritrócitos de diferente idade

Antes de analisar o desenvolvimento do projecto e o seu foco, um breve apontamento para esclarecimento de terminologia. É bem conhecido² que o volume de uma célula é alterado quando se modifica a tonicidade do meio onde essa se encontra, uma propriedade determinada pelos solutos (ou osmólitos) aí presentes. Assim descreve-se normalmente a célula como sendo um osmómetro – um sistema que responde a alterações na tonicidade do meio.

O projecto aqui referido foi assente na observação de que a resposta do volume do eritrócito à alteração da tonicidade do meio não é descrita pelo modelo do osmómetro perfeito, ou, por outras palavras, que o comportamento osmótico do eritrócito não é ideal. Na literatura especializada estavam em discussão diferentes modelos empíricos que procuravam explicar a não idealidade da resposta osmótica. Nesse contexto e procurando contribuir para a discussão em curso, na dissertação de mestrado atrás citada, Maria Agostinha Matos, ao concluir, escreve:

Os resultados deste trabalho confirmam a não idealidade do comportamento osmótico do eritrócito, mas na zona altamente hipertónica o desvio à idealidade faz-se no sentido contrário ao previsto pelos investidores citados: o eritrócito perde mais água do que seria considerado normal (note-se que não ocorre hemólise). [...] Será que as interacções entre a hemoglobina e a espectrina conducentes a alterações da elasticidade membranal estão por detrás desta alteração de comportamento? (Matos, 1984: 67)

² A afirmação de ser um dado bem conhecido refere-se tanto ao facto de constituir conhecimento bem estabelecido em biologia como também, no caso particular do eritrócito, à sua ampla divulgação no ensino ao nível da educação secundária. Este último aspecto deve de resto ser sublinhado – o caso do eritrócito é um exemplo ilustrativo do fenómeno da resposta osmótica das células comumente utilizado e assim largamente conhecido.

Surge naturalmente o interesse em melhor esclarecer a questão da não idealidade da resposta osmótica do eritrócito, em particular os resultados que pareciam ser dados novos na discussão em curso – a resposta das células na gama de tonicidades elevadas. Em circulação, e concretamente na passagem pelo rim, o eritrócito é normalmente submetido a esse tipo de condição o que reforça o interesse em melhor compreender esta resposta. Mas um elemento essencial para se entender a orientação no sentido do estudo da influência da idade das células na sua resposta osmótica é o facto, à data bem assente, de que o volume do eritrócito diminui com a idade da célula (cf. Clark, 1988b) e que pode indiciar diferenças entre células novas e velhas na regulação do volume celular. Na passagem acima citada, a pergunta final pode ler-se no mesmo sentido, isto é, apontando também um interesse em averiguar uma possível influência da idade das células no comportamento observado. Com efeito, vários estudos (cf. Snyder *et al.*, 1983) tinham conduzido a evidência experimental da ocorrência de alterações com o envelhecimento das células nas proteínas eritrocitárias hemoglobina e espectrina aí referidas, bem como na interacção entre essas mesmas proteínas.

Espectroscopia de RPE e o estudo da resposta osmótica do eritrócito

Os resultados que pareciam representar dados novos tinham sido obtidos com recurso à espectroscopia de RPE. Uma questão que interessa colocar desde logo é a de saber por que poderia este tipo de abordagem constituir um contributo importante no âmbito do problema da não idealidade da resposta osmótica do eritrócito. Como se sublinhava então (cf. Mehlhorn *et al.*, 1982), quando comparada com outros métodos de determinação do volume celular, este tipo de metodologia trazia a vantagem de produzir resultados que são independentes de outras características da célula como, por exemplo, a sua forma, a qual sofre alteração quando se modifica o volume. A possibilidade de obtenção de um resultado independente da forma da célula justifica por si só o interesse na sua aplicação ao problema da resposta osmótica. Para além disso, o facto de que aquilo que se avalia com recurso a este método é o volume aquoso interno constitui ainda um aspecto preferencial no que concerne aos estudos sobre osmorregulação (ibidem). Para fechar este apontamento sobre o interesse no recurso a este tipo de metodologia pode acrescentar-se ainda que estas são vantagens importantes mas não as únicas. Ou seja, o recurso à espectroscopia de RPE – que, pelo início dos anos oitenta, tinha passado a ser possível também na U.Porto – proporcionava uma

nova oportunidade para explorar um problema já antigo mas ainda em aberto, um problema relativamente ao qual era importante averiguar uma possível influência do fenómeno de envelhecimento da célula.

A aplicabilidade da espectroscopia de RPE ao estudo da regulação do volume celular não é contudo imediata ou directa. Os métodos espectroscópicos baseiam-se na medição da absorção de radiação electromagnética por um sistema quando ocorrem transições entre níveis de energia. O caso particular da espectroscopia de ressonância magnética, seja ela nuclear ou electrónica, requer a presença de um campo magnético. Nesta circunstância, uma dada população de átomos (ou moléculas) com momento angular de spin não nulo, um parâmetro que é quantificado, separa-se em subpopulações de diferente energia, consoante a orientação do spin se fez paralela ou antiparalelamente à direcção do campo magnético; desse modo, quando se faz incidir radiação electromagnética e se a energia associada a essa radiação igualar a diferença necessária à reorientação de spin, isto é, a diferença de nível energético a que se encontram essas duas subpopulações, irá ocorrer absorção de energia – diz-se que se verifica a condição de ressonância. Este fenómeno representa a possibilidade prática de observar e estudar espécies possuidoras de spin não nulo. Mas, permitindo genericamente a detecção e quantificação de espécies paramagnéticas, isto é, espécies caracterizadas por um spin electrónico não nulo, a espectroscopia de RPE nem sempre tem uma aplicação directa no estudo de sistemas biológicos. Na verdade, acontece que grande parte destes sistemas não são intrinsecamente paramagnéticos e assim o recurso a este método implica a sua prévia marcação com moléculas de um composto possuidor de sinal de RPE, normalmente designado por sonda de spin ou marcador de spin³ (Smith *et al.*, 1976). O registo do sinal de RPE – o espectro – pode ser usado para o estudo da espécie que lhe dá origem e, para além disso, permite inferir propriedades do meio. Este último dado é essencial no caso das determinações de volume.

Vejamos em concreto no caso do trabalho experimental aqui observado. A determinação de volumes com recurso à espectroscopia de RPE faz-se usando a técnica de marcação de spin⁴ pelo que o resultado será uma medida mediada pelas moléculas introduzidas no sistema. Este tipo de procedimento com recurso a sondas de spin tinha vindo a ser extensamente utilizado por Rolf J. Mehlhorn e

³ Das expressões *spin probe* e *spin label*.

⁴ De *spin labeling*.

colaboradores, na Universidade da Califórnia em Berkeley, em pesquisas sobre osmorregulação, em vários sistemas incluindo bactérias e células de plantas (Quintanilha & Mehlhorn, 1978; Mehlhorn *et al.*, 1982; Blumwald *et al.*, 1983; Lomax & Mehlhorn, 1985), e contava com algumas aplicações ao estudo do eritrócito, e especificamente ao estudo do envelhecimento desta célula, em trabalhos do grupo de Grzegorz Bartosz⁵, da Universidade de Łódz, como ilustra o caso do estudo sobre microviscosidade intracelular em função da idade do eritrócito (Bartosz & Leyko, 1980). De facto, como se referiu já, aquilo que é medido através deste método é o volume aquoso interno. São ainda dados interessantes não só o facto de que, sem necessidade de mais procedimentos se obtém informação a respeito da microviscosidade do meio aquoso interno como também, o de que pelo mesmo tipo de procedimento e dependendo da sonda utilizada (cf. Mehlhorn *et al.*, 1982), se poderá ainda obter informação a respeito da diferença de potencial eléctrico através da membrana ou ainda do gradiente de pH através da mesma, dois parâmetros envolvidos na osmorregulação em geral. Adiante, analisaremos detalhes práticos do procedimento de determinação do volume aquoso interno e microviscosidade intracelular. De momento, será talvez interessante olhar o contexto em que estes trabalhos se desenvolviam na U.Porto.

Interesse na espectroscopia de RPE na U.Porto

Um espectrómetro de RPE não é equipamento geral, normalmente disponível em laboratório, mas “grande equipamento” e assim extremamente oneroso. Do ponto de vista da análise aqui em curso, que pretende perceber aspectos de dinâmica da ciência, o contexto em que estes trabalhos experimentais ocorriam será relevante pelo que importa apresentar alguns dados a respeito da existência deste recurso na U.Porto. O espectrómetro de RPE utilizado – um Varian E109 – era uma aquisição recente e tinha sido instalado no Departamento de Química da FCUP, no seu antigo edifício. No artigo intitulado “Um Panorama da Acção do Serviço de Ciência da Fundação Calouste Gulbenkian”, o primeiro Director do Serviço de Ciência da fundação, José Ribeiro dos Santos, fala dessa aquisição e, porque parece um depoimento que denota bem uma época, valerá a pena citar em extensão:

⁵ Grzegorz Bartosz é Professor de Biofísica, tendo um trabalho de investigação extenso sobre questões do envelhecimento celular, particularmente sobre o papel do stress oxidativo, e ocupa uma posição destacada no campo dos estudos do envelhecimento eritrocitário, como patente na análise bibliométrica que se apresenta mais adiante (veja-se o Capítulo 3).

A evolução do pensamento científico, porém, não cessa nem se compadece com simples abstracções. Há toda uma sofisticada tecnologia em constante renovação, cujos custos sobem em espiral. Que fazer? Abandonar e aceitar-se o atraso por vezes irremediável? Quem assume a responsabilidade de recusar? Tal situação é tão patente que, nalguns casos, se recorre ao regime de associação internacional para a constituição de fundos destinados a pôr de pé grandes empreendimentos. Que admira, pois, que num país de modestos recursos se ensaie o mesmo esquema ao nível das instituições existentes? (Santos, 1988: 71)

O autor prossegue descrevendo dois casos ilustrativos dessa estratégia de financiamento partilhado. Um desses refere-se precisamente ao espectrómetro de RPE da U.Porto de que tenho vindo a falar. Continuando com as suas palavras:

O outro caso [...] ocorre com um grupo do Porto. Trata-se do pedido de equipamento de ressonância paramagnética electrónica a instalar no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, o qual servirá grupos da Universidade do Porto e se destinará principalmente a um curso de cinco anos a reger pelo Prof. Doutor Alexandre Quintanilha, da prestigiosa Universidade de Berkeley. Também nesse caso se entendeu apropriado negociar um “pool” de participações financeiras, no qual a dotação provinda do Ministério da Educação foi fixada em 50% do encargo geral.

O restante foi distribuído como encargos da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, da própria Universidade do Porto e, por fim, da Fundação, que cobriu significativamente o défice da operação. (ibidem)

Há pelo menos dois aspectos que se devem destacar das citações anteriores: por um lado, a percepção da importância de dispor de grande equipamento para a prossecução do trabalho científico, por outro, a necessidade de um financiamento repartido dado o elevado montante envolvido.

O primeiro espectrómetro de RPE foi adquirido neste quadro de financiamento. Hoje, este equipamento não está já em uso, foi substituído há vários anos, tendo passado a peça de depósito/exposição. Assim, encontra-se num átrio da cave do edifício do (agora) Departamento de Química e Bioquímica, no novo complexo da FCUP. A figura 1.1 mostra o aparelho nesta sua localização/uso actual.



Figura 1.1. Antigo espectrómetro de ressonância paramagnética electrónica da U.Porto na sua localização presente, em exposição em átrio da cave do actual Departamento de Química e Bioquímica da FCUP. [Imagem recolhida em Abril de 2012, com autorização do responsável do departamento.]

Mas há ainda outros dados que são relevantes para melhor caracterizar e compreender o enquadramento desta aquisição. A história da compra deste espectrómetro cruza-se com a da criação de dois cursos na U.Porto – o já mencionado curso de Mestrado em Química Teórica e ainda o curso de Licenciatura em Bioquímica, este da responsabilidade conjunta de duas unidades orgânicas, a FCUP e o ICBAS. Com efeito, na proposta de criação deste último curso, de 1981, a então recente aquisição do equipamento de RPE é mencionada no sentido em que, em conjunto com a criação desse Mestrado em Química Teórica, proporcionaria oportunidade para a formação de futuros docentes para leccionação na licenciatura.

No âmbito do projecto que desenvolvi, e como mencionei já, interessava particularmente a técnica de marcação de spin. A espectroscopia de RPE permite estudar também espécies paramagnéticas que ocorrem naturalmente nos sistemas biológicos como é o caso, entre outros, dos radicais livres. As “espécies reactivas de oxigénio” são radicais livres e a descoberta da sua implicação numa variedade de processos biológicos, incluindo o do envelhecimento, fazia desse tema um tópico de investigação central. Um dum grandes temas de pesquisa no qual

diferentes investigadores na U.Porto tinham interesse e que podia beneficiar da disponibilidade do equipamento de RPE era precisamente este. Importa assim notar a organização local de um curso internacional avançado sobre o tema (um *Advanced Series Institute* da NATO), com ênfase nos desenvolvimentos e também novos métodos de estudo. “*Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine: Recent Progress and New Methods of Study*”, decorrido em Setembro de 1985 em Braga, reuniu em Portugal uma série de investigadores destacados. No prefácio das actas do curso (Quintanilha, 1988), para além da referência à ideia de que os autores das comunicações procuram transmitir na publicação um quadro claro daquilo que é conhecido ou permanece obscuro no seu campo, é mencionado ainda que são descritas algumas das técnicas usadas para detectar espécies activadas de oxigénio, assim como seus pontos fortes e limitações. A espectroscopia de RPE é uma das técnicas aí tratadas. Destaco este curso pela sua ênfase metodológica. Outros cursos avançados internacionais na temática dos radicais livres de oxigénio e sua toxicidade, organizados localmente e decorridos pelo final dos anos oitenta e início dos anos noventa, designadamente no âmbito ICRO-UNESCO⁶, são expressão do interesse que existia no desenvolvimento da investigação relacionada.

Procurando concluir, a espectroscopia de RPE e concretamente o novo equipamento disponível afigurava-se como um importante foco para o desenvolvimento de investigação na U.Porto. Na verdade, deve notar-se que se trata da investigação numa área híbrida englobando a química, nomeadamente a química teórica e a bioinorgânica, as ciências da vida e a biomedicina, e diferentes unidades orgânicas desta universidade.

Medições de volume aquoso e microviscosidade por marcação de spin

Voltemos às determinações de volume aquoso interno. Como anteriormente referido, estas determinações com recurso à espectroscopia de RPE implicam a marcação das amostras com uma sonda de spin. Trata-se normalmente de um nitróxido. Os nitróxidos são moléculas paramagnéticas e possuem algumas outras características que os tornam espécies privilegiadas relativamente à utilização como sondas de spin. A estrutura molecular da sonda de spin usada nas

⁶ A ICRO, *International Cell Research Organization*, em colaboração com a UNESCO, promovia desde 1961 a organização de cursos de formação avançada em biologia celular e molecular. Informação adicional pode ser encontrada em portal.unesco.org (conforme acesso em Maio de 2012).

experiências aqui referidas – N-oxi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMPONE) – encontra-se representada na figura 1.2.

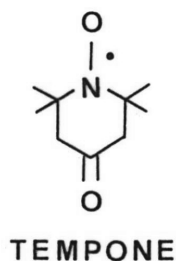


Figura 1.2. Estrutura química da sonda de spin TEMPONE (N-oxi-2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidona). [Adaptada de Almeida (1990).]

Esse nitróxido entra fácil e rapidamente nas células e sendo inerte relativamente a gradientes eléctricos ou iónicos que existam distribuir-se-á uniformemente nos dois compartimentos aquosos de uma suspensão celular. Permite assim avaliar o volume aquoso interno de células numa suspensão, num procedimento que depende ainda da possibilidade de se distinguir o sinal intracelular da sonda de spin numa suspensão de células marcada. Esta determinação de volume aquoso interno requer a comparação de dois espectros da sonda na suspensão, o intracelular e o total. Para se poder observar o sinal intracelular aquilo que se faz é “apagar” o sinal extracelular, revelando-se nessa condição o sinal das moléculas da sonda localizadas no interior da célula. O apagamento do sinal extracelular é facilmente conseguido introduzindo no meio de suspensão das células um composto com propriedades paramagnéticas – ao qual a membrana das células seja impermeável – em concentração suficientemente elevada para ser notório o fenómeno de *quenching* o qual se traduz num alargamento das bandas do espectro da sonda na vizinhança desse agente. O diagrama da figura 1.3 esquematiza a medição de volume interno numa suspensão por espectroscopia de RPE.

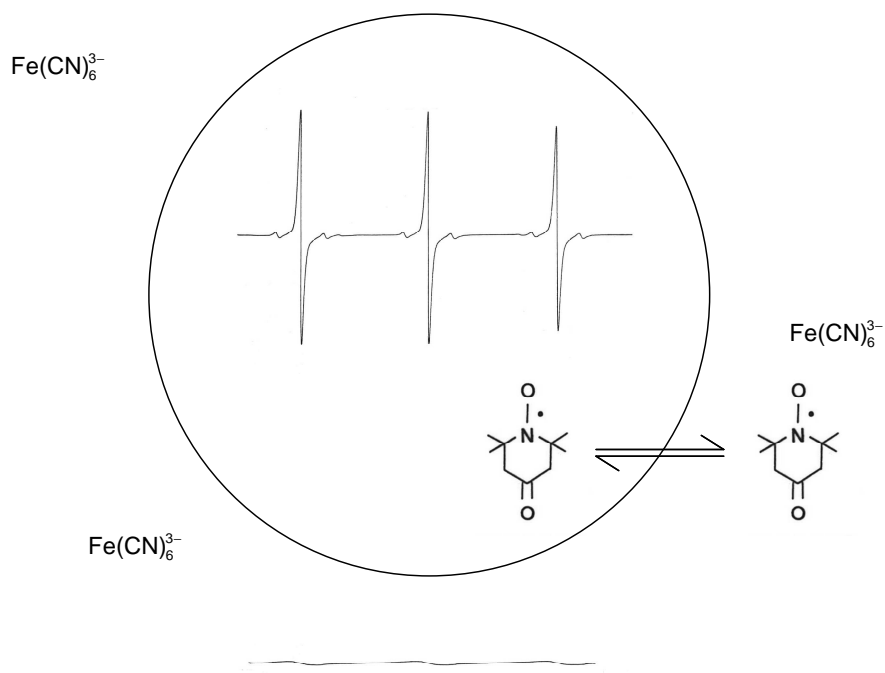


Figura 1.3. Diagrama esquemático das determinações de volume por RPE. A sonda TEMPONE atravessa livremente a membrana, o agente de *quenching* ferricianeto (ao qual a membrana da célula é impermeável) fica no meio de suspensão. Os sinais no esquema são espectros de TEMPONE em solução aquosa: no compartimento intracelular um sinal da sonda livre e no meio de suspensão um sinal alargado (*exchange-broadened signal*) pela presença do agente de *quenching* ferricianeto. [O diagrama usa espectros de Almeida (1990).]

Finalmente, o volume aquoso interno é calculado por comparação da intensidade dos dois sinais de RPE da suspensão tendo em conta a diferença de microviscosidade revelada pela sonda. A figura 1.4 mostra dois espectros de RPE da sonda TEMPONE numa suspensão de eritrócitos, sendo o primeiro espectro o sinal total da sonda, e o segundo, obtido na presença do agente de *quenching* ferricianeto, “apenas” o sinal intracelular. (Na verdade, uma sobreposição dos dois sinais em condições nas quais a influência do sinal extracelular, alargado, na intensidade do sinal intracelular é considerada negligenciável.)

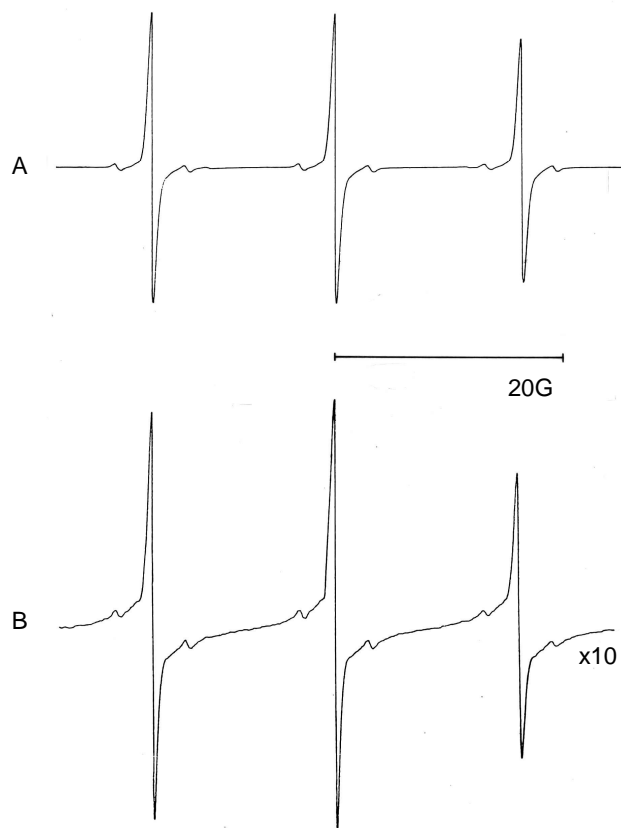


Figura 1.4. Espectros de RPE de TEMPONE (concentração 0,4mM) em suspensões de eritrócitos humanos (osmolalidade $0,29\text{osmolkg}^{-1}$); a barra de escala refere-se ao campo magnético. A) Sinal total; B) sinal obtido na presença de um agente de *quenching*, ferricianeto (concentração 35mM), evidenciando a sonda localizada no meio intracelular. O ganho no registo deste espectro foi 10x relativamente ao do sinal total. [Adaptada de Almeida (1990).]

Por questões que se prendem com a “durabilidade” do sinal da sonda, o trabalho de marcação das suspensões de eritrócitos com o nitróxido tem de ser feito imediatamente antes da obtenção do respectivo espectro, pelo que tanto a preparação das suspensões a diferentes tonicidades como a sua marcação era feita em bancada de apoio ao equipamento instalado na FCUP. O procedimento descrito, que tinha sido explorado por Matos na sua aplicação ao caso do eritrócito (1984), permitiu assim estudar a resposta osmótica de subpopulações de eritrócitos de diferentes idades, na gama de tonicidades experimentada nesse trabalho anterior com a população eritrocitária total. Para cada experiência, todo o trabalho prévio de preparação de amostras biológicas foi levado a cabo no ICBAS.

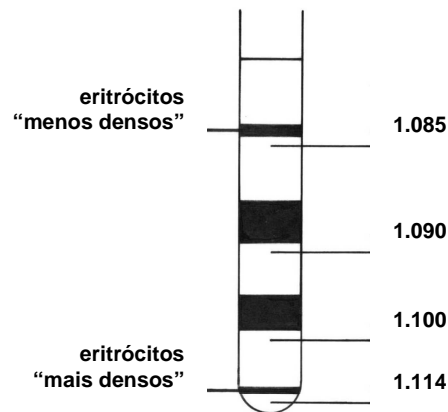
Procurando fraccionar a população total de eritrócitos totais por idades

Não sendo conhecida experiência disso na U.Porto (ou em qualquer outra instituição em Portugal), o maior desafio do projecto foi a montagem, localmente, de procedimento para a separação de eritrócitos por idade. À data, e como mencionado anteriormente, existiam renovadas possibilidades de abordagem experimental ao problema do envelhecimento eritrocitário que se traduziam na possibilidade de um fraccionamento da população total por idade de execução simples. Havendo evidência de uma correlação entre a idade dos eritrócitos e a sua densidade (Borun *et al.*, 1957), um modo prático de obtenção de fracções de eritrócitos enriquecidas em células novas ou velhas, e que vinha a ser adoptado por muitos investigadores, era o fraccionamento da população total por densidades com recurso a centrifugação. São várias as maneiras de fazer este fraccionamento por densidades, sendo possível recorrer quer a uma centrifugação (prolongada) num meio de densidade uniforme quer a uma centrifugação em gradiente de densidade. Para uma primeira abordagem, a opção foi por seguir o procedimento de Hall e Ellory (1986), baseado no método de Tucker e Young (1982) e que é essencialmente uma centrifugação diferencial. Brevemente, o procedimento de Hall e Ellory envolve uma centrifugação de uma suspensão de células concentrada – cerca de 80%, em volume – a 2500xg (duas mil e quinhentas vezes a aceleração da gravidade, g), durante 60 minutos, a posterior recolha das fracções superior e inferior, correspondentes cada uma a aproximadamente 25% do volume, seguida de uma nova sedimentação, repetindo as condições e procedimento final da primeira, para cada uma dessas fracções recolhidas. Desta forma, cada uma das fracções que se obtêm por último corresponderá a uma percentagem de células de 6-7%, em volume. O procedimento é moroso, mas implica apenas o recurso a uma centrífuga de bancada e foi assim escolhido para uma primeira abordagem.

O estudo da resposta osmótica destas fracções mostrou diferenças no comportamento de células de diferente densidade (Damas *et al.*, 1990) e interessou tentar de seguida um procedimento que fosse conducente a uma melhor separação. Recorreu-se nesse sentido a centrifugação em gradiente de densidade. Especificamente, e seguindo um procedimento baseado na descrição de Corash e colaboradores (1974), usaram-se gradientes descontínuo de densidade de arabinogalactano, Larex-L.O. (Consulting Associates, Inc., Tacoma, WA). Este fraccionamento por densidade envolve uma sedimentação a uma aceleração centrífuga mais elevada, na ordem de 50000xg – que requer um outro tipo de

equipamento –, durante 30 minutos. Dado que se trata de um gradiente descontínuo, as subpopulações que assim são obtidas têm uma gama de densidades definida. A figura 1.5 mostra um diagrama representativo do perfil de separação obtido, incluindo ainda, para melhor ilustração, uma fotografia de eritrócitos num gradiente descontínuo de arabinogalactano após centrifugação.

A)



B)

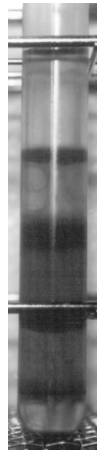


Figura 1.5. Frações eritrocitárias em gradiente descontínuo de densidade de arabinogalactano (Larex-L.O.). A) Esquema representativo do perfil de distribuição de eritrócitos humanos após centrifugação; B) fotografia de um gradiente desse tipo. As densidades (à temperatura ambiente) das diferentes soluções estão indicadas em A. [Esquema A adaptado de Almeida (1990).]

Embora o arabinogalactano estivesse na altura já disponível comercialmente, a preparação das soluções requeridas para fazer os gradientes de densidade envolve ainda uma manipulação demorada e relativamente complexa, implicando primeiro

um ajuste de tonicidade e depois a preparação de soluções de diferente densidade que podem ser guardadas congeladas à temperatura de -20°C para uso posterior. Resumindo, a rotina da preparação de amostras que foi seguida envolvia: proceder a uma primeira sedimentação da amostra de sangue por centrifugação para separação dos eritrócitos do plasma e outras células; fazer duas lavagens dos eritrócitos, ressuspendendo em tampão fosfato salino e repetindo o procedimento inicial; fraccionar os eritrócitos lavados por densidade, reservar as fracções de “células mais novas” e de “células mais velhas” e, no caso da separação em gradiente de densidade, fazer nova lavagem; ressuspende finalmente os eritrócitos, ou as fracções eritrocitárias, em tampão fosfato salino a um hematócrito (percentagem em volume) de aproximadamente 60% para posterior estudo da resposta osmótica.

Uma última nota sobre as condições para a preparação de amostras de células com fraccionamento por densidade. Este trabalho envolveu uma série de colaborações e, no caso da preparação de células, foi realizado no laboratório ligado ao grupo de Maria de Sousa no ICBAS. A investigação aí conduzida era focada na compreensão do mecanismo da hemocromatose hereditária, havendo nesse âmbito algum interesse no fenómeno do envelhecimento eritrocitário e na possibilidade de separação de eritrócitos por idade. Os fraccionamentos que acabaram por ser feitos também aí usaram um outro meio para a formação de gradientes de densidade; na verdade, vários gradientes eram possíveis e correntemente usados, valendo a pena fazer um desvio pelo estabelecimento dessas condições de separação.

Um breve desvio pelas diferentes separações de eritrócitos por densidade

Como anteriormente referido, a evidência de uma correlação entre idade e densidade tinha sido encontrada nos anos cinquenta (Borun *et al.*, 1957) e, pela possibilidade metodológica que representava, vários trabalhos foram dedicados à optimização de um fraccionamento da população total de eritrócitos circulantes por densidades. Este tipo de abordagem não é o único que permite a obtenção de células de diferente idade, mas muitos estudos relacionados com o envelhecimento eritrocitário tiveram por base esta correlação. O recurso a gradientes de densidade tem vantagens relativamente a um fraccionamento baseado neste parâmetro realizado em meio de densidade uniforme. Assim, para a preparação de fracções ou para a determinação de perfis de densidade, tinham sido experimentados gradientes de albumina sérica bovina (Leif & Vinograd, 1964; Piomelli *et al.*, 1967),

ésteres de ftalato (Danon & Marikovsky, 1964), entre outros; estes meios apresentavam uma série de problemas desde o custo elevado à não miscibilidade com um meio aquoso. A possibilidade de usar arabinogalactano, um polissacarídeo de origem vegetal, tinha sido explorada por Corash e colaboradores no início dos anos setenta (Corash *et al.*, 1974); estes investigadores desenvolveram um procedimento para a sua purificação a partir de um extracto bruto, tendo sido o método adoptado por muitos grupos sobretudo quando, sob a designação de Larex-L.O., o produto passou a ser comercializado numa forma já purificada. A implementação de fraccionamento em gradientes de Percoll (Rennie *et al.*, 1979), um meio contendo partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona, ganhou também grande expressão. A variedade de meios e detalhes das separações realizadas marca a história do fraccionamento de eritrócitos por densidade nos estudos do envelhecimento destas células e será analisada posteriormente (veja-se o Capítulo 7).

Uma nota sobre resultados...

O trabalho que tenho vindo a descrever iniciou-se porque na tentativa de esclarecer a não idealidade da resposta osmótica do eritrócito interessou averiguar uma possível influência da heterogeneidade da população circulante em termos da idade das células. Os resultados obtidos (Almeida *et al.*, 1990; Damas *et al.*, 1990) demonstraram diferenças na resposta osmótica de células de diferente densidade – na gama de tonicidades elevadas, a diminuição de volume que se observa com o aumento da tonicidade é menos acentuada no caso das células menos densas –, fazendo com que no sentido de melhor perceber essa diferente resposta a atenção se voltasse para o próprio fenómeno de envelhecimento eritrocitário. Como referido anteriormente, a possibilidade de recurso à espectroscopia de RPE tinha proporcionado uma nova abordagem a um problema já antigo mas ainda em aberto. Para concluir, será importante salientar o facto de que o trabalho, não tendo tido como interesse inicial explícito o estudo do envelhecimento eritrocitário, mas antes analisar a sua influência num dado comportamento da célula, esse sim o foco inicial da pesquisa, acabou por se transformar no interesse em melhor compreender esse fenómeno.

1.3. Segundo momento. Explorando condições de envelhecimento acelerado

O interesse no problema da resposta osmótica do eritrócito ligado ao facto de que o comportamento da célula não segue o modelo do osmómetro perfeito, cruzou-se com o interesse no fenómeno de envelhecimento eritrocitário e, se no momento anteriormente tratado poderia haver uma maior ênfase no primeiro, havia agora um interesse mais centrado no problema do próprio envelhecimento eritrocitário. De entre possíveis diferentes abordagens, pareceu relevante estudar o envelhecimento destas células em condições que se entendiam como sendo de envelhecimento acelerado. Assim iniciei um segundo trabalho que pretendia estudar o fenómeno de envelhecimento do eritrócito, e o caso da regulação do volume celular, em relação com a condição de stress oxidativo e/ou proteolítico da célula. Mais concretamente, a ideia inicial era a de usar as condições de exercício físico intenso – uma vez que impõe aumentos do consumo de oxigénio até 1000% do valor de repouso (cf. Silva, 1992) – e a do armazenamento de eritrócitos em banco de sangue como casos. Este novo trabalho desenvolvia-se no seio de uma equipa multidisciplinar centrada no (então) Centro de Citologia Experimental (CCE) da U.Porto, liderada por Alexandre Quintanilha e incluindo investigadores de formação diversa como bioquímica, ciências farmacêuticas e medicina, e que estudavam condições de alguma forma relacionadas.

A compreensão do fenómeno de envelhecimento biológico caracterizava-se na altura por uma multiplicidade de explicações parciais, havendo muita controvérsia a respeito, mas sendo aceite o facto de que a lesão oxidativa acompanha o fenómeno, como a revisão de Beckman e Ames (1998), publicada um pouco depois, pode ilustrar. No caso particular do eritrócito, a ocorrência de danos por oxidação foi estudada desde cedo e a evidência de várias alterações relacionadas com processos oxidativos que tinham sido observadas com o envelhecimento da célula vinha sendo um dos focos da discussão acerca do fenómeno na literatura especializada (cf. Clark, 1988b).

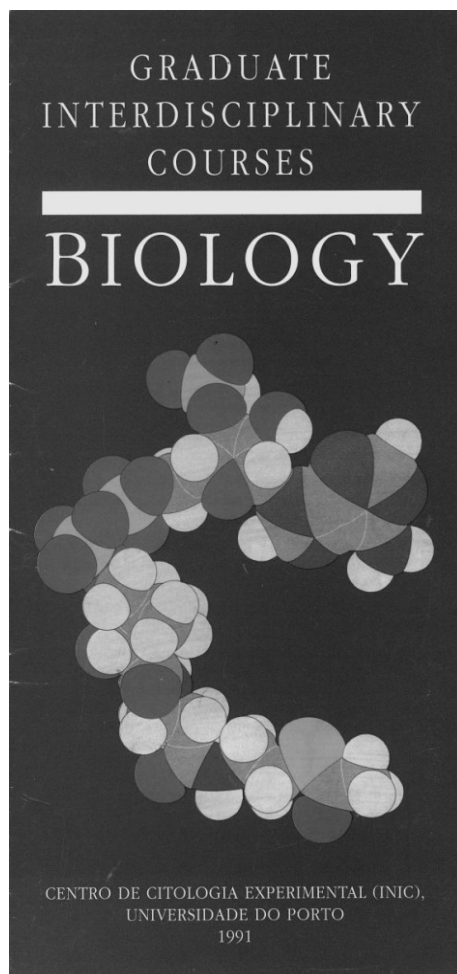
Na sequência do trabalho anterior, a minha atenção focava-se nos mecanismos de regulação do volume celular; agora, em relação com a condição stress oxidativo e/ou proteolítico. Neste grupo de investigação, e com a contribuição de investigador da área de medicina desportiva, havia acesso a amostras de sangue humano recolhidas antes e após a realização (monitorizada) de períodos de exercício intenso realizado em condições aeróbias e portanto impondo uma condição de stress oxidativo. A minha participação envolvia uma caracterização de diferentes

parâmetros no eritrócito com recurso à espectroscopia de RPE relacionados com a regulação do volume e também com o sistema de protecção antioxidante da célula e, neste último caso, também através de avaliações bioquímicas. O apelo à procura de meios de visualização de eventuais alterações na célula surge aqui naturalmente – era bem sabido que o fenómeno de envelhecimento do eritrócito é acompanhado por alterações na sua morfologia (cf. Bessis, 1973 [1972]) – pelo que se procurou ter a funcionar um procedimento de preparação de amostras com vista à obtenção de imagens por microscopia electrónica de varrimento, possível através de um serviço do Centro de Metalurgia e Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). Algumas imagens de microscopia electrónica que incluo em capítulos posteriores resultam deste ensaio.

Antes de concluir sobre este momento de trabalho laboratorial – pela minha parte interrompido – interessa olhar uma outra vez o contexto. Como mencionei anteriormente, este trabalho era feito no âmbito de uma equipa multidisciplinar, havendo uma série de pessoas interessadas em desenvolver investigação nesta área. Assim, merece uma nota o facto de que os temas dos cursos graduados (*“Graduate Interdisciplinary Courses”*) organizados no CCE em 1991 incluíram estes aspectos. Pode salientar-se o caso de *“Regulation and Pathology of Membrane Transport”*, com foco no eritrócito. A figura 1.6 mostra imagens do desdobrável de comunicação da iniciativa, página de rosto e descrição desse curso em particular.

Explorando o caso do eritrócito do ponto de vista experimental, o curso envolveu também aspectos de modelação matemática. Os tópicos tratados incluíram o transporte através da membrana eritrocitária e ainda o efeito da lesão oxidativa e proteolítica nesta estrutura. Foram docentes do curso investigadores bem conhecidos quer no tópico do transporte através de membranas biológicas (Jesper Brahm e Robert Macey) quer no do envelhecimento do eritrócito (Grzegorz Bartosz). A referência a esta iniciativa pretende ser uma ilustração do esforço no sentido da criação de um ambiente favorável ao desenvolvimento de investigação focada no envelhecimento eritrocitário.

A)



B)

REGULATION AND PATHOLOGY OF MEMBRANE TRANSPORT

November 18 - 29

Coordinating Professor: Alexandre Quintanilha, University of Porto, Portugal

Topics

- Transport of ions and metabolites across the red cell membrane; regulation, kinetics and genetic variants; theoretical modelling
- The effects of membrane oxidative and proteolytic damage.

Professors

- Jesper Brahm, University of Copenhagen, Denmark
 - Robert Macey, University of California at Berkeley, USA
 - Grzegorz Bartosz, University of Dusseldorf, Germany
-

Figura 1.6. Imagens do desdobrável dos cursos graduados em biologia organizados no CCE da U.Porto em 1991. A) Frente do documento; B) descrição do curso “*Regulation and Pathology of Membrane Transport*”. [Reproduzidas com autorização do coordenador científico dos cursos.]

1.4. E então?

A actividade deste grupo de investigação prosseguiu com resultados em publicações de alguma forma ligadas ao fenómeno de envelhecimento eritrocitário. Os interesses orientaram-se no âmbito das ciências farmacêuticas e incluindo o estudo de novos marcadores de risco relativamente a algumas patologias (cf. Santos-Silva *et al.*, 1995). Voltarei à contribuição deste grupo da U.Porto mais tarde, no Capítulo 3.

O meu envolvimento cessou neste período, uma série de circunstâncias exteriores adiaram-no, dirigiram os meus interesses de investigação num outro sentido e assim acabei por aqui “voltar”. Na minha análise da dinâmica dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário, várias questões/interesses emergem dessa fase de trabalho no quadro da biofísica. Em primeiro lugar, e em relação com a ideia subjacente à citação inicial de Hans-Jörg Rheinberger, a questão em torno do papel de sistemas experimentais e dos avanços tecnológicos na produção de conhecimento. Depois, a questão a respeito de condições (e consequências) de eleição de um dado modelo experimental. Finalmente, uma questão relacionada com práticas de visualização, procurar perceber de que forma a produção de imagens é relevante na produção de conhecimento científico. Como ficará claro ao longo do texto, estes são interesses principais da presente tese.

Capítulo 2. Explorando Questões de Escala numa Análise da Dinâmica da Ciência

Um dado fenómeno só pode ser representado numa dada escala. Mudar de escala implica mudar o fenómeno.

– Santos, 1988: 144

Em diferentes análises sobre as ciências da vida, a biomedicina e sua dinâmica a ênfase é colocada na escala a que se refere o conhecimento – acontece assim com o discurso à volta da chamada molecularização, que marca o início da segunda metade do século XX, ou, para tempos mais recentes, com o de uma viragem para o sistema. Esta mudança é, de resto, a base de muito do debate que vem sendo feito acerca da área. As questões de escala são centrais na compreensão dos sistemas vivos e, naturalmente, estão bem presentes também na discussão que se faz na área. Sendo este tipo de questões um foco da análise dos estudos relacionados com o envelhecimento eritrocitário nesta tese, o que se segue é um apontamento sobre essa centralidade e o modo como pode ser explorada do ponto de vista dos estudos sobre a ciência.

2.1. Centralidade das questões de escala na compreensão do vivo

Podemos começar referindo um bem conhecido personagem da ficção: Mr. Tompkins, de George Gamow. No “mundo da biologia” – o universo de “*Mr. Tompkins Learns the Facts of Life*” (1954 [1953]) –, Mr. Tompkins é injectado na sua própria corrente sanguínea iniciando com essa mudança de escala uma viagem fantástica de descoberta do corpo humano e do conhecimento que existe sobre ele. Primeiro no plasma, depois em cima de um eritrócito, percorre diferentes lugares do seu corpo, experimenta as dificuldades por que passa esta célula no seu trajecto normal no sistema circulatório e, nesse percurso, vai sendo fascinado pelas diferenças introduzidas pelo novo nível de observação em que se encontra. A uma escala de comprimento na qual uma simples lupa lhe permite observar estruturas moleculares, Mr. Tompkins vê com nitidez apenas aquilo que a investigação científica já transformou em conhecimento. Interessa aqui particularmente a parte em que se debate com a questão de saber se o eritrócito é ou não algo vivo:

“Antes de mais nada”, disse Mr. Tompkins, “gostaria de saber se esta coisa em que viajamos é ou não viva?”.

“Aí está uma pergunta difícil de responder”, retorquiu o Dr. Streets. “Eu diria que sim, se bem que com algumas reservas. Na realidade, os glóbulos vermelhos estão constantemente a nascer; vivem a sua vida e, por fim, morrem ao atingirem três ou quatro meses de idade. O local onde se originam os eritrócitos é a medula vermelha dos ossos, onde se vão formando pela divisão celular de células especiais chamadas eritroblastos. Mas, uma vez que eles atingem a corrente sanguínea, o seu núcleo degenera, e devo acentuar que uma célula sem núcleo só pode ser considerada meia viva. Em particular, perdem por completo a capacidade de se reproduzir, e isto porque a divisão celular é um processo intimamente dependente do núcleo.”
(Gamow, 1954 [1953]: 15-16)

A narrativa é duplamente interessante. Primeiro, porque fala de olhar ao nível da célula e, assim – e como se desenvolve mais à frente (veja-se o Capítulo 3) –, se levanta aqui a questão de saber se o eritrócito, uma célula desprovida de núcleo, é ou não algo vivo. Depois, porque fala de olhar ao nível da célula mas não deixando de fazer apelo ao sistema em que essa célula se insere invocando a renovação da população de eritrócitos circulantes. A que escala é definida essa interrogação de Mr. Tompkins? Esta é uma pergunta que se pode colocar desde já, mas à qual só voltarei então mais tarde.

Deixemos por agora a literatura de ficção. A preocupação com as escalas no estudo de seres vivos encontra-se bem presente nos diferentes tipos de literatura especializada, desde os artigos de revista que constituem a principal base de comunicação entre pares, aos livros de texto usados na formação científica e ainda aos textos de documentos de divulgação e captação de interesse pela área. Será importante ilustrar.

Começando por este último tipo de documento, vejamos, a título de exemplo, o folheto informativo e de divulgação da bioquímica – *“Biochemistry: What? Why? & How”* – editado pela sociedade científica desta área do Reino Unido, a *Biochemical Society*, disponibilizado durante vários anos no seu portal da Web. Aí, informando sobre o que fazem os bioquímicos fazem, tem-se:

Os bioquímicos trabalham a todos os níveis de complexidade, desde moléculas simples até às células e organismos completos. Com conhecimento dos mecanismos moleculares mais essenciais, os bioquímicos estudam o modo como os diferentes processos se integram permitindo às células individuais funcionar e interagir para formar organismos complexos. (Biochemistry: What? Why? & How⁷)

⁷ Folheto descarregado de: www.biochemistry.org/Education/careers.aspx em Julho de 2010.

A biofísica, por seu turno, e de acordo com a apresentação no livro de texto “*Biophysics*” por Roland Glaser (2001 [1996]), destinado a estudantes universitários, cruza diferentes níveis de organização dos sistemas biológicos. Assim, “diz respeito a todos os níveis de organização, desde os processos moleculares aos fenómenos ecológicos” (ibidem: 3). Uma passagem que surge logo no início do livro é talvez mais esclarecedora: “[...] a biofísica não é uma simples colecção de abordagens físicas à biologia, mas uma disciplina definida com a sua própria rede de ideias e abordagens, cobrindo todos os níveis hierárquicos de organização biológica” (ibidem: vi).

Ainda explorando o contexto dos livros usados no ensino universitário na área da biofísica, será interessante mencionar uma observação de Peter R. Bergethon em “*The Physical Basis of Biochemistry*”. Na mensagem de preâmbulo dirigida aos leitores estudantes (1998: ix-x), o autor esclarece que o biólogo é um cientista preocupado com o sistema – “*a system scientist*” –, sendo que para aquele que trabalha em biofísica, bioquímica, ou ainda em biologia celular e molecular, que estuda detalhes do sistema, o importante é ainda o sistema. Em paralelo, e como de resto seria esperado, Bergethon sublinha a importância da descrição rigorosa dos detalhes do sistema para uma descrição adequada desse mesmo sistema, mas fá-lo salientando que o foco de atenção nestas áreas do conhecimento é o modo como esses elementos interagem.

Deixo o caso da discussão entre pares para mais tarde (veja-se 2.1.4). Tem-se aqui já um retrato do modo como os investigadores exercem nas ciências da vida: mesmo quando o trabalho se desenvolve em níveis de descrição de menor escala, a sua preocupação continua a ser o sistema. A esta altura será oportuno fazer um breve desvio para tomar atenção a uma propriedade básica dos objectos – o tamanho –, vendo o que se passa no caso específico de seres vivos.

2.1.1. Algumas observações sobre tamanho de seres vivos

Para melhor perceber o problema que aqui se desenvolve à volta das escalas convirá observar a variedade de tamanhos dos organismos. O que proponho aqui é apenas um percurso por alguns dados bem conhecidos – e usualmente tratados em contexto educacional – a respeito dessa diversidade de tamanhos, a qual é também (e em relação com essa) uma diversidade de formas. Tomando como referência a informação em “*On Size and Life*” (McMahon & Bonner, 1983), há três aspectos que interessa destacar sobre o mundo vivo. Pode começar por notar-se que o espectro

de tamanho varre vinte e uma ordens de grandeza em massa e oito ordens de grandeza em comprimento. Por outras palavras, a razão entre as massas do organismo maior – a baleia azul – e do organismo menor – o micoplasma – tem o valor de 10^{21} , sendo a correspondente razão entre comprimentos de 10^8 . Em sequência vale a pena referir que a multicelularidade em seres vivos pode ser entendida como uma característica imposta por constrangimentos físicos relacionados com um maior tamanho – uma célula precisa fazer trocas com o meio exterior para se manter viva, isto é, para continuar viável, e essa imposição deriva do simples facto de que, com o aumento de uma dimensão linear, a área de superfície exterior de um objecto aumenta menos acentuadamente do que o seu volume. Pensando em termos de evolução biológica, pode referir-se que “[t]ornar-se multicelular é um modo especialmente importante de se tornar maior” (ibidem: 7), assim como notar o facto extraordinário de que tamanho celular surge sem grandes variações. Chega-se deste modo ao enunciado de que “[u]m organismo grande é uma colecção organizada de células que funcionam como uma unidade” (ibidem: 21), e à observação de que o aumento de tamanho dos sistemas vivos implicou, por esse tipo de constrangimentos, uma maior divisão de tarefas. Esta pode ser dita como um aumento da “complexidade” do sistema. Assim, pode notar-se, por último, que a complexidade de um organismo multicelular avaliada pelo número de tipos celulares que o constituem – uma medida primária desse parâmetro – aumenta com o tamanho do organismo.

2.1.2. Escalas, tamanho e complexidade

Há que notar que os sistemas vivos em geral são descritos como sistemas complexos, podendo a célula ela própria ser tratada como um sistema complexo (Mazzocchi, 2008). A observação é aqui importante pois, para além de referir um dado relevante, torna clara a dificuldade das designações e ilustra a necessidade de uma interpretação contextual. São várias, de facto, as acepções que podemos encontrar para a noção de complexidade. O foco da presente análise é a centralidade das questões de escala para a compreensão do vivo e, nesse sentido, será importante olhar ainda a noção de complexidade associada à ideia de emergência. Uma característica que os sistemas complexos partilham é a de exibirem propriedades emergentes (ibidem), ou seja propriedades que resultam da interacção entre partes e se revelam quando estas são reunidas. Nesta sequência de ideias, há que chamar à discussão um outro conceito que tem vindo a ser usado,

o de causalidade descendente (*downward causation*). Procurando traduzir a ideia de que o comportamento das partes é influenciado pelo todo, esta noção é crucial no entendimento que se tem hoje dos sistemas vivos (Mazzocchi, 2008; Noble, 2008). A co-existência de diferentes níveis de organização nos organismos e este tipo de relação significa uma série de constrangimentos no seu estudo. A passagem que cito de seguida refere-se a isto mesmo:

[...] os cientistas devem estar conscientes de que o conhecimento científico se desenvolve sempre dentro das fronteiras de certos constrangimentos. No entanto, isto não deve ser um factor limitante. Qualquer constrangimento pode ser também uma oportunidade que, se explorada, permite o surgimento de novas possibilidades. Os cientistas deverão portanto adquirir um conhecimento mais completo de um dado fenómeno se o explorarem de diferentes 'horizontes' cognitivos, tais como pontos de observação em diferentes níveis hierárquicos, os quais [...] cooperam e se complementam mutuamente. (Mazzocchi, 2008: 14)

Ressalta-se neste excerto a referência que o autor faz aos diferentes níveis a que podem ser feitas observações e se produz conhecimento e à importância de que o estudo se faça em diferentes níveis para um conhecimento completo.

Deve clarificar-se que quando se fala de escalas, se fala de facto não só de escalas de comprimento mas também de escalas de tempo. Esta relação entre dimensões espacial e temporal – e volto agora ao universo ficcional de George Gamow – encontra-se de resto também patente na conversa que Mr. Tompkins mantém com o seu médico, Dr. Streets, na viagem através do seu próprio corpo.

"[...] Apenas o vou injectar na sua própria corrente sanguínea, [...]. A viagem de circulação pelas vias principais do seu aparelho sanguíneo não demora, na realidade, mais de meio minuto, mas, visto que teremos de reduzir as nossas dimensões, a escala de tempo terá que ser convenientemente modificada de modo a podermos fazer a inspecção com todo o nosso vagar." (Gamow, 1953: 4)

É corrente fazer-se relação entre espaço e tempo. No contexto em que tratamos a questão, espaço e tempo são variáveis independentes, mas ambas necessárias para a caracterização de um sistema vivo. Vejamos mais atentamente o discurso especializado em torno das escalas de tempo nos sistemas vivos. Existe nos seres vivos uma "hierarquia temporal de estados estacionários", como se pode ler no livro de texto de biofísica atrás referido (Glaser, 2001 [1996]). A título de exemplo, o autor recorre ao caso do envelhecimento eritrocitário, partindo da comparação da taxa de envelhecimento do indivíduo com a de divisão das células que estão na

origem dos eritrócitos circulantes, e vale por isso a pena citar esse trecho em extensão:

*Um sistema biológico consiste em subsistemas, cada um dos quais está associado a uma diferente constante de tempo. Por exemplo, a taxa de envelhecimento no homem é pequena, comparada com a taxa de mitose de uma célula hematopoiética. Assim, as condições na medula óssea podem ser consideradas estacionárias no decurso de vários ciclos de mitose apesar do processo de envelhecimento que afecta o organismo como um todo. *In vivo*, o tempo de vida de um eritrócito humano é de cerca de 100 dias. A composição iónica dos eritrócitos jovens difere um pouco daquela das células maduras. Se alguém estiver interessado na regulação iónica destas células, então, pelas características temporais de tais processos, serão suficientes experiências com duração de poucas horas para proporcionar a informação desejada. Dentro de períodos de tempo tão pequenos a concentração iónica pode ser considerada estacionária. (Glaser, 2001 [1996]: 128)*

O exemplo pretende ilustrar o organismo como sendo um sistema em estado estacionário numa determinada janela de tempo; a imagem do envelhecimento é útil pois a ideia que o autor pretende transmitir é a de que apesar de se tratar o sistema como um todo em estado estacionário, ele de facto muda, envelhece.

Concluindo esta breve exposição, os sistemas vivos são constituídos por uma série de subsistemas e a hierarquia é não só espacial como também temporal.

2.1.3. Entre o todo e as partes – falando de método

De certa forma, a informação anterior sobre escalas, tamanho e complexidade pode ser sintetizada pela asserção de que os sistemas vivos são entendidos, tanto funcionalmente como estruturalmente, em múltiplos e simultâneos níveis de organização. São importantes as implicações metodológicas, como se referiu de modo breve. Vejamos mais atentamente. Aon e Cortassa exploram detalhadamente, e do ponto de vista do experimentalista, a questão da relação entre complexidade dos sistemas vivos e os seus diferentes níveis de organização (1997). Cada método de perturbação usado no estudo do sistema tem uma relação espaçotemporal característica ou, nas suas palavras, “[o]s métodos de perturbação usados para estudar fenómenos biológicos reflectem a dinâmica dos níveis de organização nos quais se integram no sistema biológico em estudo” (ibidem: 53). Como prosseguem estes autores, uma questão relacionada e que importa colocar é a de saber qual o nível de explicação que um determinado método de perturbação proporciona, mostrando nesse sentido ser diferente estar relacionado com um fenómeno e proporcionar um nível de explicação correspondente ao fenómeno. A

situação será pois esta: diferentes escalas de observação implicam diferentes níveis de descrição ou explicação.

Esta discussão refere-se à relação entre o comportamento do todo e das partes, sendo bem sabido que as questões que se desenvolvem em torno dessa relação são já antigas. Claude Bernard, no seu bem conhecido ensaio sobre o estudo da medicina experimental (1978 [1865]), elaborando sobre condições experimentais especiais aos seres vivos e a ideia de que nos seus organismos há a considerar “um conjunto harmónico dos fenómenos”, afirma:

O fisiologista e o médico não devem nunca esquecer que o ser vivo forma um organismo e uma individualidade. [...] É preciso, portanto, saber que, se decompomos o organismo vivo, isolando as suas diversas partes, é para facilitar a análise experimental e não para as conceber separadamente. Na verdade, quando se quer dar a uma propriedade fisiológica o seu valor e verdadeira significação, é sempre necessário relacioná-la com o conjunto e só extrair a conclusão definitiva, referindo-a aos efeitos dentro de tal conjunto. (Bernard, 1978 [1865]: 113)

Claro está que esta discussão invoca uma outra, a que é feita acerca da noção de reducionismo. Falar de reducionismo é quase inevitável quando se analisa a evolução das ciências da vida, sendo corrente considerar-se a biologia molecular como exemplo paradigmático de uma abordagem reducionista. A questão não é contudo assim tão simples. O biólogo e historiador da ciência Michel Morange afirma que é impossível dissociar a localização da biologia molecular entre as outras disciplinas biológicas da questão do reducionismo (1994), fazendo a respeito referência à tese de Francisco Ayala que distingue três significados diferentes do termo. Assim, pode falar-se de reducionismo ontológico – exprimindo a ideia de aquilo que se passa a um nível superior segue acontecimentos que têm lugar a um nível inferior –, de reducionismo epistemológico – significando a redução de uma área disciplinar a outra –, ou ainda de reducionismo metodológico – traduzindo o modo pelo qual os problemas são estudados. Morange conclui a sua exposição afirmando:

[...] quando olhamos mais atentamente como trabalham os biólogos moleculares, descobrimos que o reducionismo metodológico não é senão parcial. [...] os conceitos, os esquemas de pensamento são emprestados de outras disciplinas biológicas de inspiração não reducionista. O apelo a esses níveis superiores de análise é indispensável para que se mantenha o edifício da biologia contemporânea. Apenas esta referência aos níveis superiores permite ao biólogo molecular (e ao bioquímico) compreender a finalidade dos fenómenos biológicos que ele estuda e justifica o seu próprio trabalho. (Morange, 1994: 324)

Mas é precisamente esse último significado, o de reducionismo como ferramenta de estudo, aquele que mais interessa no âmbito da presente análise. A ênfase nas práticas percorre toda a análise que se faz nesta tese. Nesse sentido, a noção de reducionismo metodológico pode/deve ser aqui implicada, mas talvez seja útil contorná-la e recorrer a outras ferramentas de análise. Explorar-se-á essa possibilidade na secção seguinte.

Antes de concluir este ponto, uma referência à chamada viragem para o sistema que tem vindo a ser apontada como reorientação recente das ciências da vida, depois da emergência da biologia molecular no período pós Segunda Grande Guerra Mundial e sua posterior afirmação. São numerosos os autores que se têm dedicado a estudar essa aparente mudança que sucede à decifração do genoma humano, sendo este o caso de Evelyn Fox Keller. No artigo intitulado “*The century beyond the gene*” (Keller, 2005), a investigadora analisa esta situação sugerindo a necessidade de uma adaptação da linguagem no sentido de se ir para além das referências à construção do todo a partir das partes começando a falar-se de uma co-construção de partes e todos. É ainda relevante a organização de uma série de iniciativas a respeito. Salienta-se aqui o que foi feito no âmbito da conferência conjunta EMBO/EMBL da série “*Science & Society Conferences*”, que teve lugar em 2008, no EMBL, em Heidelberg, e tratou precisamente desta questão. Sob o título “*Systems and Synthetic Biology: Scientific and Social Implications*”, a iniciativa reuniu uma série de investigadores quer da área das ciências da vida quer dos estudos sobre a ciência. Algumas das contribuições foram publicadas em número especial da *EMBO Reports* de 2009. Entre essas, pode destacar-se as discussões questionando se essa reorientação será uma tendência geral nas ciências da vida (von Wülfingen, 2009), ou ainda se será tradução de uma mudança de paradigma ou apenas uma moda (Potthast, 2009).

Digamos que o estado da arte nas ciências da vida seja o da coexistência de abordagens *bottom-up* – que se cumprem a partir de níveis de organização mais baixos – e de abordagens *top-down*, ou de sistemas – que se efectivam a partir de níveis de organização mais elevados. Ou, por outras palavras, que a biologia contemporânea viva da tensão entre duas orientações opostas: a tendência “reducionista” molecular e a de sistemas. A integração de conhecimento obtido a diferentes escalas de observação assume especial importância.

2.1.4. Integrando conhecimento/s

O problema de saber como articular conhecimento produzido a diferentes escalas e integrar abordagens *bottom-up* e abordagens *top-down* é um problema essencial e que, como veremos, se encontra bem presente no discurso dos cientistas; e também na sua prática – o relativamente recente desenvolvimento de metodologias de modelação multi-escala é uma expressão do reconhecimento da importância de saber como integrar informação referente a diferentes níveis de organização. Vejamos então o que se procura neste âmbito.

Denis Noble – biofísico que se refere a Claude Bernard como o primeiro biólogo de sistemas (Noble, 2008) –, tem explorado extensamente a necessidade de integração (cf. Noble, 2010). Noble é um dos responsáveis de grupo integrado na iniciativa *Physiome Project*⁸ da *International Union of Physiological Sciences* (IUPS). Este projecto conta em 2012 com a participação de doze grupos investigação e é apresentado como uma acção mundial de domínio público no sentido de proporcionar um quadro para a compreensão da fisiologia humana e de outros organismos eucariotas, visando o desenvolvimento de modelos integrativos a todos os níveis de organização biológica. Iniciado em 1993, o projecto tem como objectivos principais usar modelação computacional para a análise integrada de funções biológicas e ainda proporcionar um sistema que possibilite o teste de hipóteses (cf. Hunter & Borg, 2003). Nesta tarefa, os investigadores deparam-se com a dificuldade resultante do facto que diferentes escalas espaciais e temporais implicam recurso a diferentes abordagens matemáticas (ibidem) e daí que seja defendida uma modelação em gamas mais limitadas juntamente com o desenvolvimento de técnicas que permitam ligar os parâmetros da hierarquia de modelos.

Mas deixemos estas questões da modelação matemática que surgem no âmbito do projecto da IUPS, interessantes e importantes mas não as únicas nas quais a centralidade das questões de escala se revela. Num texto já da década de noventa, João Arriscado Nunes (1996) mostra bem essa preocupação no seio de um grupo de investigação em oncobiologia que observou e cujo trabalho analisa. O ponto de vista dos experimentalistas a este respeito é de suma relevância. A importância de uma abordagem integrativa nessa perspectiva tem sido profusamente debatida pelos investigadores Ana Soto e Carlos Sonnenschein, a partir de trabalho que têm

⁸ Veja-se www.physiome.org.nz [conforme acesso em Agosto de 2012].

vindo a desenvolver na área da oncologia. Sublinha-se a contribuição desta dupla de investigadores com referência ao facto de que têm promovido o debate em torno da questão quer no campo da investigação em oncologia básica quer também fora desse campo. Assim tem sido no quadro da história, filosofia e estudos sociais da biologia, com participação activa e continuada nas conferências da *International Society for the History, Philosophy and Social Studies of Biology* (ISHPSSB), com contribuições⁹ no âmbito do problema da explicação multi-nível, ou através das escalas, em biologia.

O problema e os diferentes casos que esses investigadores têm vindo a estudar (Soto & Sonnenschein, 2004, 2005; Soto *et al.*, 2008) implicam a questão de saber a que nível de organização biológica ocorre a carcinogénese, ou, dito de um outro modo, a que nível de organização se “define” cancro. Da análise que fazem dos resultados experimentais, defendem que o cancro surge como problema de organização tecidual em contraste com a ideia de que seja originado numa única célula somática (como a generalidade das células do organismo para além das células da linha germinativa e das células estaminais não diferenciadas), a qual acumulou múltiplas mutações no seu material genético. Localizam assim a discussão na tensão entre as abordagens no quadro da teoria de mutação somática (*somatic mutation theory*) e da teoria do campo de organização tecidual (*tissue organization field theory*). A favor desta última está, por exemplo, a evidência experimental de que a exposição fetal a agentes ambientais como disruptores endócrinos pode causar efeitos que se manifestam no decurso da vida adulta.

Os autores chamam a atenção para o que entendem ser a alteração na percepção dos biólogos relativamente ao sucesso do reducionismo na abordagem de fenómenos complexos a qual referem ter vindo a verificar-se em tempos recentes. Para os autores, “[a] complexidade dos organismos multicelulares gera a percepção de uma descontinuidade entre fenómenos de baixo e elevado nível” (Soto *et al.*, 2009: 5) e propõem uma estratégia para o estudo de fenómenos emergentes incluindo os dois tipos de abordagem, *bottom-up* e *top-down*.

Poderíamos continuar com exemplos, mas a ilustração será já bastante.

⁹ Refere-se a título de exemplo a organização por Sonnenschein da sessão “*Who is Hijacking Systems Biology? The Problem of Multi-Level Explanation in Systems Biology*”, incluída na conferência da ISHPSSB decorrida em 2007, em Exeter; o programa da conferência pode encontrar-se em www.ishpssb.org [conforme acesso em Setembro de 2012].

2.1.5. Explorando questões de escala

A citação de Boaventura de Sousa Santos (1988), incluída no início do capítulo e na qual o sociólogo afirma a inevitável mudança do fenómeno quando se faz uma mudança de escala, é retirada do contexto de uma sociologia do direito. Estas questões que vêm sendo aqui analisadas não são, de facto, locais, não surgem especificamente no contexto do estudo dos sistemas vivos ou mesmo, de um modo alargado, no contexto das ciências naturais. A passagem de Santos podia também ter sido feita no âmbito das ciências da vida e da biomedicina. Esta universalidade do problema das escalas na construção de conhecimento é interessante e de certa forma amplia a relevância do estudo do caso dos sistemas vivos.

No projecto que aqui se reporta, tomou-se o caso da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário para uma investigação no domínio dos estudos sobre a ciência, visando a dinâmica de produção de conhecimento novo e da organização de uma área de investigação no campo das ciências da vida e da biomedicina. O interesse que este caso aparenta ter nesse sentido será aqui duplo: por um lado, temos as complexidades que advêm do facto de que os seres vivos têm uma estrutura multi-escalar e a respeito do envelhecimento de eritrócitos a organização da abordagem ao problema e algumas mudanças de conceitos estão (como ficará claro) relacionadas com escalas; por outro, a relação entre o laboratório de investigação e a prática clínica está fortemente implicada, um outro tipo de complexidades parece emergir quando consideramos o caminho do laboratório para a clínica (e de volta ao laboratório), e também aí se revelam questões de escala.

A investigação relacionada com o fenómeno de envelhecimento do eritrócito foi, de facto, conduzida em múltiplas escalas de comprimento e de tempo. Encontramos estudos focados em seguir alterações que ocorrem durante o tempo de vida do eritrócito, desde parâmetros físicos do citoplasma, de que se falou anteriormente (veja-se o Capítulo 1) e que poderão influenciar a dinâmica de constituintes moleculares da célula às próprias moléculas e sua organização, estudos com a finalidade de entender mecanismos da renovação da população eritrocitária no sangue ou ainda de perceber o envelhecimento do eritrócito e renovação da população circulante em indivíduos idosos. Estes são exemplos entre outros, podíamos continuar a listagem. Mas talvez mais importante, e interessante do ponto de vista do nosso estudo, seja o facto de que a preocupação com escalas é explícita nos estudos do envelhecimento do eritrócito, sendo que frequentemente se encontra nos textos publicados referência a essa problemática das escalas quer

numa perspectiva de organização do conhecimento existente quer na de apresentação de expectativas. Esta presença parece merecer especial atenção e proporcionar um bom ponto de entrada para a análise da dinâmica de produção de conhecimento neste campo.

2.2. Instrumentos para a análise

A secção anterior procurou mostrar que no estudo de sistemas vivos os investigadores se deparam com a natureza multi-escalar desses sistemas, ou a sua constituição em múltiplos e simultâneos níveis de organização, sendo várias as implicações no trabalho que desenvolvem e no conhecimento que vai sendo construído. A exposição terá sido um pouco longa, mas entendeu-se privilegiar uma apresentação por exemplos. Foquemo-nos agora na presente abordagem. Interessa aqui a dinâmica das ciências da vida e biomedicina, explorando precisamente essas implicações na investigação que vai sendo realizada, desde as escolhas metodológicas aos resultados obtidos e sua discussão. Procuremos então apresentar ferramentas de estudo e seu enquadramento teórico.

2.2.1. Do modelo kuhniano do conhecimento científico à teoria do actor-rede e mais

Esta tese faz uma leitura da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário do ponto de vista dos estudos sobre a ciência. Adota-se aqui a expressão escolhida por João Arriscado Nunes e Ricardo Roque (2008) – estudos sobre a ciência –, para designar de forma abrangente um campo do conhecimento que, como é bem sabido, é constituído por uma heterogeneidade de orientações disciplinares. Como nota Mario Biagioli ao apresentar esta área disciplinar (1999), trata-se de um domínio do conhecimento com um objecto de investigação muito bem delineado – estudar a ciência – e portanto este será um campo onde não é necessário definir qual a sua matéria já que esse trabalho é feito pelos cientistas, eles próprios. Mas nessa tentativa de definição do domínio, o autor prossegue com a observação de que poderia assumir-se que isso tivesse proporcionado uma identidade disciplinar unificada, acrescentando ter-se verificado exactamente o contrário, ou seja, a ocorrência de uma imensa variedade de abordagens. No texto já referido, Nunes e Roque referem-se também a essa diversidade de correntes no entendimento do campo, incluindo um “discurso de afirmação da autoridade

epistémica e cultural da ciência” ou ainda um momento da “crítica epistemológica e cultural da ciência moderna (2008: 14).

Assume-se aqui uma afinidade com a ideia de reconhecer nos estudos sobre a ciência o resultado de uma porosidade de fronteiras disciplinares entre as tradições de história, filosofia e sociologia da ciência. Vários investigadores têm referido essa porosidade em relação com a chamada “viragem prática” neste domínio (cf. Hagner & Rheinberger, 1998). O presente trabalho toma como foco de especial atenção a prática experimental. Esta orientação de estudo tem vindo a ser muito enfatizada já nas das duas últimas décadas do século XX, havendo que creditar nesse sentido o trabalho desenvolvido pelo filósofo Ian Hacking. O valor epistémico da prática (no seu sentido mais lato) torna-se evidente no entendimento que defende no livro publicado no início dos anos oitenta – *“Representing and Intervening”* (1983) – da experimentação como intervenção sobre o mundo. Mais recentemente, um outro filósofo, Joseph Rouse tem vindo a defender também que a análise de práticas é uma questão importante na filosofia da ciência (2002), mostrando que essa ideia está bem presente já na bem conhecida obra de Thomas S. Kuhn (1998).

No quadro da análise da ciência e do modo como esta se desenvolve, é indiscutível a proeminência da obra de Thomas S. Kuhn, e em particular o livro publicado em 1962 – *“The Structure of Scientific Revolutions”*. Como é frequentemente observado, este livro (Kuhn, 1996 [1962]), que passarei a referir abreviadamente por “Estrutura” representa um ponto de inflexão no modo de entender a dinâmica da ciência. A relevância do trabalho de Kuhn na origem dos estudos sobre a ciência é relativamente consensual (cf. Nunes & Roque, 2008). Mas para dizer da importância da obra de Kuhn, há que referir ainda (sublinhando) a sua integração no discurso dos próprios cientistas. O caso que se menciona de seguida constitui um testemunho interessante no sentido de ilustrar essa proximidade dos cientistas à tese do autor. Na década de 1970, o microbiólogo evolucionista Carl Woese propôs a organização tripartida da árvore da vida nos domínios *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*, estrutura hoje aceite mas então muito criticada. Duas décadas depois, em entrevista publicada na revista *Science* (Morell, 1997), Woese fala do que lhe aconteceu na altura afirmando que ser ridicularizado e não ser levado seriamente é o que sucede quando um cientista rompe um paradigma. Dito isto, acrescenta ser conhecedor da tese de Kuhn, que afirma ter lido e, assim, logo na altura perceber exactamente aquilo que se estava a passar.

Mas vejamos o que propõe Kuhn na sua análise. Como observa o próprio autor, a “Estrutura” pretende “esboçar um conceito [de ciência] que emerge do registo histórico da própria actividade de investigação científica” (Kuhn, 1996 [1962]: 19). A proposta de Kuhn envolve o reconhecimento da ocorrência de descontinuidades no desenvolvimento da ciência, com períodos de “ciência normal”, no âmbito de um dado “paradigma”, intercalados por períodos de crise e por “revoluções científicas” (Kuhn, 1996 [1962]). Não é tanto essa concepção que importa no âmbito deste trabalho, mas sobretudo a sua chamada de atenção para as práticas. Na análise de Rouse (1998), a ciência normal descrita por Kuhn consiste na prática dos cientistas que conhecem o modo de avançar num campo de investigação partilhado, as revoluções científicas são primordialmente reconfigurações da investigação e pelas quais os cientistas passam a trabalhar num mundo diferente.

Logo no prefácio do livro, Kuhn esclarece ter sido influenciado na sua visão por um texto de Ludwik Fleck, afirmando mesmo que esse texto antecipa as suas próprias ideias. Como é frequentemente observado (cf. Löwy, 1994), estas palavras de Kuhn parecem ter tido um papel importante na divulgação desse trabalho de Fleck que, publicado umas décadas antes, não tinha sido objecto de grande atenção. Numa referência à origem dos estudos sobre a ciência é essencial mencionar este trabalho. Fleck é uma figura incontornável neste domínio do conhecimento, que vai sendo redescoberto e sendo por muitos considerado o seu pioneiro. A sua grande contribuição nesta área, a que influenciou Kuhn, é a monografia “Génese e Desenvolvimento de Um Facto Científico” (*“Entstehung und Entwicklung einer wissenschaftlichen Tatsache”*), publicada em 1935, que se desenvolve a partir dos estudos do autor sobre a sífilis (Fleck, 1986 [1935]). A ênfase deste texto situa-se na construção colectiva do conhecimento científico. Fleck apresenta a noção de “colectivo de pensamento científico”, o conjunto de indivíduos que partilham um dado “estilo de pensamento”, refere-se à comunicação entre colectivos de pensamento e procura a partir daí descrever a dinâmica da ciência. O colectivo de pensamento de Fleck é constituído por diferentes círculos envolvendo especialistas e leigos, designadamente o “círculo esotérico” e o “círculo exotérico”. Usarei estas noções mais tarde (veja-se o Capítulo 6) numa análise da presença dos estudos do envelhecimento eritrocitário em contextos para além do laboratório de investigação e da clínica.

Muito do trabalho de análise da obra de Fleck tem sido desenvolvido pela historiadora e socióloga da ciência Ilana Löwy. Segundo a autora (Löwy, 1994):

Fleck dinamiza e historiciza as condições de emergência dos factos científicos. Percebe a ciência como uma actividade colectiva complexa que deve ser estudada por filósofos, historiadores, sociólogos, antropólogos e linguistas, e propõe, dessa forma, um vasto programa de “epistemologia comparada”. (Löwy, 1994: 12)

De resto, como tem sido notado por vários autores, as ideias apresentadas por Fleck nas primeiras décadas do século XX são ainda actuais. Para dar um exemplo, refere-se aqui o trabalho de Jean-Paul Gaudillière. Num artigo incluído em número especial dedicado à obra de Fleck da revista *Studies in the History and Philosophy of Biology and Biomedical Sciences*, o investigador nota a actualidade dessas noções (Gaudillière, 2004). Nas suas palavras, “o colectivo *Denkstil* de Fleck permanece [muitas décadas depois da publicação do ensaio] uma noção muito importante para analisar a história das ciências biológicas e biomédicas” (ibidem: 542). Nesse mesmo artigo, Gaudillière fala de duas leituras da relevância da obra de Fleck. Uma primeira, como uma “tentativa sem precedente de compreender a ciência como uma actividade e um sistema de práticas” (ibidem: 526). E, nesse sentido, prossegue afirmando:

Vista desta perspectiva a noção de Denkstil é quase sinónima de uma forma de experimentação, um modo peculiar de manipular e manusear entidades naturais, e os colectivos de pensamento são portanto comunidade de práticas, as quais arranjam ferramentas e outros meios para criar alguma ordem no variável e confuso mundo material. (Gaudillière, 2004: 526)

Uma segunda leitura é a de uma “demonstração convincente do papel de compromissos sociais e culturais na tomada de forma do conhecimento científico” (ibidem). E nesse sentido, Gaudillière compara os *Denkstile* de Fleck a paradigmas kuhnianos.

A exposição anterior terá já mostrado o reconhecimento da importância de uma ênfase nas práticas no estudo da dinâmica da ciência. Cito ainda João Arriscado Nunes na referência que faz à “centralidade das práticas na compreensão da produção de conhecimento” (2008: 50) como marca do debate epistemológico durante os anos noventa bem como na sua identificação de duas consequências importantes desta viragem – a primeira, trazer para o centro da reflexão sobre o conhecimento a questão da normatividade, a segunda, o que afirma ser um regresso da ontologia. Será altura de tentar uma síntese. Esta orientação no sentido do estudo das práticas científicas está já presente na obra de Ludwik Fleck, que faz uma reflexão a partir da sua própria experiência de produção de

conhecimento, e ainda na obra de Thomas S. Kuhn, que chama a atenção para a importância de se olhar para além dos produtos acabados da investigação científica para se poder entender a dinâmica da ciência. No campo da filosofia surge evidente com o trabalho de Ian Hacking, tendo vindo a ser explorada por outros autores como Joseph Rouse.

Importa fazer aqui um apontamento adicional. Com a referida “viragem prática” nos estudos sobre a ciência, ficou clara a complexidade da configuração actual da ciência onde, na análise de Isabelle Stengers, coexistem diferentes modelos epistemológicos (Stengers, 1996). Para a autora “[a] perspectiva ‘ecológica’ convida-nos a não tomar como ideal de paz uma situação de consenso onde a população das nossas práticas se encontraria submetida a critérios transcendendo a sua própria diversidade em nome de um propósito comum, de algo que lhes fosse superior” (Stengers, 1996: 64). Admita-se pois esta multiplicidade e uma ecologia de práticas.

Para enquadrar a análise da dinâmica da ciência através das suas práticas haverá que considerar ainda a noção de rede, ou melhor de “actor-rede”. Muitos dos trabalhos de investigação levados a cabo hoje em dia no contexto dos estudos sobre a ciência tem inspiração na chamada teoria do actor-rede (TAR), que é identificada com contribuições iniciais dos investigadores Michel Callon (cf. 1999 [1986]) e Bruno Latour (cf. 1995 [1987]). Esta teoria implica a noção de tradução – através de uma série de traduções, os diferentes actores seguem um processo que lhes permite envolver os outros nos seus problemas – e é aqui fundamental para uma contextualização da análise bibliométrica que se inclui.

A actividade dos cientistas é também uma prática escrita. Em *“Mapping the Dynamics of Science and Technology”* (Callon *et al.*, 1986), a TAR suporta o desenvolvimento dos vários capítulos que genericamente explicitam o papel dos textos na produção de conhecimento científico. “O texto é a arma secreta da ciência” (Law, 1986: 67), sendo enviada do laboratório e acabando por ter de ser considerada por quem o lê. O procedimento de análise de co-ocorrência de palavras (*co-word analysis*) é desenvolvido neste sentido (Callon *et al.*, 1986), permitindo explorar este tipo de questões.

A análise de co-ocorrência de palavras é um dos procedimentos bibliométricos correntes. A bibliometria consiste genericamente no estudo quantitativo de informação bibliográfica, tendo vindo a ser usada no estudo da dinâmica da ciência.

Os diferentes procedimentos a que se recorre nesse âmbito permitem abordar variados aspectos dessa dinâmica (cf. Callon *et al.*, 1993), avaliando diferentes indicadores, quer de produtividade quer de relações, e assim possibilitando um mapeamento da dinâmica de um campo estudado.

Mas interessa olhar mais de perto as práticas experimentais. Duas contribuições bem reconhecidas no estudo da dinâmica das ciências da vida e da biomedicina são inspiração fundamental no propósito desta tese. Falo do trabalho de Hans-Jörg Rheinberger (cf. 1997) e ainda do trabalho de Peter Keating e Alberto Cambrosio (cf. Keating & Cambrosio, 2003). Na secção seguinte analisar-se-á de que modo estes trabalhos poderão proporcionar aqui importantes ferramentas de estudo.

2.2.2. Escalas, “sistemas experimentais” e “plataformas biomédicas” (ou por que importam as questões de escala)

A natureza multi-escalar dos seres vivos tem implicações no modo como estes são estudados e no conhecimento que vai sendo produzido a seu respeito. Procurou mostrar-se no início deste capítulo que as questões de escala são centrais na compreensão desses sistemas. Terá ficado claro que as perguntas que se colocam nesse sentido suscitam muito debate no âmbito do estudo da dinâmica das ciências da vida e biomedicina e que a discussão se faz mesmo dentro destas áreas. No estudo experimental dos sistemas vivos é muitas vezes necessário dividir um todo em diferentes partes para procurar compreender de novo esse todo. E há, como vimos, uma série de dificuldades nesse processo. De que forma/s se poderão abordar estas questões numa perspectiva de melhor compreender a dinâmica de produção de conhecimento?

Começemos pela noção de “sistema experimental” que é explorada por Hans-Jörg Rheinberger, um bem conhecido historiador da biologia, em *“Toward a History of Epistemic Things: Synthesizing Proteins in the Test Tube”* (1997). Para Rheinberger, sistemas experimentais são arranjos que incluem todas as condições necessárias para um processo de pesquisa na sua globalidade, representando assim as realizações sociais mais básicas da actividade científica ou, por outras palavras, constituindo a unidade central de análise se quisermos perceber como se desenvolve. E valerá a pena citar por extenso o excerto de um texto onde, em co-autoria com Michael Hagner (Hagner & Rheinberger, 1998), faz referência a essa indivisibilidade de um sistema experimental:

Sistemas experimentais são arranjos híbridos: num padrão que é permanentemente flutuante e variável, misturam elementos que muitos historiadores e filósofos da ciência, e às vezes até mesmo cientistas [...] pretenderiam ter devidamente separado. Este desejo de separação deriva de uma visão de pureza que não tem correspondente no processo de construção da ciência. (Hagner & Rheinberger, 1998: 359)

Os sistemas experimentais permitem entender a dinâmica de produção de conhecimento científico verificando-se nesse âmbito que sistemas experimentais particulares contribuíram para a definição de disciplinas científicas ou para a alteração de fronteiras disciplinares. A ênfase neste tipo de dispositivo está também bem presente no trabalho desenvolvido por outros académicos. Tinha sido já disso exemplo a investigação de Robert Kohler (1994) sobre a mosca da fruta e os trabalhos de genética realizados nesse modelo experimental. São ainda exemplo os trabalhos de Peter Galison (1997) sobre a microfísica, o trabalho etnográfico de Karin Knorr Cetina (1999) sobre as designadas culturas epistémicas, ou ainda o estudo do vírus do mosaico do tabaco como modelo experimental levado a cabo por Angela A. N. Creager (2002).

Será importante examinar mais de perto o trabalho de Rheinberger e especificamente o livro já referido (1997). Em *“Toward a History of Epistemic Things”*, o autor apresenta a sua visão relativamente àquilo que os experimentalistas (do século XX) referem como os seus “sistemas experimentais” e trata a dinâmica do processo de investigação como emergência de “coisas epistémicas” (*“epistemic things”*). O livro inclui um estudo de caso (relativo à investigação da síntese de proteínas *in vitro*), estando organizado como uma narrativa de desenvolvimentos da bioquímica no período pós Segunda Grande Guerra Mundial que alterna com uma análise de questões epistemológicas e históricas relacionadas. Importa que referir desde já que tem em conta uma analogia clara entre ciência e escrita e explorando uma outra, entre grafemas – unidades básicas da linguagem – e sistemas experimentais. Os produtos primários dos arranjos experimentais são marcas (*traces*), sendo nesse sentido que se entende a actividade científica como escrita.

Enquanto unidades básicas do processo de investigação, os sistemas experimentais tornam possível a produção de coisas epistémicas e também de “objectos técnicos” (*“technical objects”*) que derivam de uma estabilização dos anteriores. Os sistemas experimentais devem ser capazes de reprodução diferencial, apresentando-se assim como “geradores de surpresas. Por outro lado,

há que notar que o significado dos sistemas experimentais surge dentro de espaços de representação – os cientistas pensam dentro de espaços de representação –, onde grafemas são produzidos e articulados. Grafemas e espaços de representação não existem de forma independente; antes, são construídos mutuamente. Finalmente, tem-se que “os sistemas experimentais surgem em populações de múltiplas variantes que habitam áreas de investigação que se sobrepõem” (ibidem: 133). O autor considera que os conceitos de conjuntura, híbrido e bifurcação, juntamente com os correspondentes modos de evoluir (deriva, fusão e divergência), permitem conceber uma rede experimental articulada de sistemas experimentais; e claro que se pode ir mais além, mudar de nível e falar de ligações entre conjuntos de sistemas experimentais e, assim, de culturas experimentais. A dinâmica das ciências da vida, objecto do estudo de Rheinberger, acaba por ser resultado deste tipo de processos.

A estabilização e crescente fiabilidade de uma série de sistemas experimentais no campo das ciências da vida permitiu a sua apropriação em contextos para além do dos laboratórios de investigação. Na análise que fazem da biomedicina, Peter Keating, historiador da ciência, e Alberto Cambrosio, sociólogo da ciência e tecnologia, recorrem à noção de sistema experimental de Rheinberger, mas notam que os sistemas experimentais não cobrem toda a gama de práticas médicas que vão desde a clínica ao laboratório de investigação (Keating & Cambrosio, 2003). Keating e Cambrosio exploram esta dinâmica a partir do caso da imunofenotipagem e, nesse sentido, propõem a noção de “plataforma biomédica” (ibidem). Plataformas biomédicas são definidas como arranjos materiais e discursivos (ou configurações de instrumentos e programas) que actuam como bancada sobre a qual convenções relativas ao biológico (ou normal) se ligam a convenções relativas ao médico (ou patológico), sendo que a génese de cada plataforma assenta na produção e estabilização de novos objectos e procedimentos no seio de um dado sistema experimental. Na proposta destes autores a biomedicina emergiu em resultado de uma nova maneira de conduzir investigação em biologia e medicina, caracterizada por uma patologia alinhada (não fundida) com o estudo do normal havendo um espaço de representação relacionado. Aí, as entidades biomédicas existem enquanto entidades biológicas normais e sinais patológicos.

O conceito de plataforma biomédica afasta-se do de sistema experimental sobretudo na ênfase que incorpora nos aspectos de regulação. E toca a noção de

rede (e de actor-rede), mas apresenta-se distinto – as plataformas geram redes, sendo no mínimo a condição a condição da sua existência e transformação.

Na análise de Keating e Cambrosio, cada plataforma biomédica – que é, em concreto, uma “combinação específica de técnicas, instrumentos, reagentes, capacidades, entidades constituintes (morfologias, marcadores celulares de superfície, genes), espaços de representação, diagnóstico, prognóstico e indicações terapêuticas [...]” (ibidem: 4) – apresenta uma ligação privilegiada com uma dada escala ou nível e, assim, este conceito revela-se promissor no estudo de questões de escala.

Será pois importante explorar a relação entre sistemas experimentais e plataformas biomédicas para compreender a dinâmica da produção de novos conhecimentos e novos objectos nas ciências da vida e da sua apropriação em contextos biomédicos. O projecto de investigação que aqui se reporta incidiu, precisamente, sobre essa dinâmica em relação com um objecto particular, o eritrócito, e com um problema específico, o do envelhecimento eritrocitário. Mais propriamente, o projecto incidiu sobre essa dinâmica em relação com um objecto particular, o eritrócito em envelhecimento.

PARTE II
ESCALAS NOS ESTUDOS DO ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO

Capítulo 3. Para uma Panorâmica dos Estudos do Envelhecimento do Eritrócito

Tão subtilmente conduzida é a destruição normal do sangue e o descarte dos restos das células que, não fosse a evidência indirecta, poderia supor-se que a vida da maioria dos eritrócitos duraria tanto como a do corpo.

– Rous, 1923: 75

Como pode mapear-se o campo dos estudos do envelhecimento eritrocitário? O estudo da destruição de eritrócitos no sangue, que decorre subtilmente como a descreve Peyton Rous pelo início do século XX, passou a certa altura a ser também o estudo do envelhecimento destas células. Interessa por agora seguir a investigação realizada a partir de então, isto é, considerando o problema do envelhecimento eritrocitário já bem definido com a evidência de que a remoção de células de circulação se faz por idade. Vários investigadores referem, pelo final do século, que a questão permanece em aberto e importa perceber as linhas de investigação seguidas e o modo como evoluíram estes estudos. Será útil começar por tentar uma melhor ideia do enquadramento biológico do problema.

3.1. O cenário biológico: eritrócitos e envelhecimento eritrocitário

É bem conhecido (cf. Beutler *et al.*, 2001) que os eritrócitos constituem a população mais abundante de células do sangue humano – ou mais genericamente do sangue dos vertebrados –, tendo como função essencial o transporte de oxigénio e de dióxido de carbono entre os pulmões e os diferentes órgãos (e tecidos) no corpo. Na verdade, para além desse papel em trocas gasosas, ao eritrócito estão associadas outras funções importantes como é o caso da regulação da acidez/basicidade do sangue.

Observados pela primeira vez ao microscópio por Jan Swammerdam na segunda metade do século XVII, os eritrócitos foram descritos ainda nesse período, alguns anos mais tarde, por Antonie van Leeuwenhoek (Hajdu, 2003; Mohandas & Gallagher, 2008). A forma dos eritrócitos humanos desde cedo intrigou os investigadores, logo que se tornou possível a sua observação com uma maior

ampliação como é referido com frequência na literatura. A figura 3.1 apresenta eritrócitos humanos, na sua aparência discóide, numa imagem de microscopia electrónica de varrimento.

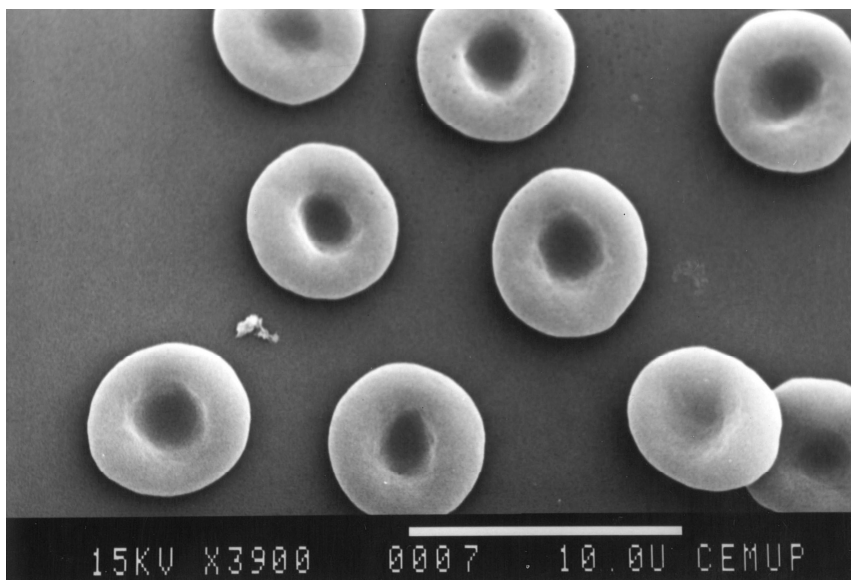


Figura 3.1. Eritrócitos humanos por microscopia electrónica de varrimento. [Fonte: trabalho não publicado da autora com recurso ao serviço do CEMUP.]

O facto de que o eritrócito apresenta “normalmente” a forma de disco bicôncavo é amplamente conhecido. Na verdade, a célula é altamente pleomórfica, sendo numerosas as formas que pode assumir numa variedade de circunstâncias: a forma depende, por exemplo, do ambiente onde a célula se encontra, do seu estado metabólico e da sua idade (cf. Beutler *et al.*, 2001). A partir de meados do século XX, vários investigadores realizaram muito trabalho de visualização e caracterização ultra-estrutural de eritrócitos com recurso a diferentes técnicas de microscopia; salienta-se o caso de Marcel Bessis (cf. 1973 [1972]), sendo extenso o seu trabalho com microscopia electrónica de varrimento; específica e explicitamente em relação ao caso do envelhecimento de eritrócitos, deve mencionar-se ainda o trabalho de David Danon e Yehuda Marikovsky (cf. Marikovsky & Danon, 1969). A relevância de práticas de visualização nos estudos do processo de envelhecimento eritrocitário, a que voltaremos ainda nesta panorâmica do campo de estudos, será explorada em capítulos posteriores (veja-se o Capítulo 6 e o Capítulo 8). Por agora, interessa apenas observar que, com um diâmetro característico de aproximadamente $7,2\mu\text{m}$, a forma de disco bicôncavo que o eritrócito humano

apresenta na saúde e em condição normal eritrócito se traduz, em comparação com a forma esférica, num aumento de 20-30% da área de superfície exterior, sendo frequentemente descrita como relacionada com a sua função de transportador de oxigénio, ou seja, otimizada para uma tal função (Young *et al.*, 2006).

Importa ver com mais cuidado essa função de transportador de substâncias numa rede vascular. A necessidade de um sistema de transporte de oxigénio em organismos aeróbios multicelulares define o lugar dos eritrócitos na história natural: a evolução do transporte de oxigénio, a partir da simples dissolução em meio aquoso – que é limitada por uma solubilidade reduzida desta substância em água –, avançando para a utilização de proteínas transportadoras – como é o caso da hemoglobina – e terminando na compartimentação eritrocitária, trouxe mecanismos mais eficientes de oxigenação, e assim a possibilidade de aumento do tamanho de organismos vivos, em parte pela oportunidade de um diferente ambiente físico-químico no meio intracelular, mas também pela simplicidade estrutural destas células (Glomski & Tamburlin, 1989).

A estrutura, bem como o tamanho, dos eritrócitos difere substancialmente em organismos diferentes; apenas as células dos mamíferos são enucleadas (cf. Smith, 1991). No caso do eritrócitos humanos, nos quais a hemoglobina representa aproximadamente um terço do conteúdo celular (cf. Beutler *et al.*, 2001), a membrana plasmática limita um meio onde não existem organelos nem qualquer tipo de rede transcelular. Estas células são ainda desprovidas de um aparelho genético e de síntese proteica capaz de assegurar reparações e continuidade. Mas, aquilo que pode ser considerado um aspecto surpreendente e anómalo – recorde-se a esta altura que a interrogação sobre se o eritrócito “é ou não vivo” está presente na conversa de Mr. Tompkins, personagem de Gamow, citada atrás (veja-se o Capítulo 2) – passa a ser melhor entendido quando se muda de escala e os eritrócitos são olhados como de parte de um conjunto celular mais vasto – colectivamente os eritrócitos circulantes e as suas células progenitoras têm sido designadas por eritrão (Beutler *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006) –, geralmente descrito como funcionando como um órgão.

A compreensão do modo como o organismo mantém um fornecimento adequado de oxigénio aos tecidos depende da compreensão do processo de produção de eritrócitos – genericamente designado por eritropoiese (cf. Beutler *et al.*, 2001) – e do modo como esse processo é regulado. Importa a esse respeito entender ainda o envelhecimento eritrocitário, bem como o mecanismo de reconhecimento e

remoção selectiva de células velhas (danificadas e funcionalmente comprometidas) que se verifica ocorrer em humanos. A questão da remoção de circulação do eritrócito humano por idade foi bem demonstrada por meados do século XX por Shemin e Rittenberg (1946) com recurso a marcação isotópica com ^{15}N . Este resultado está associado à determinação do tempo de vida do eritrócito – entende-se hoje que na saúde e em condição normal, o eritrócito humano apresenta um tempo de vida de aproximadamente 120 dias (cf. Beutler *et al.*, 2001) – e em certo sentido representa a emergência do problema do envelhecimento eritrocitário; o estudo de Shemin e Rittenberg é nesse âmbito central ao propósito desta tese e será considerado em maior detalhe adiante (veja-se o Capítulo 4).

Claro está que interessa estudar o envelhecimento eritrocitário para conhecer o fenómeno em si, a sua biologia. Mas estes estudos ultrapassam esse interesse. Com efeito, há que acrescentar que muitos trabalhos dirigidos para a determinação do tempo de vida do eritrócito humano, e que vinham a ser conduzidos já pelo início do século XX, surgem ligados ao interesse em conhecer melhor a base de anemias hemolíticas e práticas médicas relacionadas (Dacie, 2001). Nestes casos, o desaparecimento de células de circulação não seguirá normalmente. Como se analisará então, o referido trabalho de Shemin e Rittenberg trata apenas do caso normal em humanos e essencialmente pretende a aplicação de uma nova metodologia no esclarecimento de uma questão ainda não resolvida; a pergunta em aberto colocava-se nesse contexto da clínica onde conhecer a respeito das anemias hemolíticas era uma preocupação bem presente. O problema do envelhecimento eritrocitário não é só biológico, sendo saliente o facto de que a sua emergência surge de algum modo ligada ao mundo da clínica e onde de resto o problema se desdobra em várias vertentes (veja-se o Capítulo 4). Essa circunstância, confere a estes trabalhos um interesse adicional, dirigindo a atenção para aspectos como a mobilidade do conhecimento, o seu deslocamento e apropriação num âmbito diferente como se explorará então mais tarde.

3.2. Diferentes escalas de observação

Durante a sua permanência em circulação, os eritrócitos sofrem então um processo de envelhecimento que resulta no reconhecimento de células velhas e sua remoção específica de circulação – em condição normal, as células são removidas por idade e não por um processo aleatório; como se referiu anteriormente, a evidência experimental apontava nesse sentido no caso do humano e em condição normal.

Num artigo de revisão publicado no início da década de noventa na revista *Gerontology* (Bartosz, 1991), resumem-se assim as questões em torno do problema do envelhecimento eritrocitário:

Há duas questões fundamentais fascinantes nos estudos do envelhecimento eritrocitário. Uma, ao nível molecular, consiste no decifrar dos processos moleculares responsáveis pelo envelhecimento celular. A segunda, ao nível celular, é a elucidação dos mecanismos de reconhecimento e remoção específica dos eritrócitos senescentes, e talvez de outras células para além dos eritrócitos, da circulação. Esta é uma questão importante da homeostasia celular no organismo. (Bartosz, 1991: 34)

A questão apresenta-se pois multi-escalar. O estudo do envelhecimento do eritrócito tinha vindo a ser realizado em diferentes escalas, sendo equacionado que o problema só ficaria resolvido nessas diferentes vertentes. A natureza multi-escalar do fenómeno de envelhecimento destas células diz respeito tanto à dimensão do comprimento como à do tempo e reflecte uma característica dos sistemas vivos. Estes são funcional e estruturalmente concebidos em múltiplos e simultâneos níveis de organização. Interessa assim olhar esse objecto – o “eritrócito em envelhecimento” – e o modo como se tornou uma entidade biomédica em relação com diferentes escalas espaciais e temporais.

3.2.1. Escalas de comprimento e de tempo

Uma breve revisão da literatura especializada mostra que o estudo das alterações que ocorrem durante o tempo de vida do eritrócito humano – incluindo parâmetros físicos do citoplasma, como a microviscosidade intracelular mencionada anteriormente (veja-se o Capítulo 1), ou da membrana plasmática, como a mobilidade de proteínas (cf. Karon *et al.*, 2009) –, assim como o estudo da renovação da população circulante levou ao estudo do processo de envelhecimento desta célula em indivíduos idosos. O diagrama da figura 3.2 ilustra diferentes escalas de comprimento e de tempo implicadas na investigação em torno do problema do envelhecimento eritrocitário. Nesse diagrama – que é de resto uma sistematização fundamental do estudo de sistemas vivos (cf. Hunter & Borg, 2003) – pode ver-se que a gama de escalas varre quinze ordens de grandeza no que diz respeito ao tempo e nove ordens de grandeza no que diz respeito ao comprimento.

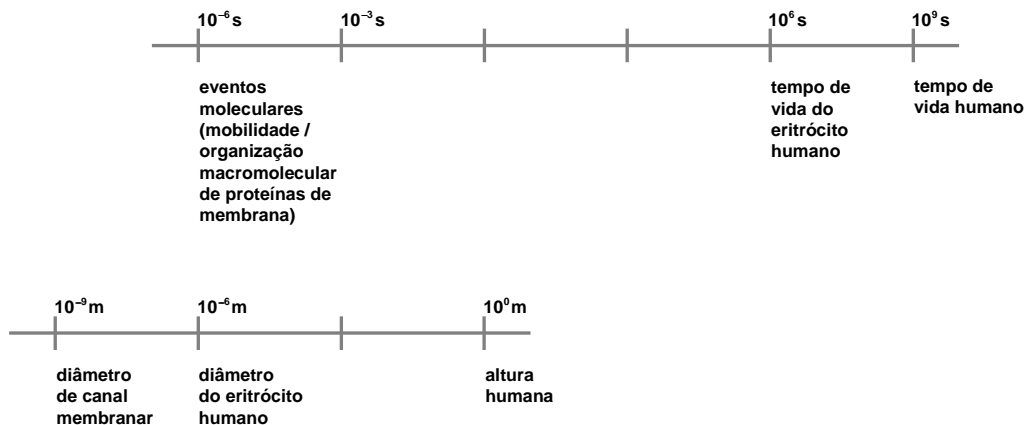


Figura 3.2. Escalas temporais e espaciais implicadas no estudo do eritrócito e envelhecimento eritrocitário (representação logarítmica).

A referência às escalas anteriores é directa. Mas, para perceber o problema em todas as suas dimensões há que acrescentar outros níveis de análise – quando se consideram questões de regulação, por exemplo, como no caso do armazenamento de células para transfusão, e se torna importante ultrapassar o nível do indivíduo.

3.2.2. Do envelhecimento do eritrócito ao envelhecimento do eritrócito em indivíduos idosos ao envelhecimento do indivíduo

Compreender o envelhecimento dos eritrócitos em indivíduos idosos, mas também estudar o envelhecimento destas células para ter informação a respeito do envelhecimento do indivíduo são dois desafios importantes. Este último, subjacente a alguns trabalhos de investigação que foram levados a cabo, encontra-se perfeitamente inserido na argumentação a que recorrem os investigadores para justificar e perspectivar o seu trabalho. O eritrócito como modelo experimental em estudos do envelhecimento é, na verdade, uma marca importante da década de oitenta, altura em que eritrócito de mamíferos surgia como um modelo privilegiado nesse âmbito. Mais adiante (veja-se o Capítulo 5), explorar-se-á detalhadamente o caso do modelo eritrocitário em biogerontologia; alguns aspectos parecem relevantes para esta panorâmica dos estudos relacionados com o envelhecimento eritrocitário pelo que exemplifica desde já.

Num texto dessa altura, G. Allison Glass e David Gershon (1984) notam que as actividades de observação e compilação de alterações fisiológicas e bioquímicas que acompanham o envelhecimento dos indivíduos vinham sendo um objectivo

primordial da gerontologia experimental. Particularmente, para estes investigadores, seria útil a medição da actividade de várias enzimas em diferentes tecidos e o eritrócito, por ter um tempo de vida bem definido em conjunto com a sua incapacidade de síntese proteica e escassa actividade proteolítica, revelava-se um modelo valioso. Estudaram assim o efeito da idade das células e do dador relativamente a enzimas do sistema antioxidante em eritrócitos. Basicamente, os resultados que apresentam – na ratazana – mostram não só que a protecção enzimática diminui com a idade das células mas também que para indivíduos mais velhos, essas alterações acontecem mais cedo.

A questão da relação entre envelhecimento celular, perda de homeostasia e o envelhecimento do indivíduo é uma questão importante. Joseph M. Rifkind e colaboradores (1985) afirmam a possibilidade de se estudar o efeito da idade do dador no envelhecimento do eritrócito como uma dimensão negligenciada do recurso ao eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento. Para estes investigadores:

Embora um dador de oitenta anos não tenha eritrócitos de oitenta anos, os eritrócitos neste indivíduo foram produzidos por um sistema eritropoiético de oitenta anos, circulam num meio de oitenta anos com um ambiente plasmático envelhecido e um sistema circulatório envelhecido. (Rifkind et al., 1984: 159)

A ideia de que a eliminação biológica dos eritrócitos velhos pode ser alterada com o avanço da idade dos indivíduos permanece um tema explorado em anos mais recentes. Com efeito, vários grupos conduziram investigação nesse sentido: determinar o perfil de idades da população eritrocitária circulante em indivíduos de idade avançada (Pinkofsky, 1997) ou estudar a interacção entre monócitos e diferentes tipos de suspensões de eritrócitos para melhor perceber a remoção de eritrócitos senescentes em indivíduos jovens e idosos (Biondi et al., 2003) são exemplos.

3.3. Um retrato bibliométrico¹⁰

Não só são múltiplas as escalas a que foram levados a cabo os estudos do envelhecimento eritrocitário como são diversas as áreas disciplinares neles

¹⁰ Os detalhes metodológicos da análise são descritos separadamente no Anexo “Análise Bibliométrica – Métodos”. Optou-se por esta estrutura para uma melhor leitura do texto, tendo-se incluído no presente capítulo apenas a informação que se entendeu necessária para a sua compreensão.

envolvidas. Estes dados não serão, de facto, independentes. O estudo do tempo de vida do eritrócito mobilizou, desde o início do século XX, investigadores de áreas diversas incluindo investigação de âmbito fundamental e clínico. Valerá a pena olhar mais atentamente para o modo como se desenvolveram esses estudos e, mais especificamente, como evoluiu o caso da investigação focada no envelhecimento da célula. Como se apresentou anteriormente (veja-se o Capítulo 2), a bibliometria pode ser uma ferramenta valiosa para um melhor conhecimento a respeito desta dinâmica. O que se segue resulta de uma análise da literatura publicada em torno do fenómeno do envelhecimento eritrocitário, conforme esta se encontra representada em duas bases de dados bibliográficas consideradas representativas – a PubMed¹¹ (PM) e a *Web of Science*¹² (WoS). A PM, não sendo a fonte de dados bibliográficos mais utilizada em estudos bibliométricos, tem uma utilização alargada entre os investigadores na área das ciências da vida e da biomedicina. Daí a escolha da sua inclusão como fonte, explorando a ideia de uma descrição do campo próxima da percepção pelos próprios investigadores da área. O recurso à WoS tem aqui um interesse complementar para o conhecimento da dinâmica da área – esta base de dados contém informação relevante para a análise e que não é disponível na PM como as referências citadas nos documentos. É importante sublinhar desde já que o recurso às duas bases de dados teve em mente apenas a possibilidade de uma leitura mais completa do campo, procurando aproveitar vantagens de cada uma.

Na PM a pesquisa foi feita para a expressão “*erythrocyte aging*” (em *All Fields*) aproveitando assim a indexação de artigos pelo vocabulário MeSH¹³ desta base de dados; note-se que a expressão¹⁴ faz parte desse léxico desde 1967, tendo sido indexadas referências até 1965. No caso da WoS, a pesquisa considerou apenas os dados do *Science Citation Index Expanded*. Não havendo nesta base de dados o mesmo sistema de indexação, foi necessário recorrer a uma expressão de pesquisa

¹¹ A PubMed é a versão on-line de acesso livre da base de dados MEDLINE e encontra-se disponível no endereço www.pubmed.org [conforme acesso em Junho de 2012].

¹² A *Web of Science*, da Thomson Reuters, é uma das bases de dados incluídas na Web of Knowledge, estando disponível no endereço apps.webofknowledge.com [conforme acesso em Junho de 2012].

¹³ MeSH, *Medical Subject Headings*, é o léxico de vocabulário controlado da *National Library of Medicine*, disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh [conforme acesso em Junho de 2012].

¹⁴ A descrição de “envelhecimento eritrocitário” no léxico MeSH: “A senescência dos ERITRÓCITOS [RED BLOOD CELLS]. Desprovido de organelos que tornam possível a síntese proteica, o eritrócito maduro é incapaz de auto-reparação, reprodução, e de levar a cabo algumas funções que as outras células executam. Isto limita o tempo de vida médio de um eritrócito a 120 dias” [www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh, conforme acesso em Junho de 2012].

mais complexa tendo em conta modos usuais de referir o processo; consideraram-se diferentes variantes (pesquisadas em *Topic* e completamente discriminadas no Anexo), como por exemplo na designação da célula – “*erythrocyte*”, “*red blood cell*” ou “*red cell*” – ou do processo observado – “*aging*” ou “*senescence*”. Em ambos os casos, PM e WoS, limitou-se a pesquisa a uma data de publicação até ao final do ano 2011.

A pesquisa resultou em amostras de 3708 referências, no caso da PM, e de 1913, no caso da WoS, relativas a documentos publicados até ao final de 2011 (depois de removidos duplicados e algumas referências efectivamente de 2012 mas publicadas online ainda em 2011). Seguindo procedimentos correntes da bibliometria (para detalhes acerca dos procedimentos veja-se o Anexo), estudaram-se diferentes indicadores. Vejamos então.

3.3.1. Sobre crescimento do campo de investigação

Para uma caracterização do desenvolvimento da investigação em torno do problema do envelhecimento eritrocitário, exploraram-se referências incluídas nas duas bases de dados bibliográficos já referidas; olhou-se o número de documentos publicados (e citados), bem como número de publicações de diferentes autores e revistas. Antes de entrar em detalhes, podem referir-se alguns dados genéricos sobre as publicações. Primeiro, uma nota sobre a língua em que estão escritos os textos: como seria de esperar a grande maioria dos documentos está em inglês mas há que notar, no caso dos dados PM¹⁵, uma fracção relativamente elevada noutras línguas – cerca de 20%. Depois, alguma informação sobre o tipo de documento. Esta informação está apenas disponível no caso dos dados WoS, sendo que a amostra contém referências relativas a diferentes tipos de documento incluindo artigos (75,9%), resumos de reuniões (13,7%), revisões (5,4%), notas (1,9%), cartas (1,7%), material editorial (1,3%), reimpressões (0,1%) e correcções ou adições (0,1%).

¹⁵ A análise tem algum significado apenas relativamente aos dados PM uma vez que a pesquisa considerou a expressão “*erythrocyte aging*” como termo MeSH; relativamente aos dados WoS, e tendo em conta o modo como foi feita a pesquisa, o número de documentos noutras línguas é naturalmente residual. De resto, pode notar-se que o número relativamente elevado de documentos noutras línguas justifica em parte a diferença no número de referências incluídas nas duas amostras, PM e WoS.

Número de documentos

A evolução temporal do número de publicações proporciona um modo simples de entrar no estudo da dinâmica de investigação num dado campo. O gráfico da figura 3.3 mostra o crescimento do número de documentos publicados até 2011 para os dados PM e WoS, considerando tanto o número anual como o número cumulativo.

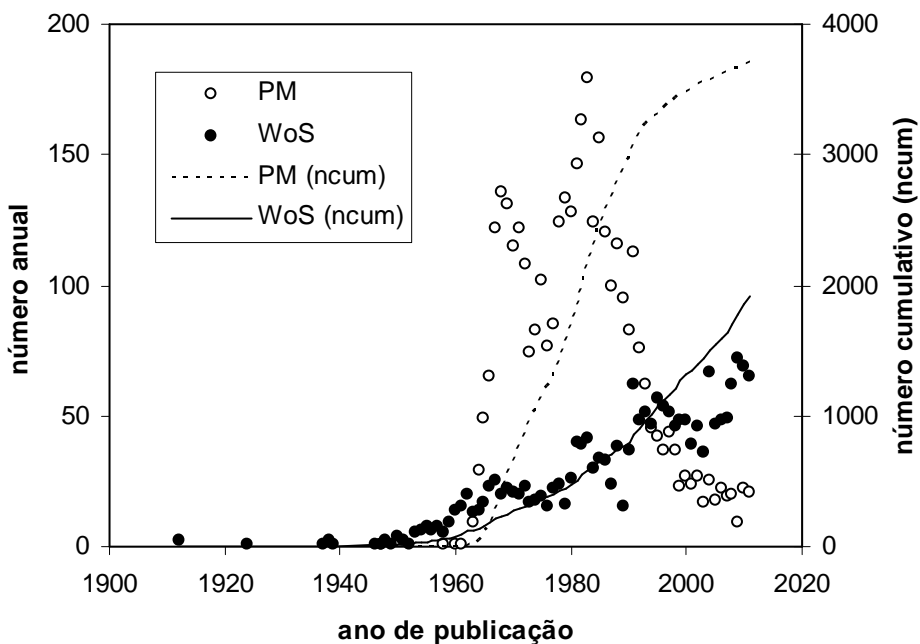


Figura 3.3. Evolução temporal do número anual de artigos sobre envelhecimento eritrocitário, dados PM e WoS. [Dados: PM, 25.Maio.2012; WoS, 3.Junho.2012.]

São notórias diferenças entre os dados PM e WoS, em parte resultantes de características de cada uma das duas bases de dados e principalmente a nível de indexação de documentos; por exemplo, nos dados WoS, pela inclusão dos termos KeyWord Plus®, baseados nos títulos das referências citadas nos documentos, será expectável que se prolongue o aparente interesse num dado tópico mesmo quando ele é reconfigurado. De qualquer modo, em ambos os casos é claro o aumento do crescimento do número anual de documentos publicados por meados da década de setenta, sendo esse um dado a que se voltará no decurso desta análise bibliométrica.

É oportuno fazer uma breve nota sobre o caso destes estudos em relação com o da investigação acerca do envelhecimento celular. Os dados PM analisados resultantes da pesquisa por “cell aging” (resultados não mostrados) indicam

naturalmente uma diferença na dimensão do campo avaliada pelo número total de artigos publicados; mas estes dados mostram ainda que o aumento anual do número de documentos cresce acentuadamente no caso do envelhecimento celular e em contraste com o que os dados na mesma base de dados mostram no caso do envelhecimento eritrocitário.

Autores

Uma primeira análise dos dados indica o envolvimento de 8161 autores (considerando os seus nomes tal como surgem na base de dados), no caso dos dados WoS, e de 5932, no caso PM; depois de uma verificação cuidada incluindo a normalização de alguns nomes foram identificados os autores com mais de 6 documentos publicados, caso PM, ou 5 documentos, caso WoS. A tabela 3.1 mostra os autores mais produtivos, nos dados PM e WoS.

Pode observar-se uma grande sobreposição de resultados. Uma diferença importante deve contudo ser comentada – o autor mais produtivo segundo os dados PM, Valeri, com um número elevado de publicações no âmbito da transfusão e preservação de células em banco de sangue – não surge em lugar destacado nos dados WoS analisados. Mais uma vez, esta diferença estará relacionada com as diferentes características da pesquisa efectuada nas duas bases de dados e mostra uma diferente cobertura desse tópico nos dados analisados.

Revistas

Os 3708 documentos nos dados PM foram publicados em 892 revistas; no caso dos dados WoS, os 1913 documentos foram publicados em 609 revistas. Na tabela 3.2 encontram-se as revistas nas primeiras posições em termos do número de documentos representados nos dados analisados.

Há nestes dados uma indicação das áreas cobertas pelos estudos do envelhecimento eritrocitário. Para esta análise, é útil classificação de áreas temáticas da WoS. Tendo em conta essa classificação, surge clara a proeminência da área de hematologia e ainda da de bioquímica e biologia molecular; as revistas dedicadas especificamente à temática do envelhecimento – área de geriatria e gerontologia – surgem menos destacadas, com um menor número de documentos.

Tabela 3.1. Autores mais produtivos na investigação sobre envelhecimento eritrocitário de acordo com o número de documentos publicados (n), dados PM e WoS. Estão incluídos os autores que contam um número de documentos publicados no tema de pelo menos 12, caso PM, ou 9, caso WoS. [Dados: PM, 25.Mai.2012; WoS, 3.Junho.2012.]

PM		WoS	
n	nome do autor	n	nome do autor
46	Valeri, C. R.	36	Bosman, G.
35	Bartosz, G.	35	Kay, M.
33	Kay, M. M.	30	Bartosz, G.
30	Beutler, E.	19	Lutz, H.
29	Magnani, M.	16	Kikugawa, K.
27	Bosman, G.	15	Magnani, M.
25	Fornaini, G.	14	Beppu, M.
23	Danon, D.	14	Danon, D.
22	Balduini, C.	13	Aminoff, D.
22	Lutz, H.	13	Ando, K.
22	Walter, H.	13	Werre, J. M.
20	Gross, J.	13	Willekens, F.
20	Piomelli, S.	12	Garratty, G.
19	Brovelli, A.	12	Lang, F.
19	Dacha, M.	11	Balduini, C.
19	Stocchi, V.	11	Ballas, S. K.
18	Gattegno, L.	11	DeGrip, W. J.
17	Pivacek, L.	10	Bartholomeus, I. G. P.
15	Halbhuber, K. J.	10	Franco, R. S
15	Rapoport, S.	10	Koler, R D.
15	Schroter, W.	10	Marikovsky, Y.
15	Szymanski, I.	10	Meiselman, H. J.
14	Aminoff, D.	10	Piomelli, S.
14	Cazzola, M.	10	Roerdinkholder-Stoelwinder, B
14	Cornillot, P.	10	Walter, H.
14	Linss, W.	9	Biondi, C.
14	Marikovsky, Y.	9	Brovelli, A.
14	Mollison, P. L.	9	Gershon, H.
14	Oski, F. A.	9	Goodman, J.
13	Bladier, D.	9	Joiner, C.
13	Corash, L.	9	Kuypers, F. A.
13	Kikugawa, K.	9	Racca, A.
13	Mohandas, N.	9	Romero, P. J.
13	Werre, J. M.		
12	Barosi, G.		
12	Beppu, M.		
12	Krob, E. J.		

Tabela 3.2. Revistas mais produtivas sobre envelhecimento eritrocitário de acordo com o número de documentos publicados (n), dados PM e WoS. [Dados: PM, 25.Maio.2012; WoS, 3.Junho.2012.]

PM		WoS	
n	nome da revista	n	nome da revista
189	Transfusion	121	Transfusion
156	Blood	78	Blood
139	British Journal of Haematology	56	British Journal of Haematology
76	Biochimica et Biophysica Acta	32	Vox Sanguinis
69	Vox Sanguinis	31	Journal of Laboratory and Clinical Medicine
59	Progress in Clinical and Biological Research	31	Mechanisms of Ageing and Development
48	Journal of Laboratory and Clinical Medicine	30	Blood Cells
47	Mechanisms of Ageing and Development	28	Journal of Clinical Investigation
44	Journal of Clinical Investigation	23	Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine
43	American Journal of Hematology	22	Clinical Research
42	Advances in Experimental Biology and Medicine	21	American Journal of Hematology
40	Folia Haematologica	19	Cellular and Molecular Biology
38	Acta Biologica et Medica Germanica	19	Clinica Chimica Acta
36	Clinica Chimica Acta	17	Pediatric Research
33	Journal of Biological Chemistry	16	Journal of Biological Chemistry
32	The New England Journal of Medicine	15	Federation Proceedings
30	Acta Haematologica	15	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
28	Blood Cells	14	Clinical Hemorheology and Microcirculation
28	Problemy Gematologii i Perelivaniia Krovi	14	Experimental Hematology
28	Scandinavian Journal of Haematology	14	Transfusion Clinique et Biologique
26	Annals of the New York Academy of Science	13	American Journal of Clinical Pathology
25	Biomedica Biochimica Acta	13	American Journal of Veterinary Research
24	Biochemical and Biophysical Research Communications	13	Biochimica et Biophysica Acta
24	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	12	American Journal of Physiology
22	American Journal of Veterinary Research	12	Biochemical and Biophysical Research Communications
22	Biochemical Journal	12	Biochemical Journal
22	Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine	12	European Journal of Hematology
20	American Journal of Physiology	12	Journal of Nuclear Medicine
20	Bibliotheca Haematologica	11	Blood Cells Molecules and Diseases
20	Experientia	11	Clinical Sciencec
20	Pediatric Research	11	Experientia
		11	Experimental Gerontology
		11	Nature

Documentos citados

Para os dados WoS, e de acordo com um interesse bem estabelecido em bibliometria (veja-se o Capítulo 2), fez-se ainda uma análise de documentos citados. A tabela 3.3 apresenta uma listagem das referências mais citadas nos documentos da amostra recolhida.

Tabela 3.3. Referências mais citadas nos artigos sobre envelhecimento eritrocitário, dados WoS. Inclui-se número de citações na amostra (n). [Dados: 3.Junho.2012.]

n	referência
115	KAY MMB, 1975, P NATL ACAD SCI USA, V72, P3521
92	MURPHY JR, 1973, J LAB CLIN MED, V82, P334
82	KAY MMB, 1978, J SUPRAMOL STR CELL, V9, P555
81	KAY MMB, 1984, P NATL ACAD SCI-BIOL, V81, P5753
78	KAY MMB, 1983, P NATL ACAD SCI-BIOL, V80, P1631
77	LOW PS, 1985, SCIENCE, V227, P531
75	BEUTLER E, 1976, J LAB CLIN MED, V88, P328
70	COHEN NS, 1976, BIOCHIM BIOPHYS ACTA, V419, P229
66	KAY MMB, 1981, NATURE, V289, P491
64	DODGE JT, 1963, ARCH BIOCHEM BIOPHYS, V100, P119
64	LAEMMLI UK, 1970, NATURE, V227, P680
60	DANON D, 1964, J LAB CLIN MED, V64, P668
60	LOWRY OH, 1951, J BIOL CHEM, V193, P265
58	CLARK MR, 1988, PHYSIOL REV, V68, P503
55	LUTZ HU, 1987, P NATL ACAD SCI USA, V84, P7368
53	BENNETT GD, 1981, EXP HEMATOL, V9, P297
52	KAY MMB, 1986, P NATL ACAD SCI USA, V83, P2463
52	PIOMELLI S, 1967, J LAB CLIN MED, V69, P659
52	RENNIE CM, 1979, CLIN CHIM ACTA, V98, P119
43	EBAUGH FG, 1953, J CLIN INVEST, V32, P1260
42	Bratosin D, 1998, BIOCHIMIE, V80, P173
41	BOSMAN GJCGM, 1988, BLOOD CELLS, V14, P19
41	GRAY SJ, 1950, J CLIN INVEST, V29, P1604
39	WAUGH RE, 1992, BLOOD, V79, P1351
38	SUZUKI T, 1987, BLOOD, V70, P791
37	CORASH LM, 1974, J LAB CLIN MED, V84, P147
37	Koch CG, 2008, NEW ENGL J MED, V358, P1229
37	LUTZ HU, 1992, BIOCHIM BIOPHYS ACTA, V1116, P1
37	SEAMAN C, 1980, AM J HEMATOL, V8, P31
37	TOWBIN H, 1979, P NATL ACAD SCI USA, V76, P4350

Há que notar que o texto que ocorre com maior frequência nestas referências é o artigo de Kay de 1975. Valerá a pena reler agora o gráfico da figura 3.3 e notar o que pode ter sido a influência desta publicação no aumento do número anual de publicações, tanto no caso PM como no caso WoS, que se verifica após 1975. Encontram-se nestas primeiras posições documentos importantes na abordagem experimental do envelhecimento eritrocitário, como é o caso dos artigos de Murphy, Piomelli, Rennie ou Corash no âmbito da separação de células por densidade. Será ainda interessante salientar a inclusão de artigos referentes a métodos fundamentais nas ciências da vida: o artigo de Lowry que apresenta um método de doseamento de proteínas totais; o artigo de Laemmli, que se refere à caracterização de perfis proteicos por electroforese em gel.

3.3.2. Explorando redes

Para além do crescimento da área avaliado por indicadores de produtividade, para uma melhor compreensão da dinâmica destes estudos, interessou olhar indicadores relacionais. Exploram-se assim redes de co-autorias, redes de co-citação e ainda, a nível de conceitos envolvidos, redes de co-ocorrência de palavras.

Mapa de co-autorias

Os mapas da figura 3.4 mostram a rede de co-autorias, tendo por base os autores que publicaram pelo menos 6 artigos, no caso dos dados PM, ou 5, no caso WoS. Olhando para o mapa de co-autorias referente à PM, pode referir-se uma extensa colaboração entre grupos; de algum modo, houve colaboração entre autores mais produtivos. A este facto não será alheia a realização de várias iniciativas dedicadas especificamente à discussão do problema do envelhecimento eritrocitário e ainda ao recurso ao eritrócito de mamíferos em estudos do envelhecimento. Adiante (veja-se o Capítulo 5) ficará claro que estes autores constituíam o grupo empenhado em explorar a utilidade do eritrócito como modelo neste tipo de trabalho.

No mapa de co-autorias referente à WoS, essa característica é menos notória, mas perceptível. Aqui, importa-me sobre notar a presença de autores do grupo da U.Porto de que falo no Capítulo 1 e que se orientou para aspectos no âmbito das ciências farmacêuticas.

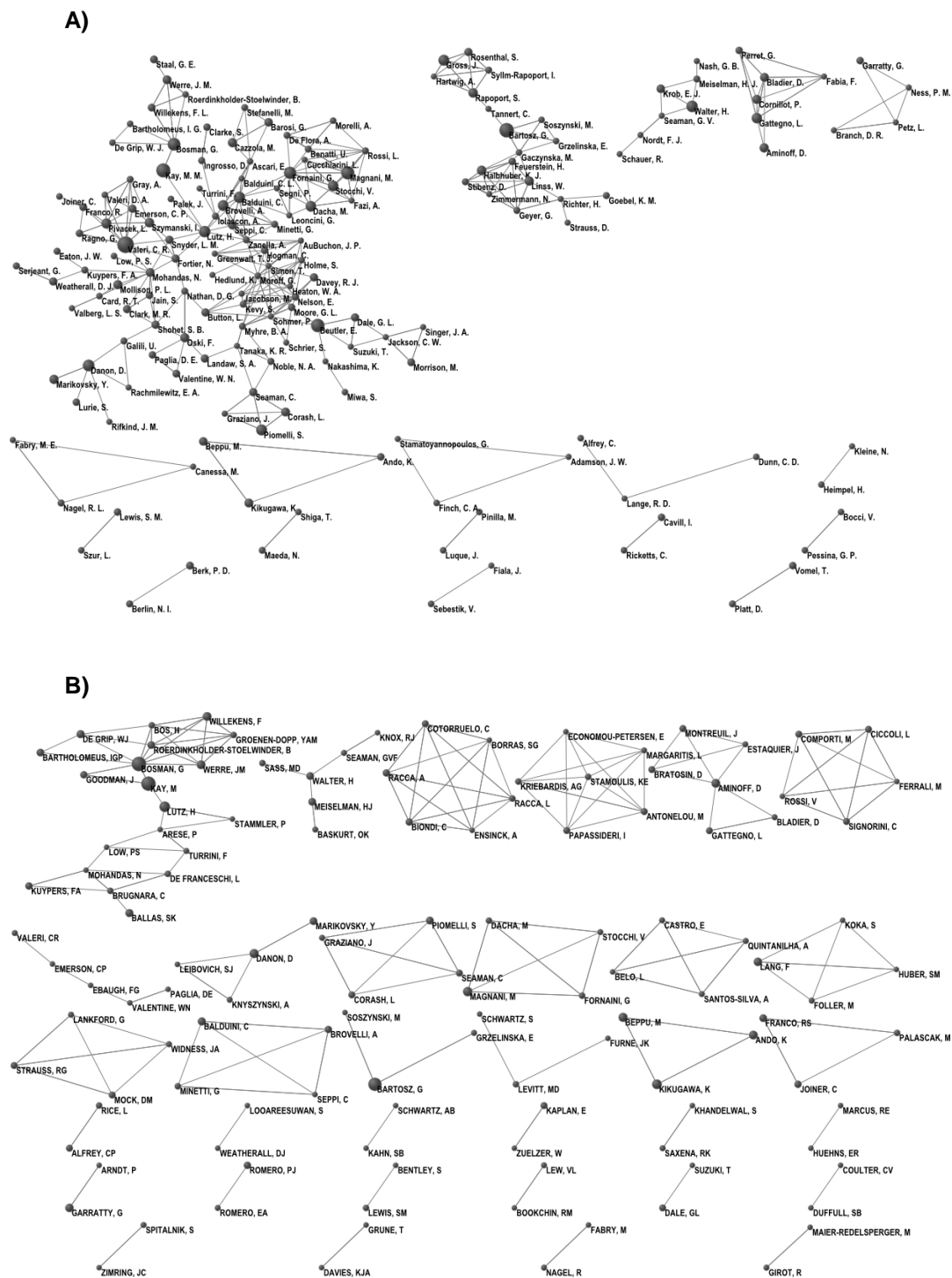


Figura 3.4. Rede de co-autorias na investigação sobre envelhecimento eritrocitário. A) Dados PM, considerando os autores com um número de publicações igual ou superior a 6; B) dados WoS, considerando os autores com um número de publicações igual ou superior a 5. O tamanho dos vértices no mapa é proporcional ao número de publicações de cada autor. [Dados: PM, 25.Mai.2012; WoS, 3.Junho.2012.]

Mapa de co-citações

Na figura 3.5 apresenta-se um mapa de co-citações artigo-artigo em que se consideraram as referências citadas com frequência igual ou superior a 20.

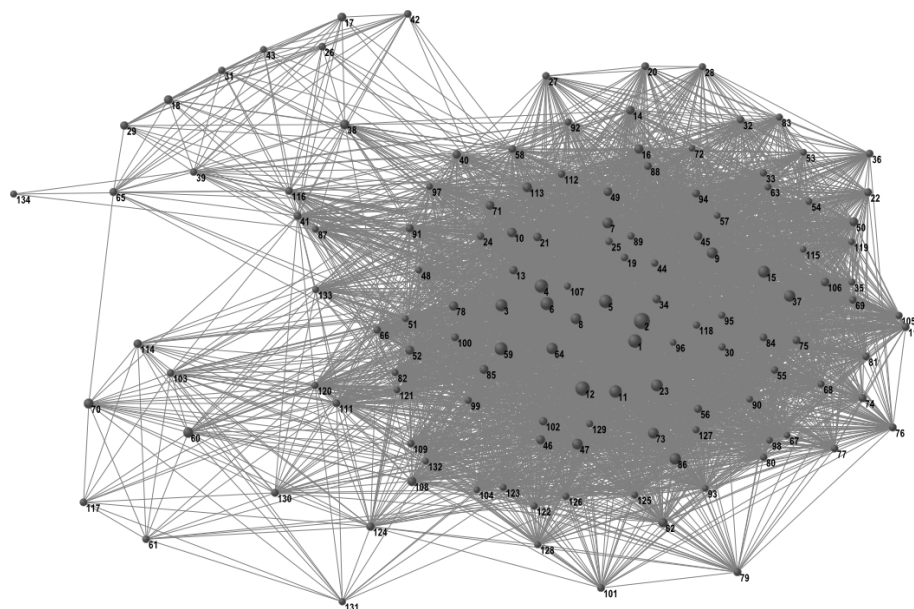


Figura 3.5. Mapa de co-citações artigo-artigo, dados WoS. Para a visualização foram consideradas as referências citadas com 20 ocorrências ou mais. O tamanho dos vértices é proporcional à frequência de citação de cada artigo. [Dados: 3.Junho.2012.]

[1, Kay MMB, 1978, J Supramol Str Cell, V9, P555; 2, KAY MMB, 1975, P Natl Acad Sci USA, V72, P3521; 3, Kay MMB, 1981, Nature, V289, P491; 4, Kay MMB, 1984, P Natl Acad Sci-Biol, V81, P5753; 5, Kay MMB, 1983, P Natl Acad Sci-Biol, V80, P1631; 6, Low PS, 1985, Science, V227, P531; 7, Kay MMB, 1986, P Natl Acad Sci USA, V83, P2463; 8, Bennett GD, 1981, Exp Hematol, V9, P297; 9, Lutz HU, 1987, P Natl Acad Sci USA, V84, P7368; 10, Bosman GJCGM, 1988, Blood Cells, V14, P19; 11, Cohen NS, 1976, Biochim Biophys Acta, V419, P229; 12, Murphy JR, 1973, J Lab Clin Med, V82, P334; 13, Kay MMB, 1983, P Natl Acad Sci-Biol, V80, P6882; 14, Kay MMB, 1989, P Natl Acad Sci USA, V86, P5834; 15, Laemmli UK, 1970, Nature, V227, P680; 16, Towbin H, 1979, P Natl Acad Sci USA, V76, P4350; 17, Purdy FR, 1997, Can J Anaesth, V44, P1256; 18, Zallen G, 1999, Am J Surg, V178, P570; 19, Kay MMB, 1982, Mol Cell Biochem, V49, P65; 20, Kay MMB, 1988, Ann NY Acad Sci, V521, P155; 21 Schluter K, 1986, P Natl Acad Sci USA, V83, P6137; 22, Kay MMB, 1990, P Natl Acad Sci USA, V87, P5734; 23, Dodge JT, 1963, Arch Biochem Biophys, V100, P119; 24, Kay M M, 1984, Monogr Dev Biol, V17, P245; 25, Singer JA, 1986, P Natl Acad Sci USA, V83, P5498; 26, Offner PJ, 2002, Arch Surg-Chicago, V137, P711; 27, Kay MMB, 1990, Brain Res Bull, V24, P105; 28, Kellokumpu S, 1988, Science, V242, P1308; 29, Marik PE, 1993, JAMA-J Am Med Assoc, V269, P3024; 30, Alderman EM, 1980, Blood, V55, P817; 31, Walsh TS, 2004, Crit Care Med, V32, P364; 32, Tanner MJA, 1988, Biochem J, V256, P703; 33, Glass GA, 1985, Exp Hematol, V13, P1122; 34, Glass GA, 1983, Exp Hematol, V11, P987; 35, Bartosz G, 1982, Mech Ageing Dev, V20, P223; 36, Kay MMB, 1988, P Natl Acad Sci USA, V85, P492; 37, Lowry OH, 1951, J Biol Chem, V193, P265; 38, Koch CG, 2008, New Engl J Med, V358, P1229; 39, Tinnmouth A, 2006, Transfusion, V46, P2014; 40, Arese P, 2005, Cell Physiol Biochem, V16, P133; 41, Bosman GJCGM, 2005, Cell Physiol Biochem, V16, P1; 42, Vamvakas EC, 2000, Transfusion, V40, P101; 43, Vamvakas EC, 1999, Transfusion, V39, P701; 44, Kay MMB, 1988, Blood Cells, V14, P275; 45, Lutz HU, 1984, J Immunol, V133, P2610; 46, Corash LM, 1974, J Lab Clin Med, V84, P147; 47, Piomelli S, 1967, J Lab Clin Med, V69, P659; 48, Khansari N, 1983, Mech Ageing Dev, V21, P49; 49, Turrini F, 1991, J Biol Chem, V266, P23611; 50, Beppu M, 1990, J Biol Chem, V265, P3226; 51, Suzuki T, 1988, P Natl Acad Sci USA, V85, P1647; 52, Suzuki T, 1987, Blood, V70, P791; 53, Hebbel RP, 1984, Blood, V64, P733; 54, Kay MMB, 1985, Gerontology, V31, P215; 55, Alderman EM, 1981, Blood, V58, P341; 56, Seaman GVF, 1977, Blood, V50, P1001; 57, Galili U, 1986, Brit J Haematol, V62, P317; 58, Kay M M B, 1991, Transfusion Medicine Reviews, V5, P173; 59, Beutler E, 1976, J Lab Clin Med, V88, P328; 60, Ebaugh FG, 1953, J Clin Invest, V32, P1260; 61, Necheles TF, 1953, J Lab Clin Med, V42, P358; 62, Seaman C, 1980, Am J Hematol, V8, P31; 63, Waugh SM, 1985, Biochemistry-US, V24, P34; 64, Clark MR, 1988, Physiol Rev, V68, P503; 65, Hebert PC, 1999, New Engl J Med, V340, P409; 66, Dale GL, 1990, Biochim Biophys Acta, V1036, P183; 67, Khansari N, 1983, Cell Immunol, V78, P114; 68, Jancik J, 1974, H-S Z Physiol Chem, V355, P395; 69, Lutz HU, 1990, Blood Cell Bioch, P81; 70, Gray SJ, 1950, J Clin Invest, V29, P1604; 71, Connor J, 1994, J Biol Chem, V269, P2399; 72, Kuypers FA, 1996, Blood, V87, P1179; 73, Rennie CM, 1979, Clin Chim Acta, V98, P119; 74, Fairbank.G, 1971, Biochemistry-US, V10, P2606; 75, Aminoff D, 1988, Blood

Cells, V14, P229; **76**, Beutler E, 1977, Brit J Haematol, V35, P331; **77**, Salvo G, 1982, Clin Chim Acta, V122, P293; **78**, Waugh RE, 1992, Blood, V79, P1351; **79**, Sass MD, 1964, Clin Chim Acta, V10, P21; **80**, Yaari A, 1969, Blood-J Hematol, V33, P159; **81**, Aminoff D, 1977, P Natl Acad Sci USA, V74, P1521; **82**, Durocher JR, 1975, Blood, V45, P11; **83**, Bosman GJCGM, 1991, Neurobiol Aging, V12, P13; **84**, Lutz HU, 1979, J Biol Chem, V254, P1177; **85**, Lutz HU, 1992, Biochim Biophys Acta, V1116, P1; **86**, Danon D, 1964, J Lab Clin Med, V64, P668; **87**, Lang KS, 2005, Cell Physiol Biochem, V15, P195; **88**, Kiefer CR, 2000, Curr Opin Hematol, V7, P113; **89**, Vaysse J, 1986, P Natl Acad Sci USA, V83, P1339; **90**, Schlepperschafer J, 1983, Biochem Bioph Res Co, V115, P551; **91**, Boas FE, 1998, P Natl Acad Sci USA, V95, P3077; **92**, Bratosin D, 2001, Cell Death Differ, V8, P1143; **93**, Kadlubowski M, 1977, Brit J Haematol, V37, P111; **94**, Kannan R, 1991, Biochem J, V278, P57; **95**, McEvoy L, 1986, P Natl Acad Sci USA, V83, P3311; **96**, Schroit AJ, 1985, J Biol Chem, V260, P5131; **97**, Christian JA, 1993, Blood, V82, P3469; **98**, Aminoff D, 1976, Am J Hematol, V1, P419; **99**, Ganzoni AM, 1971, J Clin Invest, V50, P1373; **100**, Mueller TJ, 1987, J Clin Invest, V79, P492; **101**, Chapman RG, 1967, Brit J Haematol, V13, P665; **102**, Linderkamp O, 1982, Blood, V59, P1121; **103**, Cline MJ, 1963, Blood, V21, P63; **104**, Piomelli S, 1978, P Natl Acad Sci USA, V75, P3474; **105**, Danon D, 1988, Blood Cells, V14, P7; **106**, Piomelli S, 1993, Am J Hematol, V42, P46; **107**, Glass GA, 1984, Biochem J, V218, P531; **108**, Borun ER, 1957, J Clin Invest, V36, P676; **109**, Pranker TAJ, 1958, J Physiol-London, V143, P325; **110**, Bradford MM, 1976, Anal Biochem, V72, P248; **111**, Ashby W, 1919, J Exp Med, V29, P267; **112**, Rettig MP, 1999, Blood, V93, P376; **113**, Bratosin D, 1998, Biochimie, V80, P173; **114**, Mollison PL, 1955, Brit J Haematol, V1, P62; **115**, Bartosz G, 1991, Gerontology, V37, P33; **116**, Wolfe LC, 1985, Transfusion, V25, P185; **117**, Dornhorst AC, 1951, Blood, V6, P1284; **118**, Jain SK, 1988, Biochim Biophys Acta, V937, P205; **119**, Bratosin D, 1995, Glycoconjugate J, V12, P258; **120**, Eadie GS, 1953, Blood, V8, P1110; **121**, Clark MR, 1985, Clin Haematol, V14, P223; **122**, Brok F, 1966, Israel J Med Sci, V2, P291; **123**, Weed RI, 1969, J Clin Invest, V48, P795; **124**, Berlin NI, 1959, Physiol Rev, V39, P577; **125**, Vettore L, 1980, Am J Hematol, V8, P291; **126**, Marks PA, 1958, J Clin Invest, V37, P1542; **127**, Lutz HU, 1977, J Cell Biol, V73, P548; **128**, Fitzgibbons JF, 1976, J Clin Invest, V58, P820; **129**, Fehr J, 1979, Blood, V53, P966; **130**, Shemin D, 1946, J Biol Chem, V166, P627; **131**, Donohue DM, 1955, Brit J Haematol, V1, P249; **132**, Bernstein RE, 1959, J Clin Invest, V38, P1572; **133**, Bosch FH, 1992, Blood, V79, P254; **134**, Nemeth E, 2004, Science, V306, P2090.]

Será de salientar o padrão “tripartido” da rede e em conjunto o facto que os dois sub-grupos de referências de menor dimensão, que se destacam, se referem a temas clínicos relacionados com transfusão e/ou armazenamento de células, em períodos diferentes.

Mapa semântico (co-ocorrência de palavras-chave)

A análise de co-ocorrência de palavras é, como se discutiu anteriormente (veja-se o Capítulo 2), um meio valioso de mapear a dinâmica da ciência. Quais e como se ligam os conceitos mais frequentes no estudo do envelhecimento eritrocitário? Foi estudado aqui apenas o caso das palavras-chave incluídas nas referências. É importante observar que as palavras-chave incluídas nas duas bases de dados têm natureza diferente. O mapa da figura 3.6 mostra, para os dados PM, a co-ocorrência de palavras-chave – essencialmente os termos MeSH –, considerando apenas aquelas que ocorrem com uma frequência igual ou superior a 26.

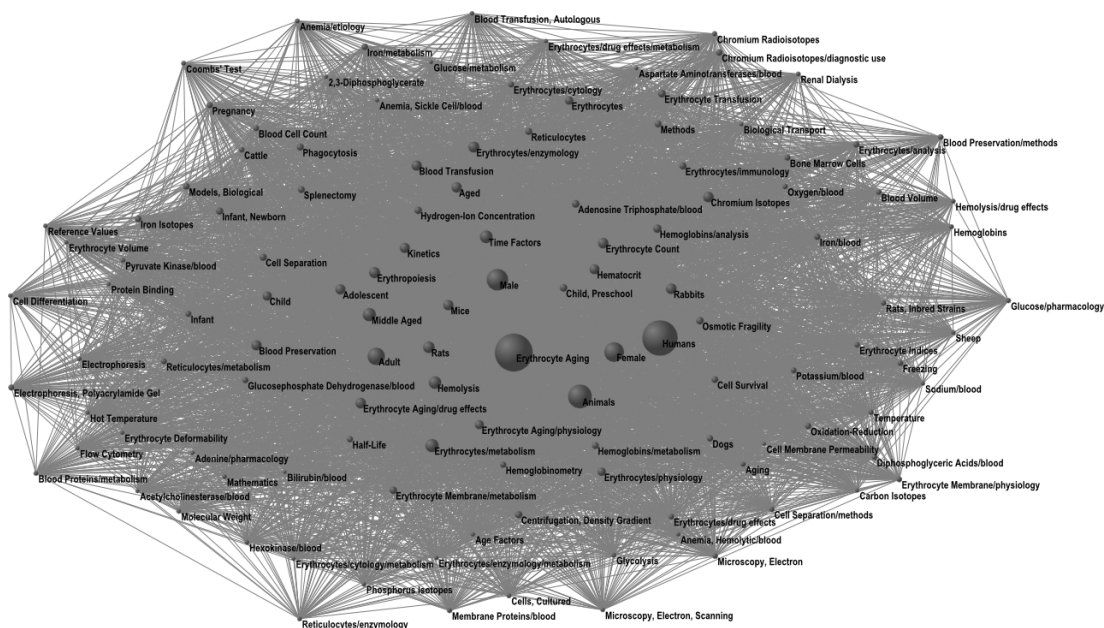


Figura 3.6. Mapa semântico relativo ao envelhecimento eritrocitário, dados PM. Apenas as palavras-chave com frequência igual ou superior a 26 foram incluídas na visualização. O tamanho dos vértices é proporcional à frequência de cada palavra-chave. [Dados: 25.Maio.2012.]

Na figura 3.7 mostram-se mapas de co-ocorrência de palavras-chave para os dados WoS, considerando as palavras-chave dos autores (mapa A), disponíveis desde 1991, e ainda os termos KeyWords Plus® (mapa B), determinadas pela base de dados tendo em conta as referências citadas pelos documentos, disponíveis também desde 1991. No primeiro caso, o mapa foi construído tendo em conta as palavras-chave com 3 ou mais ocorrências; no segundo, consideraram-se os termos com 7 ou mais ocorrências.

Uma breve referência apenas aos termos. Tomando o mapa referente ao dados PM (figura 3.6), pode destacar-se desde logo a importância de métodos de separação de células – como o fracionamento por densidade no qual grande parte dos estudos conduzidos se baseia – bem de métodos para a sua caracterização, incluindo a visualização por microscopia, mas também de tópicos como a transfusão e o armazenamento de sangue. Nos dois mapas referentes aos dados WoS, surgem sobretudo casos estudados e alterações que ocorrem durante o envelhecimento do eritrócito.

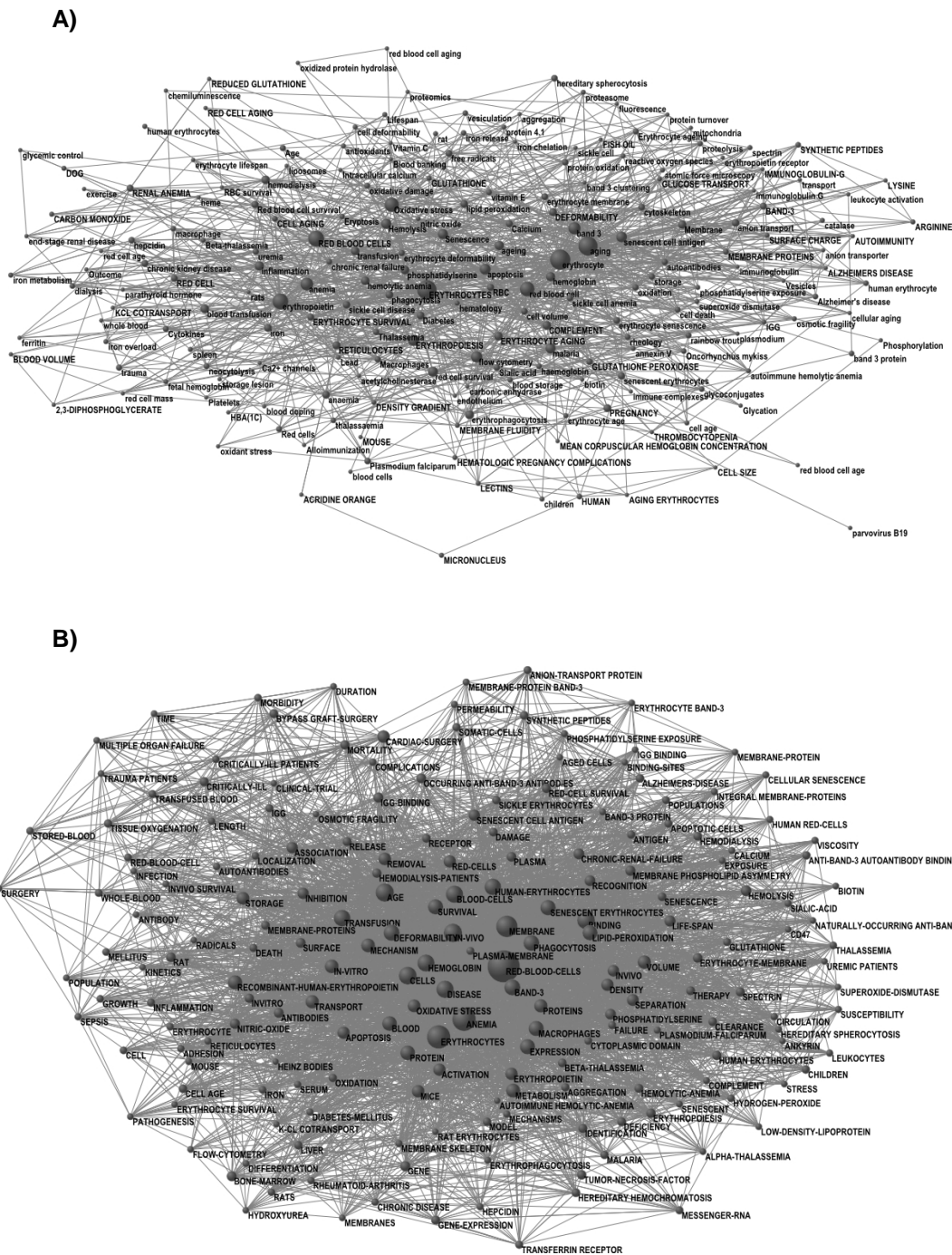


Figura 3.7. Mapa semântico relativo ao envelhecimento eritrocitário, dados WoS. A) Palavras-chave de autores (incluídas as que têm 3 ou mais ocorrências); B) termos KeyWord Plus® (incluídas as que têm 7 ou mais ocorrências). O tamanho dos vértices é proporcional à frequência de cada palavra-chave. [Dados: 3.Junho.2012.]

3.3.3. Sumarizando...

Para concluir este retrato bibliométrico do campo dos estudos do envelhecimento eritrocitário, são várias as observações que se podem fazer ou sublinhar. Em primeiro lugar, o grande crescimento pela década de oitenta que é destacado nos dados PM. Este é o período de maior produtividade e importa perceber essa evolução, porque acontece então e porque deixa de ser assim. Continuando a olhar para os dados sobre produtividade em termos do número de documentos publicados, tem-se que, para anos recentes, parece haver uma reorientação de interesses: não só a diminuição do número anual de publicações indexadas por envelhecimento eritrocitário na PM¹⁶ como também o facto de que esse número continua a crescer de acordo com os dados analisados da WoS – de alguma forma o tema do envelhecimento eritrocitário está presente nesses documentos –, indiciam nesse sentido. Depois, uma nota acerca de áreas disciplinares. O campo desenvolveu-se nomeadamente entre as áreas de hematologia e de bioquímica e biologia molecular, como mostram revistas e tópicos, sendo que a questão biológica e diferentes questões do domínio da clínica surgem ligadas. Por último, a colaboração entre grupos que se observa com alguma extensão no caso dos dados PM é interessante na medida em que denota um esforço colectivo na elucidação do problema. Estes diferentes aspectos são centrais e em vários momentos ao longo do texto voltarei aqui, aos dados bibliométricos.

3.4. Anotações sobre a evolução da compreensão do envelhecimento eritrocitário

Por agora, olhou-se essencialmente o curso de uma questão já consolidada, deixando-se a questão da sua génese para uma análise no contexto de cruzamentos entre os mundos da clínica e do laboratório (veja-se o Capítulo 4); na análise bibliométrica apresentada na secção anterior, de acordo com os tópicos/critérios de recolha dos dados analisados, explorou-se o desenvolvimento de uma área de pesquisa em torno de um problema já bem estabelecido. Mas, para além da sua métrica, o que dizem os textos publicados? Como são narradas descobertas, controvérsias e alterações conceptuais em torno do “eritrócito em envelhecimento”, e o que mostram acerca da dinâmica da investigação desenvolvida? Vejamos então.

¹⁶ A este respeito não se pode ignorar que o léxico MeSH usado para indexação evolui.

Pelo final da década de noventa, Daniela Bratosin e colaboradores (1998) fazem notar a falta de conhecimento definitivo a respeito do tema apesar do grande volume de dados até então conseguidos. Estes investigadores notam a pluralidade de explicações (parciais) do fenómeno como uma dificuldade. Nas suas próprias palavras:

Quando um mecanismo biológico ou bioquímico dá origem a um número muito elevado de hipóteses diferentes, duas conclusões podem ser tiradas: ou estão todas erradas ou são todas plausíveis [...] acreditamos que resultados adicionais irão demonstrar que todos estão correctos e que os mecanismos celulares e moleculares da eritrofagocitose não podem ser reduzidos a um único. (Bratosin et al., 1998: 190)

Para além do comentário anterior, será importante notar o que afirmam de seguida no sentido de que a pergunta essencial permaneceria na altura por resolver.

Com tantas hipóteses alternativas para explicar a aparentemente simples eliminação da circulação de eritrócitos decadentes, podemos apenas concluir que a investigação não está acabada e que resta muito trabalho! A questão crucial ainda persiste. Qual destas alterações nos eritrócitos representa danos dependentes do tempo e qual é o genuíno último suspiro do eritrócito esgotado, decadente, que sobreviveu o desafio de 120 dias terríveis em circulação? (ibidem: 190)

Este é um ponto de situação na viragem do século. Os estudos do envelhecimento eritrocitário tinham conduzido a uma grande quantidade de informação, mas não só a sua integração não parecia clara como se mantinham em aberto questões essenciais. Importa pois ver o que se passou até então bem como o curso posterior dos estudos em torno do problema. O artigo de revisão a que pertence recebeu um número relativamente elevado de citações¹⁷. Para além da discussão inicial acerca do tempo de vida eritrocitário e do desenvolvimento de uma concepção de “destruição do sangue” por um processo de envelhecimento em ligação com a remoção selectiva de eritrócitos velhos (que não é explorada neste capítulo), os pontos essenciais de debate na área de estudo que se desenvolveu e que se encontram bem patententes na literatura especializada vão sendo, especialmente a partir de meados do século XX, a tentativa de identificação da natureza do marcador (ou marcadores) de envelhecimento assim como dos mecanismos que levam ao aparecimento de tais entidades – por exemplo, em relação com a falência do metabolismo energético com o avanço da idade da célula – e ainda pela compreensão dos mecanismos na base do reconhecimento e remoção selectiva de

¹⁷ Conforme dados WoS da análise bibliométrica apresentada em 3.3, o número citações até 2012.06.03 tinha sido de 135.

células velhas. Num período relativamente recente, já pelos anos 2000, foi avançada uma descrição deste fenómeno de envelhecimento no quadro de um evento apoptótico de morte celular programada. Esta nova descrição marca uma ruptura com a concepção anterior e será interessante explorar e reinterpretar nesse quadro a evidência experimental existente. Vejamos então um pouco mais sobre cada um destes aspectos.

3.4.1. Seguindo/abrindo caminhos...

Iniciou-se o presente capítulo citando uma afirmação de Peyton Rous na qual o autor dá conta da dificuldade de percepção das questões do tempo de vida e da eliminação de eritrócitos circulantes. A passagem citada pertence ao artigo de revisão *“Destruction of red blood corpuscles in health and in disease”* (Rous, 1923) sobre a destruição de eritrócitos, de uma data em que a remoção selectiva de eritrócitos por idade não se encontrava ainda bem estabelecida. Quando se lê o mencionado ponto de situação de Bratosin e colaboradores (veja-se introdução de 3.4), publicado umas décadas mais tarde, a expressão “subtil” aqui empregue adquire um significado reforçado. Rous começa esse texto afirmando que “[o] assunto da destruição do sangue tem quase tantas ramificações como a própria corrente sanguínea; e ao entrar nele é preciso escolher um caminho ou possivelmente perder-se por entre os dados” (Rous, 1923: 75). Siga-se então um caminho. O autor refere ter escolhido seguir os processos fisiológicos envolvidos no destino das células e nesta sua revisão do conhecimento então existente acaba por expor alguns dados e ideias que acabariam por constituir linhas orientadoras de muito trabalho posterior: a presumível existência de marcadores de idade; a fagocitose como uma possível via pela qual algumas células são descartadas normalmente. A este respeito, os resultados são ainda muito escassos e Rous afirma que “[a] natureza do estímulo que leva a uma fagocitose normal dos eritrócitos pode apenas ser especulada” (ibidem: 82), questionando então se o processo será de alguma forma selectivo.

Umas décadas mais tarde, no final dos anos oitenta, Margaret R. Clark, sistematiza as questões relacionadas com o envelhecimento eritrocitário da seguinte forma:

Dado o fenómeno de destruição celular dependente da idade, o foco dos estudos na senescência do eritrócito é descobrir o mecanismo pelo qual o envelhecimento da célula promove a sua destruição. [...] Qual é a causa derradeira da destruição ou remoção da célula? [...] “Morrem” as células primeiro, em resultado de várias ou algumas falências em funções celulares

críticas, ou são reconhecidas especificamente antes que desenvolvam comprometimento funcional grave? [...] Se há marcadores de senescência na superfície da célula que permitem um tal reconhecimento, como é que eles se desenvolvem à medida que a célula envelhece, e quão rapidamente eles aparecem? [...] É a senescência uma função pré-programada ou simplesmente a manifestação de danos cumulativos e irreparáveis? (Clark, 1988: 504)

Há uma diferença fundamental entre este texto de Clark e o de Rous na evidência entretanto encontrada de que a remoção de células de circulação ocorre selectivamente por idade. De qualquer modo, nas questões que coloca, o primeiro é já esclarecedor quanto a algumas das linhas de investigação delineadas e que estão claras no segundo – a busca de marcadores de idade/envelhecimento, a decifração de mecanismos subjacentes ao seu aparecimento bem como da remoção de células velhas. Será importante analisar brevemente cada uma.

3.4.2. Procurando marcadores de envelhecimento

A busca de marcadores de idade/envelhecimento das células foi uma das linhas de pesquisa importantes. Entre a evidência experimental encontrada nesse âmbito destaca-se a do aparecimento na superfície exterior das células mais velhas de um novo antigénio. Em meados dos anos setenta, Marguerite Kay (1975) reporta o facto de que a imunoglobulina G, um anticorpo presente no sangue, se liga aos eritrócitos velhos tornando-os vulneráveis à fagocitose por macrófagos autólogos. Mais tarde (1981), a investigadora refere o isolamento de um antigénio da célula senescente e posteriormente (1983) apresenta evidência de que esse antigénio é imunologicamente relacionado com a proteína banda 3. Essa publicação de Kay de 1975 foi mencionada anteriormente no âmbito da análise bibliométrica (veja-se 3.3) por ser o artigo mais citado na amostra de referências WoS analisada e isso em relação com o padrão observado da evolução temporal do número anual de publicações.

A proposta da formação de um neoantigénio na superfície das células velhas motivou muito do trabalho e debate posterior. Mas esta não é a única alteração encontrada na superfície da célula. Pode referir-se, por exemplo, a perda de ácido siálico em glicoproteínas (Aminoff, 1985, 1988), ou ainda a exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana (Schroit *et al.*, 1985; McEvoy *et al.*, 1986; Connor *et al.*, 1994). Esta descoberta terá uma especial relevância na medida e em que abriu caminho para novas formas de caracterizar e fraccionar

uma dada população de células e que passaram a ser de utilização alargada. Mais recentemente, foram publicados resultados que mostram que as células novas possuem à sua superfície um marcador de próprio (*marker of self*), a proteína CD47 que previne a sua remoção do organismo (Oldenborg *et al.*, 2000; Oldenborg, 2004); de certa forma, estes dados invertem o modo de entender a permanência dos eritrócitos em circulação.

3.4.3. Decifrando mecanismos

Houve interesse não só em saber quais os sinais de idade que surgem ao longo do tempo de vida como também perceber como se desenvolvem e quais as suas consequências. São de facto dois os problemas que mobilizaram diferentes grupos de investigadores: o mecanismo pelo qual a célula envelhece, ou se torna velha, e o mecanismo pelo qual as células velhas são removidas de circulação. Mas tome-se atenção ao mecanismo de envelhecimento. Uma hipótese inicial foi a da falência metabólica da célula e assim as pesquisas focadas em enzimas do metabolismo energético (Bernstein, 1959; Brewer & Powell, 1963; Bonsignore *et al.*, 1964). Esta ideia – de que as células ficariam “gastas” e por isso seriam removidas – acabou por ser objecto de controvérsia (cf. Beutler, 1988b) por oposição à hipótese de que a sua remoção acontecesse antes de haver um comprometimento funcional grave. Na base das alterações, muito da atenção foi virada para a ocorrência de processos oxidativos na linha da teoria do envelhecimento por radicais livres. Assim, a própria falência do metabolismo energético (Jacob *et al.*, 1965), a lesão oxidativa da membrana como a presença de hemoglobina ligada, a peroxidação lipídica e o estabelecimento de ligações cruzadas (crosslinking) em proteínas (Hochstein & Jain, 1981; Snyder *et al.*, 1983; Kay *et al.*, 1988) ou ainda o aparecimento do já referido antigénio de senescência foram sendo ligados a lesão por oxidação. Outros estudos preocuparam-se com a regulação do volume celular (Hall & Ellory, 1986; Clark, 1988a) e o próprio aumento de densidade das células ao longo do seu tempo de vida que foi a base de muitos estudos envolvendo fraccionamento de células.

3.4.4. Promovendo debate

Muitos aspectos que pelos anos oitenta dominavam o debate no tema do envelhecimento eritrocitário podem encontrar-se em “*Red Cell Senescence*”, um

número especial da revista *Blood Cells* publicado em 1988. Viu-se anteriormente que esta revista é uma das mais produtivas relativamente a este assunto (veja-se tabela na página 65) e este número especial é em parte responsável por isso. Os artigos nesse volume são seguidos por comentários assinados por pares, de acordo com a linha editorial da revista de promover e publicar discussões em tópicos seleccionados. Num debate acerca da política de publicação da revista (Bull, 1986), o então editor refere:

Em grande parte da mesma forma que os amigos se reúnem para discutir a investigação uns dos outros, é possível para a literatura científica juntar pessoas com interesses comuns, cientistas que de outra forma nunca se encontrariam. Os comentários assinados da Blood Cells têm certamente o potencial de reunir um autor e um comentador numa discussão que num mundo mais pequeno e num tempo anterior poderia ter ocorrido em algum pequeno café ou bar. Centenas, talvez milhares, de outros cientistas interessados serão parte da discussão. Não só terão prazer no encontro, como talvez sejam estimulados a uma maior criatividade como resultado. (Bull, 1986: 274)

Quando o nome da revista sofreu alteração para *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, o editorial então publicado (Beutler, 1995) salienta esta característica da *Blood Cells* que com a publicação destes comentários promovia uma troca científica aberta. A prática de mostrar a discussão por pares é um aspecto interessante a respeito da dinâmica de construção de conhecimento no domínio do estudo das células do sangue.

3.4.5. Um outro desenho emerge?

Em 2001, um editorial publicado na revista *Cell Death and Differentiation* – “*Erythrocytes: Death of a mummy*” – anuncia que os eritrócitos de mamíferos, desprovidos de núcleo e mitocôndrias, dois organelos implicados no processo apoptótico de morte celular programada, “tinham vindo a intrigar os investigadores interessados em apoptose” (Daugas *et al.*, 2001: 1131). Este texto apresenta dois artigos publicados no mesmo número da revista (Berg *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2001) e marca o que pode ser considerado um ponto de viragem no entendimento do fenómeno da eliminação de eritrócitos de circulação. Vale a pena explorar aqui pelo que pode mostrar da reconfiguração de um problema e do seu conhecimento. A apoptose é uma forma de morte celular programada que se caracteriza por uma série de alterações na célula que envolvem o núcleo, mitocôndrias, citoplasma e membrana plasmática e significa a sua capacidade da célula de se auto-destruir em

resposta a uma variedade de estímulos; para detalhes sobre a formulação do conceito vejam-se as análises de Lockshin (1997) e Kerr (2002). O campo de estudos em torno da morte celular programada sofreu uma grande expansão no início dos anos noventa (Garfield & Melino, 1997) pelo que não será surpreendente que estes estudos focados no eritrócito não tenham surgido antes. Mas voltemos aos artigos a que se refere o editorial mencionado da *Cell Death and Differentiation*. Em ambos os casos os investigadores partem de alguma semelhança de eventos relacionados com a morte celular programada e aquilo que se verifica no envelhecimento eritrocitário para estudar a ocorrência do processo desencadeada pelo íão cálcio. E o eritrócito parecia ter passado de uma célula incapaz de sofrer morte celular programada, e particularmente um processo de apoptose, a um modelo experimental adequado para a investigação desse processo. É essa a proposta do artigo de Bratosin e colaboradores (2001) que retrata o processo que observam no eritrócito como um caso singular de apoptose na ausência de núcleos e mitocôndrias e esta célula como um modelo adequado e privilegiado para o estudo das etapas da apoptose que não dependem desses organelos. Também no trabalho de Berg e colaboradores é salientado esse aspecto: os resultados que estes autores apresentam sugerem que o eritrócito não tem um sistema funcional de morte celular, mas avançam que a presença de caspases faz dele um “sistema atractivo para dissecar o papel de certas vias de regulação da apoptose” como concluem no resumo.

Apoptose no eritrócito circulante?

Apresentada explicitamente nesses textos da *Cell Death and Differentiation* (Berg *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2001; Daugas *et al.*, 2001), a ideia de um processo apoptótico ligado à remoção do eritrócito de circulação tem vindo a ser extensamente estudada por vários outros investigadores. Destaca-se pelo número de documentos publicados o caso do grupo de Florian Lang. Estes investigadores retratam essa forma singular de apoptose como mecanismo importante da remoção de eritrócitos de circulação, admitindo que esse processo esteja implicado na limitação do tempo de vida da célula e ainda que seja um mecanismo importante implicado na remoção de células antes de uma prejudicial hemólise (Lang *et al.*, 2005). Sendo um processo apoptótico, aquilo que se verifica no eritrócito, tem características particulares e, assim, sai deste grupo a proposta de utilização de um

novo termo “eriptose” (“*eryptosis*”) para descrever essa forma singular de apoptose.

A sugestão apresentada como segue:

Os eritrócitos são desprovidos de núcleos e mitocôndrias e assim faltam-lhes os elementos cruciais da maquinaria de apoptose. Por isso, até há pouco se considerava que os eritrócitos eram removidos por outros mecanismos que não o de apoptose. [...] Para distinguir a morte de eritrócitos da apoptose de células nucleadas, nós fazemos a sugestão do termo “eriptose”. (Lang et al., 2005: 196)

Na mesma linha do que tinha sido já avançado por Bratosin e colaboradores, acerca da conveniência do eritrócito como modelo em estudos da apoptose, estes investigadores concluem o artigo admitindo/especulando que:

[...] mecanismos similares poderão estar operacionais em células nucleadas onde poderão estar encobertos pela mais complexa maquinaria apoptótica. Desse modo, a eriptose pode revelar-se um sistema modelo valioso para analisar mecanismos que são igualmente importantes para a apoptose de células nucleadas. (Lang et al., 2005: 200)

Este novo entendimento e reinterpretação de evidência experimental bem estabelecida são de resto mencionados e discutidos nesta altura por Giel Bosman, um autor com trabalho extenso acerca do envelhecimento eritrocitário (veja-se a tabela na página 64), como terá ficado bem patente na análise bibliométrica anteriormente reportada. Citando:

Uma compilação de palavras-chave do processo que leva à remoção da circulação de eritrócitos senescentes [...] – envelhecimento, autoimunidade, proteólise dependente de cálcio, vesiculação, oxidação, fagocitose, exposição de fosfatidilserina – revela uma quase completa sobreposição com os termos que caracterizam o processo apoptótico de células nucleadas. (Bosman et al., 2005: 6)

Para uma exposição mais detalhada, a tabela 3.4 ilustra características “partilhadas” dos fenómenos de envelhecimento eritrocitário e de apoptose como são usualmente referidas num campo e noutro. A sobreposição de acontecimentos é óbvia e leva a pensar que os dados existentes acerca do envelhecimento eritrocitário podem ser reinterpretados neste novo quadro. Há no entanto que ter em conta uma diferença importante – a janela de tempo relativa a um caso e outro, a apoptose é um processo rápido com duração da ordem das horas.

Tabela 3.4. Características partilhadas pelos fenómenos de envelhecimento do eritrócito e de apoptose celular de acordo com descrições correntes (veja-se o texto para referências).

envelhecimento eritrocitário	apoptose
diminuição do volume celular	encolhimento da célula [<i>cell shrinkage</i>]
alteração de forma de discócito a esfero-equinócito/esferócito	formação de bolhas na membrana [<i>membrane blebbing</i>]
vesiculação	vesiculação
perca da assimetria de fosfatidilserina	perca da assimetria de fosfatidilserina
proteólise dependente do cálcio (por perca da homeostasia deste ião)	desencadeada pelo ião cálcio
acumulação de danos oxidativos	desencadeada na condição de stress oxidativo
reconhecimento de células velhas e fagocitose	reconhecimento de células que expõem fosfatidilserina e fagocitose

No texto atrás referido, Bosman prossegue a sua análise elaborando sobre implicações deste novo entendimento na dinâmica da investigação do envelhecimento eritrocitário. Assim, para este autor, a conclusão de que os processos que levam à remoção de eritrócitos envelhecidos de circulação são parte de um programa de apoptose poderá conduzir a novos e mais rápidos avanços na investigação relacionada com o fenómeno envelhecimento eritrocitário, proporcionando agora uma formulação de problemas mais acessíveis (ibidem). Esta perspectiva de Bosman será ainda retomada mais adiante no presente estudo (veja-se o Capítulo 5).

Voltemos à proposta do novo termo eriptose. Como se viu, a sugestão foi publicada em 2005, sendo que, desde então, o crescimento do número de publicações que de algum modo referem esta designação sofreu uma expansão sensível. Interessou-me assim seguir a introdução deste novo termo na literatura especializada com recurso à bibliometria – as palavras importam?

Eriptose – seguindo a introdução de um termo novo pela bibliometria

O estudo que se apresenta tem por base referências das duas bases de dados bibliográficos que têm vindo a ser usadas como fonte, PM e WoS. O gráfico na figura 3.8 mostra a evolução temporal do número anual de publicações, no período 2005-2011, que resultam da pesquisa em cada uma das bases de dados e que de alguma forma mencionam esta designação; as pesquisas foram efectuadas para o termo *eryptosis*, em todos os campos (*All Fields*) no caso da PM e como tópico (*Topic*), no caso da WoS. A pesquisa resultou num número de referências de 118, no caso da PM, e de 124, no caso da WoS, depois de removidos duplicados e referências com publicação efectivamente em 2012 (publicadas online ainda em

2011). Basicamente, seguiu-se aqui um procedimento semelhante ao que foi já apresentado para os estudos do envelhecimento eritrocitário em geral (veja-se ainda o Anexo para mais detalhes).

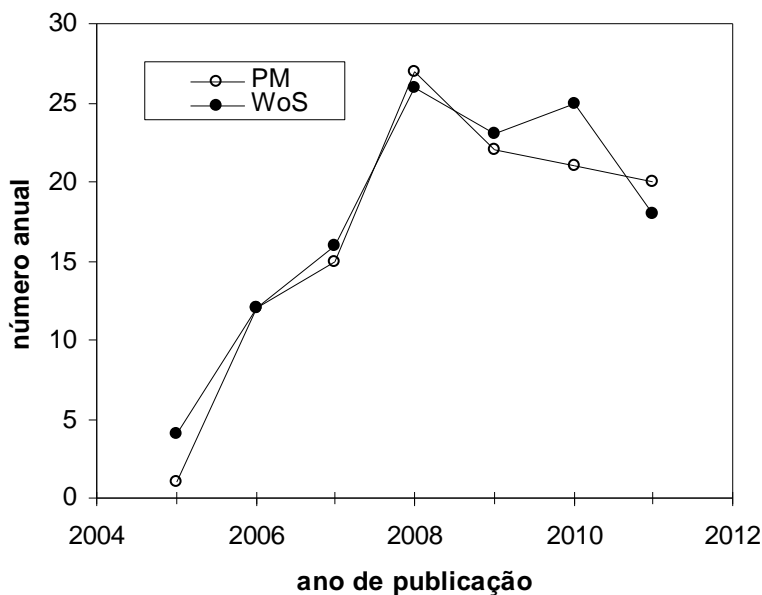


Figura 3.8. Evolução temporal do número anual de artigos que incluem o termo *eryptosis*, dados PM e WoS. [Dados: 16.Mai.2012.]

Os resultados obtidos para cada uma das bases de dados são semelhantes pelo que na descrição que segue se optou por incluir apenas resultados de uma delas – a WoS uma vez que proporciona informação mais completa. Vejamos então.

De referir antes de mais que a totalidade dos 124 documentos são escritos em língua inglesa, como seria expectável para a pesquisa efectuada, e que, desses, 11 (9%) são artigos de revisão.

Os documentos envolvem um total de 266 autores (depois de efectuada a verificação e normalização de nomes). O autor que assina o maior número de artigos é, naturalmente, Florian Lang. A tabela 3.5 mostra uma listagem dos autores mais produtivos em termos de número de documentos publicados.

Tabela 3.5. Autores mais produtivos dos documentos que mencionam o termo *eryptosis*, dados WoS. Inclui-se o número de documentos publicados (n); estão listados os autores com pelo menos 6 documentos mencionando o termo. [Dados: 16.Mai.2012.]

n	nome do autor
103	Lang, F.
57	Foller, M.
34	Huber, S. M.
27	Wieder, T.
22	Qadri, S. M.
21	Mahmud, H.
19	Koka, S.
17	Bobbala, D.
17	Lang, P. A.
14	Gulbins, E.
14	Kempe, D. S.
13	Niemoeller, O. M.
12	Akel, A.
11	Lang, E.
11	Shumilina, E.
10	Lang, C.
10	Nicolay, J.P.
10	Zelenak, C.
8	Kucherenko, Y.
7	Boini, K. M.
7	Hermle, T.
7	Jilani, K.
7	Kasinathan, R. S.
7	Sopjani, M.
6	Duranton, C.
6	Lang, K. S.

Estudou-se ainda a rede de co-autorias, tendo-se construído o mapa apresentado na figura 3.9. Sendo notória a dimensão do grupo de Lang, é ainda visível no mapa que vários outros grupos adoptaram a utilização do termo *eryptosis*; na verdade, a informação fica confirmada pela análise das publicações em questão desses grupos.

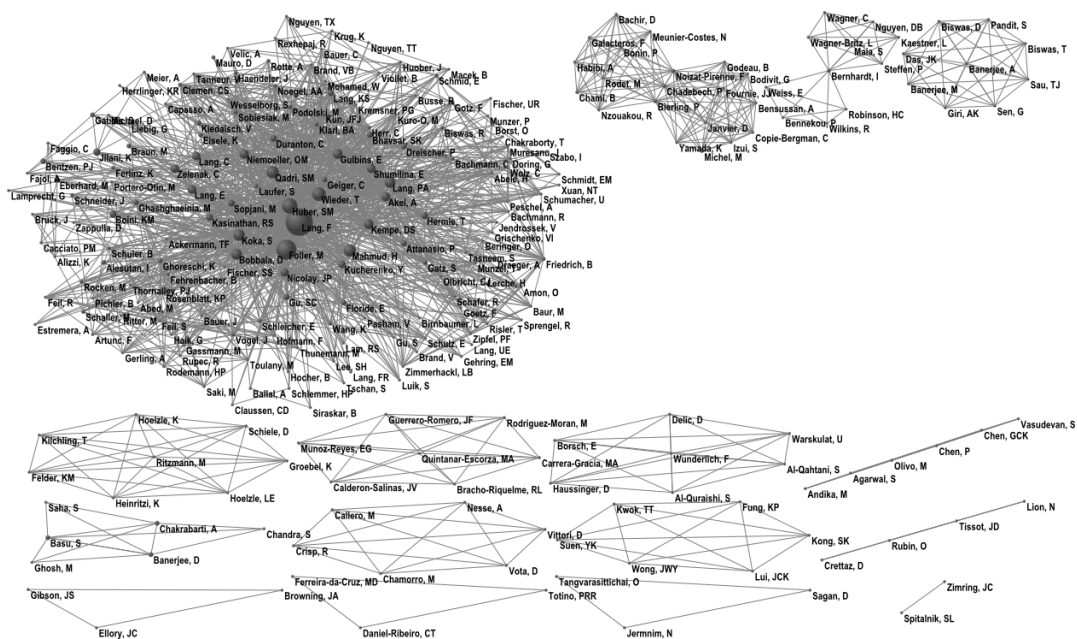


Figura 3.9. Rede de co-autorias relativa aos artigos que incluem o termo *eryptosis*, dados WoS. Para a visualização foram considerados todos os autores. O tamanho dos vértices no mapa é proporcional ao número de publicações de cada autor. [Dados: 16.Mai.2012.]

Para uma melhor caracterização olhou-se também para quais as revistas nas quais são publicados os documentos. Os 124 documentos foram publicados em 54 revistas. A informação sobre produtividade encontra-se reunida na tabela 3.6. O maior número de documentos, 42 (34%), surge na *Cellular Physiology and Biochemistry*. A revista tem como sub-título *International Journal of Experimental and Clinical Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology* e pretende ser “um fórum científico multidisciplinar dedicado a avançar as fronteiras da investigação celular básica”¹⁸, focando-se especificamente em questões como crescimento e diferenciação celular, canais iónicos e transportadores, ou ainda regulação do volume celular. Não surpreendentemente, de acordo com essa linha editorial, da qual Florian Lang é um dos responsáveis, a imagem que ilustra o âmbito da revista na Web é um diagrama que representa mecanismos envolvidos no processo de eriptose.

¹⁸ Acessível no portal da Karger em content.karger.com [conforme acesso em Agosto de 2012].

Tabela 3.6. Revistas mais produtivas relativamente ao termo *eryptosis*, dados WoS. Inclui-se o número de documentos publicados (n); estão listadas as revistas que publicaram pelo menos 2 documentos mencionando o termo. [Dados: 16.Maio.2012.]

n	nome da revista
42	Cellular Physiology and Biochemistry
5	Pflugers Archiv-European Journal of Physiology
4	American Journal of Physiology-Cell Physiology
4	Toxicology
3	Biochemical and Biophysical Research Communications
3	FASEB Journal
3	Journal of Agricultural And Food Chemistry
3	Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology
2	Archives of Biochemistry and Biophysics
2	Archives of Toxicology
2	European Journal of Clinical Investigation
2	European Journal of Pharmacology
2	Journal of Applied Toxicology
2	Journal of Molecular Medicine-JMM
2	Kidney & Blood Pressure Research
2	Malaria Journal
2	Molecular Nutrition & Food Research
2	Toxicology and Applied Pharmacology
2	Transfusion

Foram explorados ainda os documentos citados. A tabela 3.7 apresenta as referências mais citadas no conjunto dos artigos que de algum modo incluem o termo *eryptosis*. Muitas desta referências correspondem a trabalhos desenvolvidos no grupo de Florian Lang. Há no entanto que notar posição cimeira do artigo de Bratosin e colaboradores, publicado em 2001, no qual se afirma que mostra evidência de um processo apoptótico no eritrócito e se propõe que o eritrócito possa ser um modelo experimental adequado e valioso para o estudos das etapas envolvidos na apoptose e que não dependem da presença de núcleo ou de mitocôndrias.

Tabela 3.7. Referências mais citadas nos artigos que incluem o termo *eryptosis*, dados WoS. Inclui-se o número de citações na amostra (n); a referência onde é proposto o termo está destacada a negrito. [Dados: 16.Maio.2012.]

n	referência
95	Lang KS, 2003, CELL DEATH DIFFER, V10, P249
91	Lang PA, 2003, AM J PHYSIOL-CELL PH, V285, pC1553
86	Boas FE, 1998, P NATL ACAD SCI USA, V95, P3077
83	Bratosin D, 2001, CELL DEATH DIFFER, V8, P1143
82	Berg CP, 2001, CELL DEATH DIFFER, V8, P1197
82	Lang KS, 2004, CELL DEATH DIFFER, V11, P231
81	Fadok VA, 2000, NATURE, V405, P85
81	Kempe DS, 2006, FASEB J, V20, P368
78	Lang KS, 2005, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V15, P195
73	Durantón C, 2002, J PHYSIOL-LONDON, V539, P847
72	Brugnara C, 1993, J CLIN INVEST, V92, P520
63	Huber SM, 2001, PFLUG ARCH EUR J PHY, V441, P551
62	Brand VB, 2003, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V13, P347
62	Lang PA, 2006, J MOL MED, V84, P378
60	Bookchin RM, 1987, PROG CLIN BIOL RES, V240, P193
60	Lang PA, 2007, NAT MED, V13, P164
57	Lang KS, 2002, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V12, P365
57	Woon LA, 1999, CELL CALCIUM, V25, P313
54	Daugas E, 2001, CELL DEATH DIFFER, V8, P1131
53	Durantón C, 2003, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V13, P189
52	Nicolay JP, 2007, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V19, P175
51	Andrews DA, 1999, CURR OPIN HEMATOL, V6, P76
51	Birka C, 2004, PFLUG ARCH EUR J PHY, V448, P471
49	Lang F, 2008, CELL PHYSIOL BIOCHEM, V22, P373
48	Lang PA, 2005, CELL DEATH DIFFER, V12, P415

Finalmente, interessou analisar o conteúdo conceptual destes trabalhos. A figura 3.10 mostra a rede de conceitos associados avaliada pela co-ocorrência de palavras-chave tal como estas se encontram disponíveis na base de dados WoS, considerando as palavras-chave dos autores (mapa A) e ainda os termos Keywords Plus® (mapa B). No primeiro caso, o mapa foi construído tendo em conta a totalidade das palavras-chave; no segundo, consideraram-se os termos com 2 ou mais ocorrências. Essencialmente, a rede mostra características do processo e diferentes casos em que a ocorrência do fenómeno foi explorado como a influência de fármacos ou a infecção pelo parasita da malária.

Este é o quadro actual da inserção do termo eriptose na literatura. Alguns outros grupos adoptaram essa designação, não tendo portanto ficado confinado a uso pelos seus proponentes. Mas será talvez preciso algum tempo ainda para se

perceber se a utilização de um termo mais específico para o caso traz alguma vantagem em relação à evolução do conhecimento a seu respeito.

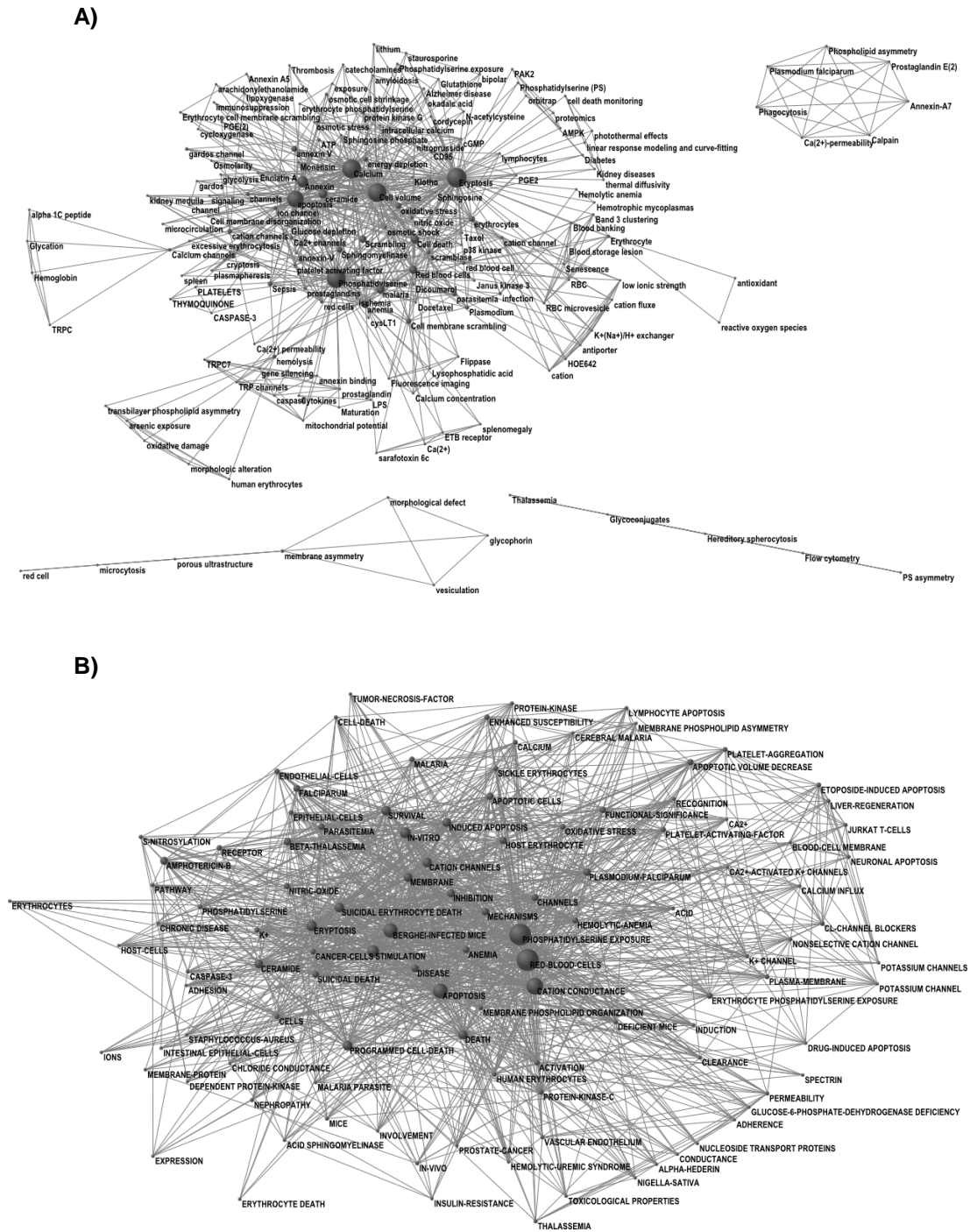


Figura 3.10. Mapa semântico relativo aos artigos que de algum modo incluem o termo *eryptosis*. A) Palavras-chave de autores, tendo sido consideradas todas; B) termos KeyWord Plus®, tendo sido consideradas apenas as palavras-chave com frequência igual ou superior a 2. O tamanho dos vértices é proporcional à frequência de cada palavra-chave. [Dados: 16.Mai.2012.]

3.5. E então?

Para concluir esta panorâmica dos estudos do envelhecimento do eritrócito, será conveniente posicionar temporalmente avanços principais e/ou mudanças conceptuais. Na cronologia apresentada na figura 3.11 – com a qual se pretende apenas melhor organizar o que foi exposto anteriormente – estão indicados avanços principais (à esquerda da linha de tempo) bem como marcos bibliográficos (à direita); destacam-se dois desenvolvimentos pelo que representam do ponto de vista metodológico, pela abertura de novas possibilidades de abordagem experimental: a evidência de uma correlação entre densidade e idade do eritrócito e a da perda da assimetria da distribuição de fosfatidilserina na membrana.

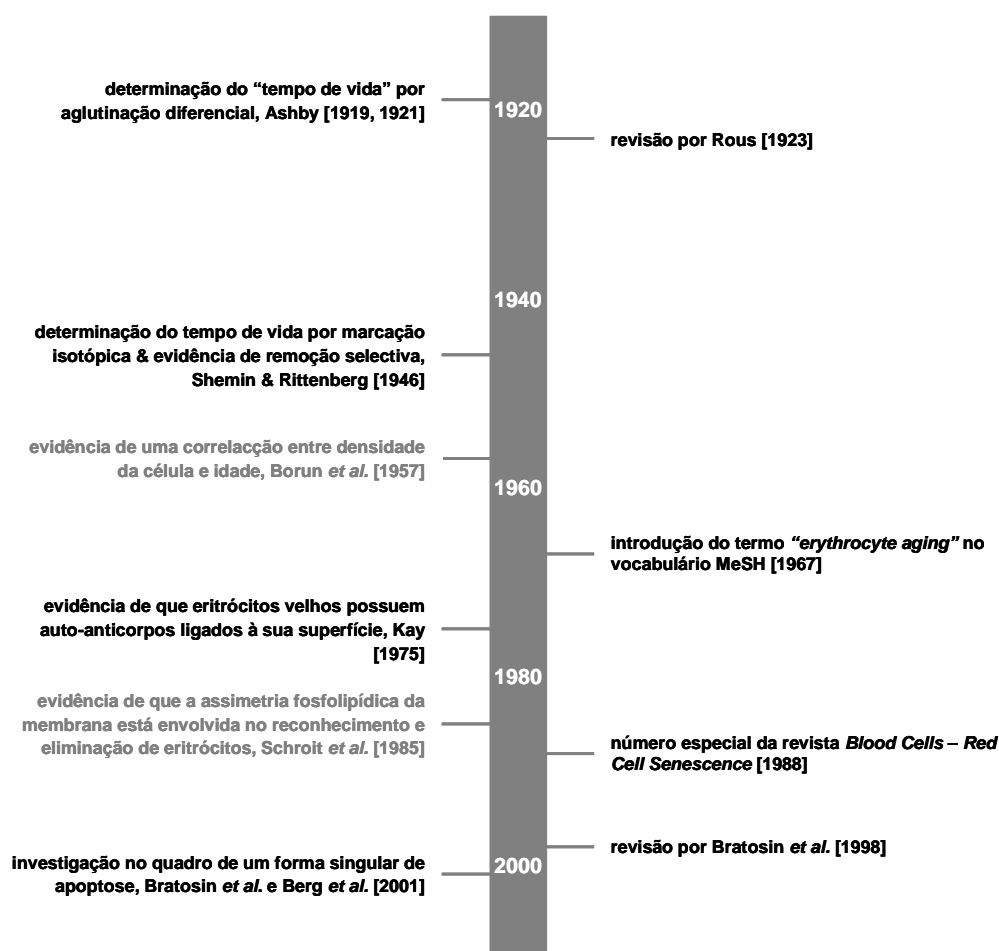


Figura 3.11. Cronologia dos estudos de envelhecimento eritrocitário.

Os capítulos que se seguem assentam nesta panorâmica e, assim, o cronograma será um guia útil e com algum papel heurístico.

Capítulo 4. Estudos do Envelhecimento do Eritrócito entre o Laboratório de Investigação e a Clínica

A estimativa da vida do eritrócito ilustra como o clínico, sob a tensão da necessidade imediata, pode ser confrontado com problemas biológicos, na solução dos quais ele poderá progredir pouco sem a ajuda do cientista fundamental.

– Witts, 1950: 315

O problema do envelhecimento eritrocitário emerge do conjunto de trabalhos levados a cabo pelo início do século XX, nos quais há um interesse clínico bem presente, e que conduziram à determinação do tempo de vida do eritrócito. Estes trabalhos iniciais ocorrem em proximidade com estudos dedicados à compreensão de condições de anemia hemolítica e ainda de práticas de transfusão sanguínea, sendo que o cruzamento de questões fundamentais e clínicas segue até ao presente a evolução do conhecimento do problema. A determinação do tempo de vida da célula será o desenvolvimento inicial que aqui se considera, a investigação que estabelece coordenadas e assim traça a área de estudo. O entendimento da remoção dos eritrócitos da corrente sanguínea como resultado de um processo de envelhecimento não foi contudo imediato, tendo a questão motivado muito debate. Trata-se de um aspecto essencial e, assim, será importante explorar desde já como surge a evidência da remoção de células por idade.

4.1. O eritrócito “tem um tempo de vida”

Começamos então por tentar perceber como surge a ideia de um tempo de vida do eritrócito ligado à remoção selectiva de células velhas. Parece ser consensual na literatura especializada (cf. Beutler *et al.*, 2001) que a primeira estimativa experimental confiável do tempo de vida eritrocitário resulta das determinações por Winifred Ashby, pela segunda década do século XX, do tempo de sobrevivência de eritrócitos humanos transfundidos. O debate tem, naturalmente, raízes anteriores. A título de exemplo, referimos apenas aquilo que, ainda no século XIX, William Hunter defendia (1887). Para o clínico e contrariamente ao que na altura poderia pensar-se, como o próprio afirma, a questão do tempo de vida normal do eritrócito seria

uma questão relevante tanto do ponto de vista científico como do ponto de vista clínico, particularmente quando esse problema era olhado em relação com a importância da transfusão sanguínea.

Mas analisemos então as determinações de Ashby do tempo de vida eritrocitário. O estudo foi realizado sobre células transfundidas (1919, 1921), considerando existir um paralelismo entre a destruição de células transfundidas e aquela que ocorre normalmente no sangue. Com recurso a um processo de aglutinação diferencial – que desenvolveu – Ashby determinou que o tempo de vida dessas células (ou o tempo de vida normal do eritrócito, se admite esse paralelismo) poderia chegar a valores na ordem de 100 dias. Será conveniente observar em maior detalhe o procedimento desenvolvido, publicado no artigo de 1919 bem como o trabalho subsequente e que lhe permitiu a estimativa que dois anos mais tarde apresentou. O método de Ashby baseia-se no facto de que células nativas e células transfundidas podem ser diferencialmente aglutinadas: diluindo sangue do receptor da transfusão com soro de um grupo sanguíneo seleccionado nesse propósito¹⁹, ocorre aglutinação das células nativas, ficando livres apenas aquelas que tinham sido introduzidas no sangue do receptor por transfusão. Será possível, portanto, seguir a permanência em circulação de células transfundidas. A ideia explorada por Ashby foi a de que ao seguir as curvas de eliminação de células transfundidas até ao final se iria ter, para um conjunto de casos, um quadro que representaria o tempo de sobrevivência das células mais novas na população que tinha sido transfundida. Foi o estudo de mais de uma centena de casos – incluindo a transfusão associada a diferentes patologias do sangue e a transfusão realizada por motivos cirúrgicos na ausência de doença do sangue – que lhe permitiu concluir uma duração das células transfundidas até um período na ordem de 100 dias – de facto, de 30 dias, no primeiro artigo, até 110 dias, considerando os casos reportados também no segundo artigo. No seu artigo sobre a evolução da compreensão acerca do tempo de vida eritrocitário, Dacie (1979) refere este desenvolvimento como um marco na evolução das ideias acerca do tempo de vida eritrocitário.

É essencial notar que a ocorrência de um processo de envelhecimento destas células do sangue conducente à eliminação selectiva das células envelhecidas e, assim, implicado na renovação das células em circulação, não era nesta altura

¹⁹ O trabalho de Ashby beneficiava dos desenvolvimentos recentes relativos à existência de grupos sanguíneos conseguidos por Landsteiner (cf. Ashby, 1948).

conhecimento estabelecido. Uma passagem de Ashby (1921) a esse respeito é bem esclarecedora, merecendo por isso ser citada em extensão. Afirma a autora:

[...] a eliminação não é um processo contínuo mas ocorre em crises mais ou menos cíclicas, de tal forma que a responsabilidade do desaparecimento de circulação do sangue transfundido parece assentar mais fortemente nesta actividade cíclica do corpo do que na condição do corpúsculo. (Ashby, 1921: 127)

A extensão do tempo de vida eritrocitário determinada por Ashby permaneceu controversa durante algumas décadas, como a própria desenvolve numa revisão sobre o tópico (1948). Nesse texto, a autora refere que esta era uma questão que tinha permanecido em aberto nos cem anos precedentes. Refere ainda que a então recente possibilidade de estudo por marcação isotópica, juntamente com a análise matemática dos dados obtidos, tinha sido um desenvolvimento importante. Na verdade, em meados da década de quarenta o trabalho de David Shemin e D. Rittenberger (1946), com recurso a um novo método que se baseava na marcação isotópica das células, junta ao debate evidência experimental clara da remoção selectiva de células velhas. Shemin e Rittenberg associaram ao trabalho experimental uma extensa análise matemática com modelação por meio de equações diferenciais, tornando com isso a interpretação dos dados experimentais que comunicam mais robusta (ver-se-á mais à frente neste capítulo que o apoio numa análise matemática não é particularidade exclusiva da publicação de Shemin e Rittenberg, parecendo ser uma marca deste tipo de estudos). Esses dados indicam não só a duração da vida de eritrócitos humanos como mostram uma ligação inequívoca do processo normal de eliminação de eritrócitos do sangue a um processo de envelhecimento destas células. Vejamos com mais detalhe.

Neste artigo, os autores começam por afirmar que as diferentes tentativas de estimar o tempo de vida médio do eritrócito que haviam sido levadas a cabo até então tinham fornecido resultados na gama de 5 a 200 dias. Introduzem então a aplicação ao caso da técnica de marcação isotópica que vinha a ser desenvolvida na Universidade de Columbia (Nova Iorque) e da qual Rittenberg é a figura proeminente. As determinações que fazem baseiam-se na marcação de células, na sua formação, com um isótopo, o ^{15}N , sendo depois seguida a evolução temporal da presença no sangue das células marcadas.

Esta estimativa do tempo de vida eritrocitário foi resultado de auto-experimentação. Como descrito na secção experimental do artigo, um dos autores – Shemin – ingeriu o aminoácido glicina marcado com o isótopo ^{15}N e então a concentração do

isótopo na hemina (composto que deriva da hemoglobina presente nos eritrócitos) e nas proteínas do sangue foi seguida em amostras de sangue colhidas ao longo de quatro meses. Nenhuma referência no artigo à sua condição de saúde pelo que se presume ser normal. Nenhuma referência também a qualquer aspecto ético do ensaio.

O gráfico incluído no artigo, e que a figura 4.1 reproduz, é claro e elucidativo: como a presença do isótopo ^{15}N na hemina permite ler, os eritrócitos surgem em circulação, aí permanecem durante um período determinado no seu termo do qual acabam por desaparecer da corrente sanguínea.

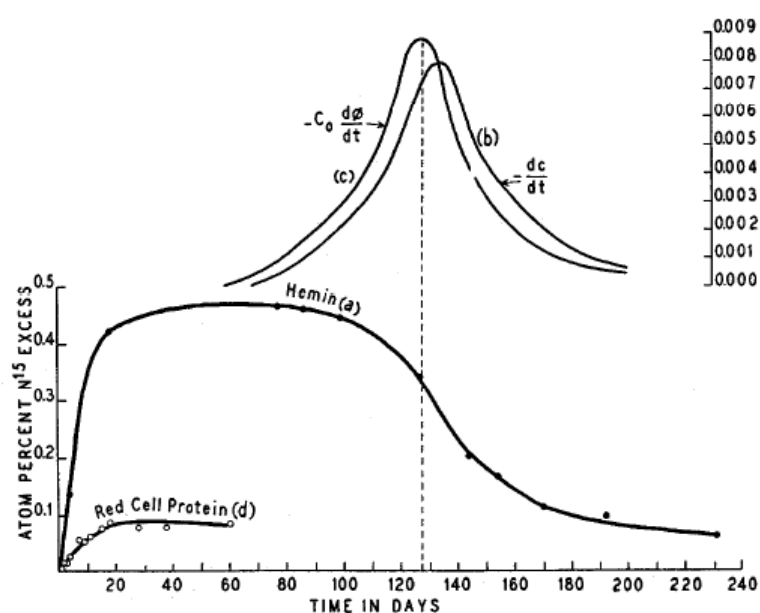


FIG. 1. N^{15} concentration in hemin after feeding N^{15} -labeled glycine for 3 days

Figura 4.1. Figura 1 de Shemin & Rittenberg (1946) mostrando a evolução da concentração de ^{15}N no sangue na base da determinação do tempo de vida eritrocitário por marcação de células, na sua formação, com este isótopo. O padrão de evolução temporal com rápida diminuição da concentração de ^{15}N pelos 120 dias é uma evidência da remoção selectiva por idade. [Investigação publicada originalmente no *Journal of Biological Chemistry*. David Shemin e D. Rittenberg. "The life span of the human red blood cell." *Journal of Biological Chemistry*. 1946; Vol 166: 627-636 © American Society for Biochemistry and Molecular Biology.]

Shemin e Rittenberg fazem uma análise detalhada destes resultados. Assim, começam por descrever os dados no gráfico para a hemina afirmando o crescimento rápido em cerca de 25 dias após a cessação de ingestão de glicina marcada, a permanência praticamente constante durante os 70 dias seguintes e então o decaimento segundo uma curva em forma de S. E discutem então que uma

tal curva não pode ser o resultado de um processo em que simplesmente há moléculas que são sintetizadas e degradadas de um modo aleatório, parecendo mostrar que a probabilidade de que a molécula de hemoglobina se degrade seja função da sua idade. Nesta narrativa continuam com a observação de que o conceito de “envelhecimento” não é aplicável a moléculas e portanto a explicação tem de ser outra. E concluem que “a presença do ^{15}N num componente da célula deve ser resultado da síntese do componente e sua incorporação durante a formação da célula” (ibidem: 629), sendo que “[a]s moléculas originais deste constituinte permanecerão então na célula até que a célula se desintegre ou morra” (ibidem).

O resultado de um tempo de vida de 127 dias vem na sequência da análise matemática da curva no gráfico. O trabalho é conclusivo sobre o tempo de vida da células e ainda acerca da remoção de células no final de um processo de envelhecimento. Um dos pontos que os autores apresentam como sumário do trabalho refere-se ao facto de que a eliminação de eritrócitos acontece ao fim de um tempo preciso, não sendo as células sujeitas a uma destruição não específica. Citando:

*Um estudo das concentrações isotópicas encontradas no heme do eritrócito [red blood cell], depois da alimentação com glicina marcada com ^{15}N , indica que o eritrócito não é submetido a destruição indiscriminada mas **tem um tempo de vida**. Este foi determinado ser de cerca de 127 dias. (Shemin & Rittenberg, 1946: 635; ênfase adicionada)*

Este terá sido um resultado crucial para o entendimento da permanência destas células em circulação. O interesse do projecto que desenvolvi foca-se na dinâmica da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário, sendo nesse propósito particularmente importante seguir eventuais mudanças de padrão ou configuração do problema – estes resultados de Shemin e Rittenberg constituem um primeiro marco decisivo na compreensão do processo.

4.2. Curvas de sobrevivência de eritrócitos – um papel importante da análise matemática

Essencialmente, nos dois estudos tratados na secção anterior fazem-se avaliações de sobrevivência de eritrócitos. Procurou então mostrar-se como se chegou à conclusão de que o eritrócito tem um tempo de vida, isto é, que a sua eliminação é baseada na idade. O artigo de Shemin e Rittenberg (1946) tem a particularidade de incluir uma extensa análise matemática dos resultados que reporta; chamou-se a

atenção para esses aspectos, mas o facto é, de resto, patente na imagem que se reproduz aqui na figura 4.1. Sendo bem sabido que descrição matemática dos processos não é procedimento corrente nas ciências da vida, é curioso observar que parece ser uma característica da discussão que se fazia em torno da duração da vida do eritrócito.

“On the duration of life of the red blood corpuscles” (Schjødt, 1938) dá uma perspectiva inicial de um debate no campo dos conceitos e que explora a questão da existência de um tempo de vida do eritrócito, isto é, de uma eliminação de células baseada na idade. Analisando a definição de duração da vida, Schjødt parte da evidência de que a duração da vida destas células é menor do que a do corpo assim como do facto de que o número de eritrócitos de um indivíduo se mantém constante ao longo de vários anos e sob condições muito variadas para concluir que deverá ocorrer uma produção contínua de células correspondente a uma destruição também contínua. Mas prossegue afirmando que isto pode ser conseguido de diferentes maneiras. Em questão estão duas possibilidades: num extremo, as células terem um tempo de vida definido (“teoria da longevidade”); no outro, a destruição ser um factor essencial (“teoria da destruição”). Entra aqui a análise matemática. Schjødt inclui no artigo um gráfico onde representa o número de células em função do tempo e que descreve estas duas possibilidades, isto é, um gráfico onde representa dois tipos de curva de sobrevivência; no primeiro caso tem-se uma curva com um patamar e no segundo uma curva que decresce assintoticamente. E nota então que há uma grande diferença entre as duas curvas apesar de poderem não significar uma grande diferença em termos da duração média de vida da célula: a idade média é muito maior no caso da curva que representa a teoria da destruição uma vez que sendo esse o caso haverá uma grande quantidade de células que morrem novas.

Voltemos ao caso da sobrevivência de células transfundidas como indicador do tempo de vida da célula que fundamentou os trabalhos de Ashby (1919, 1921). Esta questão foi extensamente analisada e discutida com apoio de análise matemática. Sheila T. Callender e colaboradores fizeram esse tipo de estudo em conjunto com determinações experimentais que levaram a cabo pelo método de Ashby baseado na aglutinação diferencial (1945). Deduziram assim uma relação entre o decaimento de células transfundidas e a sobrevivência de um eritrócito individual, concluindo a partir daí acerca de um tempo de vida do eritrócito. *“Discussion on the life and death of the red blood corpuscle”* (Callender *et al.*, 1946), publicada pela

Proceedings of the Royal Society of Medicine, reúne depoimentos de vários autores e assim ilustra um esforço colectivo no sentido do esclarecimento da questão.

“*Red blood cell survival studies*” (Eadie & Brown, 1953) é um outro exemplo de um estudo fortemente apoiado na análise matemática das curvas de sobrevivência, considerando os casos de curvas evidenciando senescência apenas, destruição aleatória apenas ou uma combinação de ambos os processos. A evidência aponta o sentido de haver destruição aleatória em diferentes condições patológicas. A análise da forma das curvas de sobrevivência de eritrócitos motivou muito debate, estendendo-se as avaliações e sua discussão a diferentes espécies para além da humana (Brown & Eadie, 1953).

A questão fundamental na análise destas curvas é a de se perceber se ocorre ou não eliminação de células em função da sua idade ou ainda se há ou não uma componente de eliminação aleatória. Margaret R. Clark refere-se a este debate na sua revisão do final da década de oitenta (1988b). Aí, a autora explora a informação existente acerca da diferença a este respeito entre espécies bem como condições conducentes a uma eliminação aleatória apreciável, mesmo quando o processo normal de eliminação é função da idade das células e, portanto, a uma curva de sobrevivência com um patamar menos pronunciado.

A avaliação da sobrevivência de eritrócitos foi essencial para a definição do problema do envelhecimento eritrocitário. Como observa Robert S. Franco (2009), esta avaliação foi sendo feita com recurso a vários métodos, desde a aglutinação diferencial, à marcação isotópica (com radioisótopos, nomeadamente o ^{51}Cr , ou isótopos não radioactivos, como o ^{15}N), à produção de monóxido de carbono e ainda à citometria de fluxo. O texto de Franco é uma revisão onde autor se refere ainda à importância destas determinações numa variedade de contextos clínicos ou relacionados com a prática clínica como a avaliação de novos meios de armazenamento de células.

Há que fazer um apontamento final sobre curvas de sobrevivência para além do caso do eritrócito. A discussão sobre este tipo de curva, e do patamar que a caracteriza, é bem presente nos estudos do envelhecimento biológico e ainda nos estudos que se fazem sobre o campo isto é sobre a biogerontologia. Como analisam Tiago Moreira e Paolo Palladino (2008), a evolução da forma desta curva no sentido de um patamar mais pronunciado (descrita pela expressão “*squaring the curve*”) acompanhará uma prospectiva eliminação progressiva de doenças crónicas

e degenerativas. O foco deste trabalho são os estudos do envelhecimento eritrocitário, mas é curioso notar a coincidência do debate.

4.3. Transfusão e armazenamento de sangue em banco

A evidência apresentada nas secções anteriores surge no contexto do interesse em melhor compreender a base de diferentes condições patológicas do sangue bem como de práticas médicas relacionadas. As questões em torno da transfusão são de suma importância, sendo o caso desta abordagem terapêutica usualmente apresentado como justificando o interesse na investigação sobre a duração da vida do eritrócito. O atrás mencionado artigo de Shiødt, por exemplo, inicia-se por uma afirmação nesse sentido, ao que se acrescenta que se o sangue transfundido não puder viver no receptor “o valor da transfusão será ilusório” (1938: 49).

É sabido que a prática de transfusão está ligada ao armazenamento de sangue em banco. Voltemos um pouco mais atrás, a um tempo anterior à criação de bancos de sangue. A passagem que se segue é extraída de um texto de Peyton Rous e J. R. Turner do início do século XX (Rous & Turner, 1916), sendo essencialmente uma chamada de atenção para a importância do armazenamento de células:

Praticamente não existe referência na literatura de tentativas para guardar eritrócitos vivos por um período prolongado in vitro. No entanto, os métodos para a sua preservação poderão ter grande importância prática, e certamente possuem interesse teórico. (Rous & Turner, 1916: 219)

Rous e Turner especulam então que as células guardadas pudessem ser utilizadas, sob certas circunstâncias, para transfusão. O artigo apresenta métodos de preservação das células armazenadas, incluindo a adição de citrato e de sacarose. Por razões óbvias, a possibilidade de armazenar eritrócitos para reinfusão posterior revolucionou a prática das transfusões. O problema das alterações sofridas pelo eritrócito durante o armazenamento de sangue em banco constitui uma preocupação essencial, antecede a definição do problema do envelhecimento eritrocitário e acompanha o seu estudo.

4.3.1. Envelhecimento, armazenamento e lesão de armazenamento

Em certo sentido, o armazenamento impõe uma condição de envelhecimento acelerado. Alguns trabalhos de investigação com células armazenadas foram feitos nesse sentido (cf. Clark, 1988b), usar o armazenamento para estudar o

envelhecimento que ocorre normalmente *in vivo*; noto que a ideia fazia parte de um dos projecto referidos no Capítulo 1. É claro que, no entanto, os dois processos não são podem ser considerados análogos.

Os eritrócitos – qualquer que seja a forma em que são armazenados – sofrem, no decurso da sua permanência em banco, uma série de alterações bioquímicas e morfológicas que globalmente são designadas por “lesão de armazenamento”; este fenómeno inclui diferentes alterações em componentes membranares, diminuição dos níveis de adenosina trifosfato, perca da forma de disco bicôncavo e vesiculação (Dumaswala *et al.*, 1999; Holme, 2005; Sparrow *et al.*, 2006; Kriebardis *et al.*, 2007; Bosman, Lasonder, *et al.*, 2008; Kriebardis *et al.*, 2008; Hess, 2010; Bosman *et al.*, 2011).

Em última análise, a lesão de armazenamento limita o tempo durante o qual os eritrócitos podem ser preservados e que naturalmente se pretende prolongado. Assim, muito esforço tem sido colocado na definição de condições que minimizem as alterações permitindo aumentar o período de armazenamento em meio líquido. O editorial “*Back to the future in RBC preservation*” (Beutler, 2000) começa pela afirmação de que esse prolongamento tinha vindo a ser um desafio desde a Segunda Grande Guerra Mundial; nesse texto é referido que o progresso nesse campo tinha sido lento, em parte porque a lesão de armazenamento não era bem conhecida. A lesão de armazenamento constitui um tópico actualmente importante como se pode depreender da data de publicação relativamente recente dos documentos que acima são usados como referência acerca do processo.

4.3.2. “Idade” do sangue

Neste contexto fala-se usualmente de “idade” das células armazenadas para transfusão e este parâmetro tem vindo a ser objecto de atenção recente. A lesão de armazenamento tem consequências clínicas (cf. Tinmouth & Chin-Yee, 2001), sendo referido que os problemas ocorridos nas duas últimas décadas do século XX com sangue armazenado levaram a uma reavaliação da qualidade do sangue armazenado para transfusão. Em relação à lesão de armazenamento, em particular, tem sido dedicada uma atenção crescente ao seu impacto clínico. Variados estudos e relatos de caso apontam no sentido de que a transfusão de unidades de sangue velhas (tempo de armazenamento superior a duas semanas) está relacionada com a ocorrência de complicações (cf. Zubair, 2010). “*Should we demand fresh red blood cells for perioperative and critically ill patients?*” (McLellan

et al., 2002), “*Age of blood: Does it make a difference?*” (Offner, 2004), ou ainda “*Age of red blood cell transfusions in critically ill patients: comparison of two opposite transfusion policies*” (Piagnerelli *et al.*, 2003) são títulos que elucidam sem que seja necessário aqui elaborar mais. Significativo será também o facto de que o artigo de Koch e colaboradores (Koch *et al.*, 2008) está entre as referências mais citadas nos artigos sobre envelhecimento eritrocitário, conforme dados WoS explorados no âmbito da análise bibliométrica apresentada anteriormente (veja-se o Capítulo 3, tabela 3.3).

4.3.3. Explorando a ideia de transfusão de células novas

A possível influência da idade dos eritrócitos na lesão de armazenamento é ainda uma questão importante. Rosemary L. Sparrow e colaboradores estudaram-na num artigo relativamente recente (2006) e onde chamam a atenção para o facto de que a ideia de transfusão de células novas tinha sido em tempos já considerada. Como notam, tinha sido anteriormente realizado muito trabalho no sentido da preparação de concentrados de células novas para transfusão. O estudo desta possibilidade, explorada pelos anos oitenta num propósito diferente, tinha por base a hipótese de que a transfusão de eritrócitos mais novos proporcionaria uma eficácia aumentada quando comparada com a transfusão de células não fraccionadas. A estratégia terá sido abandonada por uma relação custo-benefício não favorável (*ibidem*). Mas voltemos atrás algumas décadas atrás e vejamos mais atentamente.

A questão apresentada no final dos anos setenta por Sergio Piomelli e colaboradores (1978) prende-se com a maior longevidade das células novas pós-reinfusão para um teor de ferro semelhante. Assim, afirmam:

A transfusão de sangue de dador contendo predominantemente eritrócitos mais novos com sobrevivência prolongada in vivo poderá reduzir significativamente a sobrecarga de ferro em doentes que necessitam transfusão crónica. (Piomelli *et al.*, 1978: 3474.)

A sobrecarga de ferro é uma das complicações a que ficam sujeitos os indivíduos submetidos a transfusões frequentes, sendo que se as células tiverem pós-reinfusão um tempo de permanência em circulação mais prolongado essa é minorada. Os autores prosseguem, anunciando que o enriquecimento em células mais novas de concentrados eritrocitários tinha passado a ser praticável. Em questão um fraccionamento por centrifugação em gradiente de densidade de arabinogalactano, recorrendo portanto ao mesmo fundamento das separações de

células que se faziam no laboratório e usando o mesmo tipo de meio (veja-se o Capítulo 1 e o Capítulo 7) e do qual foi registada patente. Posteriormente, foram explorados outros procedimentos mais simplificados de isolamento de células novas, designadamente com recurso ao sistema IBM-2991 (Graziano *et al.*, 1982; Bracey *et al.*, 1983). Embora a ideia tenha sido abandonada, como referem Sparrow e colaboradores (2006), chegaram a ser realizados ensaios clínicos em crianças portadoras de talassemia severa (Cohen *et al.*, 1984); esses primeiros ensaios confirmaram a redução da necessidade de eritrócitos pela administração regular de células novas, mas tinha ficado por perceber o impacto do procedimento na acumulação de ferro em relação com o aumento substancial de custos associados à técnica.

4.4. Entre o laboratório de investigação e a clínica

Já se referiu por várias vezes ao longo deste texto que o problema do envelhecimento eritrocitário surge ligado ao mundo da clínica e ao interesse em melhor conhecer a base de algumas patologias do sangue bem como desenvolver/optimizar abordagens terapêuticas relacionadas. Os cruzamentos dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário com a investigação relativa à transfusão de sangue e ao armazenamento de eritrócitos em banco são densos e o exposto, ainda que sem entrar em muitos detalhes, tê-lo-á ilustrado. E, no entanto, é preciso reconhecer que, embora a relação entre a lesão de armazenamento e o envelhecimento eritrocitário *in vivo* seja estudada desde há muito, os dois processos por vezes foram considerados sem ligação (cf. Gabrio & Finch, 1954) e, até muito recentemente, a investigação acerca do armazenamento de eritrócitos parece ter vindo a beneficiar lentamente do conhecimento produzido acerca do envelhecimento eritrocitário (Bosman, Werre, *et al.*, 2008).

Haveria que explorar, para além destes, outros aspectos que também liguem o estudo do envelhecimento destas células ao mundo da clínica, procurando eventuais apropriações do conhecimento produzido e situações nas quais, de alguma forma, a compreensão do fenómeno de envelhecimento eritrocitário esteja subjacente a investigação posterior. Faz-se apenas uma breve menção a um caso que parece especialmente interessante, o da utilização de eritrócitos como sistema de transporte e distribuição de fármacos no organismo. Num artigo referenciado como o primeiro neste campo, Garret M. Ihler e colaboradores (1973) referem o extenso conhecimento de factores que influenciam a permanência em circulação

dos eritrócitos como premissa, na perspectiva de implementação de terapia enzimática, para a tentativa de preparar células carregadas de enzimas que permanecessem em circulação por longos períodos de tempo, acrescentando ainda possível conseguir com esse sistema alguma especificidade de órgãos. Na verdade, a remoção selectiva de eritrócitos velhos pelo processo de eritrofagocitose permite pensar que se forem modificadas características nas células no sentido de mimetizar o padrão de reconhecimento das células velhas, isso facilitará a distribuição desse composto a um alvo específico. Esta tese não explora este caso, apenas o refiro porque é interessante na evidência que proporciona acerca de deslocamentos/apropriações de conhecimento entre os mundos do laboratório de investigação e da clínica. De resto, refira-se o caso de Mauro Magnani, um dos autores mais profícuos sobre o envelhecimento de eritrócitos na década de oitenta (veja-se o Capítulo 3, tabela 3.1), que é também um investigador destacado no campo do recurso ao eritrócito como transportador de fármacos, conforme uma breve pesquisa em bases de dados bibliográficos permite concluir.

Antes de terminar, voltemos ao caso da investigação ligada à transfusão sanguínea. Nesse propósito, recorde-se a anteriormente referida recente alteração no entendimento da remoção de células de circulação (veja-se o Capítulo 3) que a descreve como resultado de um processo singular de apoptose. A questão que se coloca é a de saber se haverá implicações deste novo entendimento no que se refere à transfusão. Esse novo entendimento significa que a sobrevivência de eritrócitos pode ser modulada quer *in vitro* quer *in vivo* por intervenção terapêutica (cf. Bratosin *et al.*, 2001) e, assim, a resposta a essa pergunta parece ser afirmativa. Vários trabalhos têm explorado essa possibilidade, por exemplo no que se refere ao estabelecimento de novos critérios para a avaliação da viabilidade de eritrócitos armazenados (Bratosin *et al.*, 2002) ou no que se refere à compreensão da própria lesão de armazenamento (cf. Kriebardis *et al.*, 2007).

Capítulo 5. Estudos do Envelhecimento do Eritrócito no Contexto dos Estudos Biológicos do Envelhecimento

Os estudos do envelhecimento têm sido dificultados pela complexidade de organismos inteiros ou, mesmo, das células nucleadas que os constituem. Os eritrócitos de mamíferos oferecem as vantagens óbvias de serem enucleados, extraordinariamente simples, e de possuírem um tempo de vida finito. Para além disso, a presente profundidade do conhecimento acerca do eritrócito faz dele uma pedra de toque valiosa aplicável a outras áreas de pesquisa.

– Eaton *et al.*, 1985: xix

O recurso a um dado um modelo experimental no âmbito da investigação acerca de um problema específico é usualmente apresentado como uma escolha. Mostra a história das ciências da vida que o eritrócito de mamíferos acabou por ser um modelo valioso relativamente a diferentes questões. O caso da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário oferece um desses exemplos. Recorde-se que, pelo início do século XX, a questão do tempo de vida eritrocitário assumiu relevância no domínio clínico (veja-se o Capítulo 4), situando-se aí a origem do estudo do envelhecimento destas células. Encontrada evidência de que na base da manutenção da população de eritrócitos no sangue está uma remoção selectiva de células por idade, a investigação acabou naturalmente por se focar também no próprio fenómeno de envelhecimento eritrocitário e na possibilidade de extrapolação de dados obtidos no eritrócito para outros sistemas. Pelos década de oitenta, esta célula, cujo envelhecimento é em si mesmo um foco de atenção, é considerada por vários investigadores como um modelo experimental privilegiado para estudos do envelhecimento, tendo acabado por ser um modelo inicial importante em biogerontologia. Importa pois explorar a vida do eritrócito como um modelo experimental neste domínio da investigação biológica e biomédica.

5.1. Eritrócitos e o “eritrócito como modelo”

É claro que o interesse no estudo do envelhecimento do eritrócito se justifica por si só, pela compreensão em termos da sua biologia e das condições patológicas em

que esse fenômeno se encontra implicado, mas também, como tenho vindo a referir e é bem descrito na literatura especializada, pela vantagem desta célula como modelo experimental de estudo. É assim possível falar-se de duas forças motrizes distintas nos estudos conduzidos em torno do envelhecimento eritrocitário: estudar o fenômeno de envelhecimento nesta célula *per se* ou fazê-lo numa perspectiva de modelação. Numa passagem do seu artigo de revisão publicado no final da década de oitenta (1988b), Margaret R. Clark retrata bem o interesse do “eritrócito como modelo”. Para a autora:

Compreender a senescência do eritrócito pode ser útil para aumentar a nossa compreensão da senescência e homeostasia noutros tecidos. [...] a simplicidade do eritrócito pode permitir conhecimento inicial num problema muito complexo. Em última análise, estes inícios rudimentares podem proporcionar uma base para a compreensão de uma vasta gama de questões biológicas, desde o envelhecimento do organismo no seu todo até aos defeitos que previnem a senescência atempada ou morte pré-programada de uma célula neoplásica. (Clark, 1988: 547-548)

Com efeito, a literatura especializada da altura denota haver consenso a este respeito. O mesmo se passa relativamente aos motivos da eleição do eritrócito como modelo privilegiado – este modelo seria valioso no estudo do envelhecimento celular por características como simplicidade, acessibilidade/disponibilidade e ainda pela singularidade de não ser possuidor de ADN nem de maquinaria de síntese de proteínas. Esta última característica significa um cenário onde são escassos os mecanismos de reparação e substituição e assim um palco de excepção para o estudo de (genuínos) danos e envelhecimento da célula (Clark, 1988b; Bartosz, 1991). De certa forma, e pensando em termos da noção de reducionismo metodológico anteriormente referida (veja-se o Capítulo 2), isto significa que o eritrócito proporciona um sistema para o estudo de processos na célula que será à partida já parcialmente isolado.

Considerado um modelo privilegiado para estudos do envelhecimento, interessa explorar qual foi, nesse âmbito, o lugar do eritrócito.

5.2. Lugar do eritrócito na história inicial da investigação do envelhecimento celular

Observemos mais atentamente a vida do eritrócito como modelo experimental na investigação do envelhecimento celular. Será importante notar desde já que os estudos biológicos do envelhecimento são marcados pela coexistência de uma multiplicidade de teorias que os enquadram (cf. Beckman & Ames, 1998). No caso

particular dos trabalhos realizados em eritrócitos, há interesse em entender como se integram no quadro de uma teoria específica, a teoria oxidativa do envelhecimento.²⁰ Esta teoria tem a sua origem na sugestão de Denham Harman de que os radicais livres de oxigénio produzidos durante a respiração celular aeróbia estão na base de uma acumulação de danos oxidativos no organismo e conduzem assim ao seu envelhecimento e morte (Harman, 1956). Desde essa formulação inicial, a teoria foi ganhando suporte sendo muito diversas e numerosas as contribuições para a elucidação do papel das espécies reactivas de oxigénio no processo de envelhecimento e que constituem uma linha de investigação importante neste campo (Beckman & Ames, 1998). O mecanismo de produção de espécies reactivas de oxigénio no eritrócito é contudo particular. Não possuindo esta célula possibilidade de respiração aeróbia, a principal fonte dessas espécies será nesta célula a auto-oxidação da oxi-hemoglobina. Trata-se de um mecanismo de produção espécies reactivas de oxigénio que é específico desta célula, mas os efeitos de tais espécies, num sistema *in vitro*, por exemplo, poderão aqui ser estudados com benefícios. As vantagens do eritrócito na investigação no contexto da teoria oxidativa do envelhecimento está relacionada com os mesmos motivos que fazem desta célula um modelo de eleição para estudos do envelhecimento atrás referidos e que, essencialmente, proporcionam um cenário de escassez de mecanismos de reparação e substituição. Relativamente ao envolvimento de espécies reactivas de oxigénio, haverá uma outra vantagem do modelo eritrocitário decorrente do facto de se tratar de uma célula especialmente vulnerável à condição de stress oxidativo; devido à sua exposição contínua a grandes fluxos de oxigénio em conjunto com a presença de níveis elevados de ferro, e apesar de ser possuidor de um sistema de protecção antioxidante, o eritrócito é uma célula especial no que respeita à ocorrência de danos oxidativos (cf. Smith, 1995).

Pode adiantar-se desde já que muito do conhecimento básico que suporta a teoria oxidativa do envelhecimento foi obtido em eritrócitos, estas células foram intensamente estudadas do ponto de vista de uma resposta a stress oxidativo (cf. Giulivi *et al.*, 1994). Note-se que em muitos desses trabalhos, a investigação foca-se apenas nessa resposta não considerando explicitamente o fenómeno de envelhecimento da célula. Mas, para além disso, são numerosos os estudos que se debruçaram sobre danos oxidativos da membrana (quer de lípidos quer de

²⁰ A expressão “teoria oxidativa do envelhecimento” será usada ao longo deste texto para referir a teoria do envelhecimento que em inglês é usualmente designada por “*free radical theory of aging*”.

proteínas) bem como sobre o sistema de protecção antioxidante da célula que acompanham o envelhecimento do eritrócito (cf. Hochstein & Jain, 1981; Snyder *et al.*, 1983; Glass & Gershon, 1984). Um caso interessante é o do estudo do envelhecimento eritrocitário em relação com a condição de exercício físico (cf. Smith, 1995); recorde-se que era um caso considerado no grupo da U.Porto (veja-se o Capítulo 1). Resumindo, é fácil encontrar diferentes exemplos de investigação no modelo eritrocitário que são contribuição importante relativamente à teoria oxidativa do envelhecimento.

5.2.1. O que dizem os números...

Perceber o lugar dos estudos do envelhecimento eritrocitário no contexto mais alargado do estudo do envelhecimento biológico, isto é, no contexto da biogerontologia, passa também por ter ideia da dimensão relativa destes campos. Fez-se uma referência breve sobre isso anteriormente (veja-se o Capítulo 3). O volume de estudos em torno do envelhecimento eritrocitário é relativamente pequeno quando comparado com o dos estudos do envelhecimento celular na sua globalidade, mas se ao longo do tempo e sobretudo em tempos recentes os estudos em eritrócitos podem ser residuais quando comparados com esse, é contudo claro que o eritrócito surge como um modelo importante na investigação inicial deste fenómeno. Com o avanço do conhecimento acerca do envelhecimento, muitos trabalhos passaram a ser realizados em diferentes organismos modelo, incluindo *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* (cf. Partridge, 2011). A análise dos estudos nesses organismos modelo, ou mesmo dos estudos do envelhecimento eritrocitário em relação com esses, está fora do âmbito desta tese, a referência é feita aqui apenas para uma breve ilustração sobre o contexto – um campo disciplinar caracterizado por uma grande (e em mudança) diversidade de modelos experimentais.

5.2.2. ... e os registos promissórios

O eritrócito foi um modelo inicial importante no estudo do envelhecimento e será altura de tomar mais atenção ao modo como eram descritas as expectativas em relação aos avanços que poderia proporcionar. A passagem de Margaret R. Clark citada anteriormente (veja-se 5.1) fá-lo de modo particularmente empenhado. Mas este tipo de narrativa é, na verdade, frequente. “Uma das células mais

exaustivamente estudadas, o eritrócito – com um tempo de vida definido – parece-me ser o modelo ideal para estudar a senescência” afirma David Aminoff (1985: 289) no final do seu artigo em *“Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as a Model”* e destaca-se alguns anos mais tarde num artigo de revisão do qual Aminoff é co-autor (Bratosin *et al.*, 1998). Grzegorz Bartosz apresenta-o como “um ser peculiar mas, mesmo assim, interessante e valioso para gerontologia celular” (1991: 33). Marguerite Kay, por seu turno, defende o eritrócito como um modelo adequado para estudar estrutura e função membranares em células de vertebrados terminalmente diferenciadas e apresenta uma série de motivos para essa apreciação. Entre eles, a não especificidade de proteínas eritrocitárias e a acessibilidade/disponibilidade de grandes quantidades de células de indivíduos de todas as idades. Mas, na linha do que defendem outros investigadores, Kay salienta o facto de que o eritrócito é um sistema simples. E elabora a respeito da contribuição de sistemas simples em grandes avanços no conhecimento, caso da *Drosophila* e do bacteriófago, concluindo que “o eritrócito pode ser para o envelhecimento o que a *Drosophila* é para a genética clássica e o bacteriófago para a genética molecular” (1991: 8).

Ficará claro adiante (veja 5.3) que não se trata de mera retórica nos textos; estas afirmações exprimem um interesse alargado na comunidade de investigadores, como a organização de iniciativas dedicadas a explorar o valor do eritrócito como modelo para o estudo do envelhecimento pode demonstrar.

Mas não se pode deixar de notar aqui a recorrência que parece existir do interesse em apresentar as virtudes do eritrócito como modelo. No final do artigo em que apresentam evidência de que há etapas do processo de apoptose que podem ocorrer no eritrócito, Bratosin e colaboradores sugerem que: “[...] os eritrócitos podem representar um modelo útil para a identificação de efectores de morte celular programada e senescência que podem operar numa célula minimal desprovida de núcleo, mitocôndrias e outros organelos” (Bratosin *et al.*, 2001: 1154). Tinha sido feita anteriormente uma breve alusão a esta sugestão (veja-se o Capítulo 3), ficaram agora as palavras dos autores.

Tendo em conta a evidência que implica etapas da fase de execução de um programa de apoptose no processo de remoção de eritrócitos de circulação, Giel Bosman (2005), afirma :

Esta conclusão pode acelerar o lento progresso da investigação sobre o envelhecimento eritrocitário, inspirando a busca das peças ainda em falta segundo um quadro completo de apoptose. Talvez possam agora ser

abordados problemas mais acessíveis do que o da identidade molecular do antigénio específico do eritrócito senescente, de há longo tempo difícil de compreender, tais como a identidade do sinal de activação, a identidade de quaisquer proteínas reguladoras, etc. Numa visão de reciprocidade, o eritrócito pode mais uma vez constituir um sistema modelo valioso, por exemplo, para o estudo das etapas finais de apoptose tais como formação de bolhas na membrana [membrane blebbing], formação de vesículas e reconhecimento imune e fagocitose. (Bosman, 2005: 6-7)

Será talvez cedo ainda para perceber o significado desta nova possibilidade no avanço do conhecimento.

5.3. Iniciativas colaborativas

Tenho vindo a referir o interesse que o modelo eritrocitário parecia representar. Mas para perceber o significado dessas narrativas que se encontram em artigos publicados é importante explorar se de algum modo correspondem a um esforço colectivo.

Antes de mais, será oportuno recordar a rede de co-autorias nos estudos do envelhecimento eritrocitário tratada anteriormente (veja-se o Capítulo 3); tinha sido então salientada, para o caso dos dados PM, uma aparente extensa rede de colaboração. Retomo assim a referência que fiz então ao facto de que, nesse período, foram organizadas algumas iniciativas importantes dedicadas a explorar o valor do eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento admitindo que essa rede fosse disso expressão. Vejamos em maior detalhe.

A citação inicial deste capítulo é um excerto do prefácio das actas da conferência “*Cellular and Molecular Aspects of Aging. The Red Cell as a Model*” (Eaton *et al.*, 1985), realizada em Minneapolis, Minnesota, de 8 a 11 de Setembro de 1984. O programa da conferência incluiu cerca de trinta comunicações. Entre os autores das comunicações publicadas nas actas contam-se alguns dos investigadores mais produtivos na investigação em torno do envelhecimento eritrocitário (veja-se o Capítulo 3), como Aminoff, Beutler, Clark, Kay, Pivacek e Valeri. O livro de actas inclui ainda, para além dos artigos de investigação, as discussões que se seguiram a cada intervenção. O encontro reuniu mais de uma centena de participantes contando com os autores das comunicações. No prefácio das actas, os editores, John W. Eaton, Diane K. Konzen e James G. White, começam por esclarecer que a conferência “[...] foi realizada para explorar, e não para afirmar, a utilidade do eritrócito como um modelo para determinados aspectos celulares e moleculares do envelhecimento” (Eaton *et al.*, 1985: xix). Prosseguem, conforme o trecho aqui

citado inicialmente, notando a complexidade do organismo inteiro à qual atribuem dificuldades no avanço da investigação a respeito do fenómeno; apresentam de seguida a simplicidade do eritrócito de mamíferos, juntamente com o conhecimento profundo que existia na altura acerca da célula, como aspectos promissórios relativamente ao valor dos estudos em eritrócitos. Acrescentam então:

As várias contribuições a esta conferência dão suporte à ideia de que o eritrócito pode servir como um modelo valioso para esses processos de envelhecimento que afectam proteínas estruturais, enzimas, membranas e metabolismo celular geral. O conhecimento destes últimos eventos deverão, em última análise, ser de utilidade na decifração do fenómeno de envelhecimento em células mais complexas e em organismos intactos. (Eaton et al., 1984: xix)

É de notar ainda que foram dedicadas a estas actas algumas recensões publicadas na literatura especializada. Nesses textos (Hudson, 1986; Lewis, 1986) é saliente o entusiasmo transmitido na conferência acerca da conveniência do eritrócito como modelo no estudo do envelhecimento bem como o facto de que esta ideia é questionável.

Uma outra iniciativa que parece igualmente importante destacar, no sentido de ter sido um esforço colaborativo para a “construção” do eritrócito como modelo experimental para estudo do envelhecimento, é o simpósio “*Red Blood Cell Aging*”, decorrido em Urbino, Itália, de 24 a 26 de Setembro de 1990. O prefácio do livro de actas desta reunião vai um pouco no mesmo sentido do se referiu a respeito da conferência de Minneapolis – o eritrócito é um modelo adequado ao estudo do processo de envelhecimento e poderá proporcionar conhecimento a diferentes níveis de organização. Fazendo uso das palavras dos editores destas actas, “o eritrócito pode ser um modelo útil para elucidar alguns fenómenos básicos do envelhecimento em células mais complexas e em organismos intactos” (Magnani & De Flora, 1991: v) –, mas acrescentam uma série de considerações de ordem prática. Valerá aqui a pena citar por extenso:

O eritrócito é um modelo muito adequado para o estudo do envelhecimento ao nível celular e molecular. Não é só a questão da sua aparente simplicidade em termos de bioquímica, biofísica e fisiologia, mas mais provavelmente o facto de que esta célula proporciona uma grande possibilidade para a elucidação de alguns problemas básicos no processo de envelhecimento. De facto, hoje em dia, é possível seguir células individuais ao longo de seu tempo de vida em circulação, é possível obter essas células quando novas, de média idade ou velhas e é possível obter células de indivíduos de idades determinadas e fazer a sua transfusão em receptores compatíveis para investigar o papel do ambiente no qual a célula vive, e finalmente é possível manipular com facilidade o conteúdo celular em termos de actividades

enzimáticas e/ou propriedades metabólicas para investigar o efeito destas manipulações na sobrevivência da célula. (Magnani & Flora, 1991: v)

As afirmações de índole prática são relevantes indicando um outro tipo de vantagens na escolha do eritrócito como modelo – nesta célula (ou usando esta célula) muita investigação é exequível. O número de artigos publicados no livro de actas é também no caso desta reunião de cerca de trinta. Entre os autores dos artigos incluídos na publicação, também aqui se encontram vários dos autores mais produtivos no campo conforme a análise bibliométrica apresentada anteriormente (veja-se o Capítulo 3).

Em certo sentido estas iniciativas, representando um esforço colaborativo no proposito de explorar o eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento podem ser interpretadas como tentativas de padronização de procedimentos.

5.4. O modelo eritrocitário do envelhecimento

Tomar atenção à cultura material de laboratório é um interesse que perpassa toda a investigação no âmbito desta tese e, nesse sentido, importa explorar o desenvolvimento tanto de conteúdos do conhecimento a respeito do fenómeno de envelhecimento como do processo de aquisição desse mesmo conhecimento. Reconhecendo a centralidade da experimentação e de objectos materiais na condução da mudança científica, o objectivo específico da análise neste ponto é o de explorar a vida do modelo eritrocitário no estudo do fenómeno de envelhecimento. A escolha de um dado modelo experimental em relação com a dinâmica de produção de conhecimento nas ciências da vida e biomedicina constitui um debate primordial no propósito da tese e, assim, vejamos então.

O recurso a sistemas modelo no âmbito das ciências naturais tem sido extensamente estudado dos pontos de vista de história, filosofia e estudos sociais da ciência, existindo uma literatura abundante a este respeito. No capítulo introdutório de *“Science without Laws: Model Systems, Cases, Exemplary Narratives”* (Creager *et al.*, 2007), os autores exploram o que significa ser um modelo em biologia – um sistema modelo neste contexto é um “organismo, objecto ou processo seleccionado como exemplar para investigação intensiva de uma característica da vida amplamente observada” (ibidem: 5). Analisam ainda o que torna o caso dos organismos modelo especial quando comparado com o de outros modelos experimentais, referindo nomeadamente a padronização destes organismos no sentido de facilitar o necessário elevado controlo de condições

experimentais. Os materiais biológicos são variáveis e complexos, havendo um interesse claro no desenvolvimento de modelos padronizados.

A história do eritrócito como modelo não se centra neste interesse. Não será difícil defender a ideia de que um dos aspectos que têm vindo a pesar na sua eleição para este tipo de abordagem será a possibilidade de conduzir estudos em células humanas e isso apesar da variabilidade individual. Por um outro lado, é bem patente nas narrativas dos investigadores sobre o valor do eritrócito como modelo para estudos do envelhecimento até aqui apresentadas que as peculiaridades desta célula, e nomeadamente a sua simplicidade, são insistentemente apontadas como uma vantagem no sentido do seu valor como modelo experimental, havendo também referência ao profundo conhecimento existente acerca da célula.

Mas, o que quer dizer ser um modelo experimental? Foram referidos atrás alguns apontamentos de Creager e colaboradores. Vejamos melhor esta questão. Hans-Jörg Rheinberger, sublinha algumas características deste tipo de modelos e do modo como são utilizados tais como: serem “objectos privilegiados de manipulação” (1997: 91). Para Rheinberger, modelos experimentais são objectos “ideais” de investigação proporcionando cenários – e espaços de representação – onde as questões se desenvolvem e podem ser respondidas no seio de um dado sistema experimental. E refere:

O bioquímico fala de “substâncias modelo”, de “reações modelo”, de “sistemas modelo”, ou mesmo de “organismos modelo”. [...] Os jogos de linguagem da prática científica sugerem que as coisas modelo são substâncias, reacções, sistemas ou organismos particularmente adequados para a produção de inscrições. O poder destas “generalidades materiais” reside na sua capacidade de serem disseminadas através dos capilares de uma cultura experimental. Mais precisamente, elas criam anastomoses através da sua propagação. Modelos são [...] objectos “ideais” de investigação segundo dois aspectos: Primeiro, são especialmente adequados para manipulação experimental. Este é o significado prático de ideal. Segundo, são objectos idealizados no sentido em que são, em certo grau e sob alguns aspectos, entidades padronizadas, reduzidas, purificadas, isoladas, [...] que podem ser transportadas e sujeitas a modificações locais. (Rheinberger, 1997: 108-109)

O eritrócito será um objecto ideal de investigação segundo esses dois aspectos. Primeiro, porque o eritrócito é especialmente adequado a manipulação experimental, quer pela sua disponibilidade quer pela sua simplicidade, e depois como “objecto idealizado”, aqui também pela sua simplicidade. O eritrócito como modelo experimental oferece características gerais e uma série de peculiaridades que no seu conjunto fazem dele um modelo privilegiado. Ser desprovido de ADN e

de maquinaria de síntese proteica é uma dessas singularidades que, como anteriormente referido, torna esta célula um palco excepcional para o estudos de danos ou alterações pelo envelhecimento na medida em tais ocorrências serão nesta célula observadas sem influência (ou com influência mínima) de fenómenos de reparação. Neste sentido, a simplicidade estrutural do eritrócito torna-o um objecto privilegiado de manipulação. Mas as implicações desta simplicidade estrutural são maiores. Quando se considera, por exemplo, o facto de que a única membrana no eritrócito é a membrana que limita a célula, fica claro que isso torna mais fácil o seu estudo. A respeito do estudo do envelhecimento, o eritrócito é também, ou foi assim durante muito tempo entendido, um objecto privilegiado de manipulação pela facilidade de uma separação de células baseada na densidade. Na verdade, pelos diferentes modos possíveis de seguir o fenómeno de envelhecimento destas células. Magnani e De Flora (1991) referem-se a este aspecto prático no prefácio das actas da reunião *“Red Cell Aging”* como anteriormente se citou. Essa questão da abordagem do envelhecimento eritrocitário pelo estudo de fracções de células de diferentes densidades é crucial para a compreensão da dinâmica destes estudos e ainda será analisada em maior detalhe mais tarde (veja-se o Capítulo 7).

Voltando à análise de Creager e colaboradores (2007), haverá ainda que fazer referência ao facto de que os sistemas modelo se auto-reforçam, isto é, quanto mais estudados são, maior será o número de perspectivas a seu respeito e assim mais robusto será o seu estabelecimento enquanto modelo. O eritrócito como modelo para estudos do envelhecimento gozará desta qualidade como, de certa forma, foi defendido por Eaton e colaboradores no âmbito da realização da conferência *“Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as A Model”* (1985) atrás mencionada e conforme a citação no início deste capítulo.

Elevado conhecimento a respeito da célula, simplicidade e singularidade são pois aspectos que se destacam do valor do eritrócito como modelo. Para além disso, a virtude do eritrócito como modelo para estudos do envelhecimento parece residir em grande parte naquilo que a célula não contém. Este aspecto é ainda visível no que se pode designar por uma renovação do modelo, que segue a reinterpretação do fenómeno no sentido de implicar etapas de apoptose na remoção eritrócitos, quando esta célula, desprovida de núcleo e de mitocôndrias, acaba por ser apresentada como ideal para o estudo de alguns aspectos de um fenómeno que depende da sua presença e até então era entendido como sendo aí impossível.

Capítulo 6. Outros Contextos dos Estudos do Envelhecimento Eritrocitário

[C]oda *n.f.* 1 parte final de um trecho de música, na qual, em regra, se recordam os temas fundamentais
2 final [...]

– Dicionário da Língua Portuguesa, 2012: 373

Para além do laboratório de investigação e dos seus cruzamentos com a clínica – exploram-se agora outros contextos nos quais a produção de conhecimento científico está também presente. A análise que aqui se inclui parte da convicção de que neste desvio se pode ganhar visibilidade sobre o campo de estudos do envelhecimento eritrocitário, tendo sido considerados nesse propósito os casos da formação científica e da comunicação de massas. Entre outros aspectos, a responsabilidade social dos cientistas requer que estes “partilhem o seu conhecimento, comuniquem com o público e eduquem a geração mais nova”, afirma-se no relatório da “*World Conference on Science*” (*Science for the Twenty-First Century: A New Commitment*, 2000: 466), promovida pela UNESCO em 1999. Claro está que a afirmação citada não se refere a uma nova orientação da actividade dos cientistas, mas antes ao reconhecimento da importância desses aspectos na actividade que desenvolvem. Voltemos às primeiras décadas do século XX. Como se referiu anteriormente (veja-se o Capítulo 2), elaborando sobre a construção colectiva da ciência, Ludwik Fleck introduz a noção de colectivo de pensamento científico e apresenta-o como sendo constituído por diferentes círculos, os quais envolvem especialistas e leigos – os círculos esotérico e exotérico (1986 [1935]). De certa forma, retomam-se aqui os círculos de Fleck e explora-se a presença dos estudos do envelhecimento eritrocitário em dois quadros adicionais. O primeiro – o da formação científica de nível universitário, nomeadamente através dos livros de texto (e também de manuais) aí usados –, situado ainda no âmbito do círculo esotérico; o outro – o das notícias dirigidas a públicos não especializados –, já no âmbito do círculo exotérico. O que segue não resulta de uma pesquisa exaustiva de cada um dos casos e, assim, talvez não tenha a robustez de um capítulo e não devesse ser apresentado como tal. Leia-se como “coda”, um final em que se recordam alguns temas principais dos capítulos anteriores desta parte da tese.

6.1. Narrativas na formação científica

Considere-se então o caso da formação científica pré-graduada de nível universitário. A ideia da presente análise é pois a de explorar narrativas acerca do envelhecimento eritrocitário. Procura-se fazer isso nomeadamente através dos textos usados nesse âmbito – são esses os documentos que aqui se examinam do ponto de vista do entendimento que expressam acerca do fenómeno. Para uma melhor compreensão do papel de diferentes tipos de textos na dinâmica da ciência, vejamos antes de mais como Fleck analisa as características de um colectivo de pensamento científico e, em particular, naquilo que se refere à coexistência de diferentes círculos. Descreve o autor:

O investigador criativo e mais instruído num problema [...] forma, enquanto “perito especializado”, o ponto central do círculo esotérico deste problema. A este círculo pertencem também, enquanto “especialistas gerais”, os investigadores que trabalham em problemas similares [...]. No círculo exotérico encontra-se toda uma ampla gama de “diletantes instruídos”. O primeiro efeito da estrutura geral do colectivo de pensamento científico consiste, portanto, na oposição entre o saber especializado e o popular. A riqueza deste campo faz com que tenhamos de delimitar dentro do círculo esotérico especializado, uma esfera de especialistas particulares e outra de especialistas gerais; paralelamente distinguiremos entre ciência de revistas e ciência de manuais, as quais juntas constituem a ciência especializada. Uma vez que a iniciação à ciência se realiza de acordo com métodos pedagógicos específicos, teremos também de nos referir à ciência dos livros de texto como a quarta-forma sócio-intelectual – e a menos importante neste contexto – do colectivo de pensamento científico. (Fleck, 1986 [1935]: 160)

Tanto os manuais como os livros de texto surgem pois no âmbito do círculo esotérico. Antes de entrar nos detalhes desses livros a respeito do problema do envelhecimento eritrocitário, será ainda oportuna uma referência à análise de Thomas S. Kuhn sobre este tipo de documento. Na tese que desenvolve na “Estrutura” (1996 [1962]), o autor fala do modo como a dinâmica de produção do conhecimento científico é aí truncada. Mencionou-se esse aspecto anteriormente (veja-se o Capítulo 2) – Kuhn refere-se aos livros de texto como “veículos pedagógicos para a perpetuação da ciência normal” (ibidem: 137), sendo que, por isso, a sua história (e as suas histórias) fica aí quase ausente. Assim:

Por razões que são ao mesmo tempo óbvias e altamente funcionais, os livros de texto de ciência [...] referem-se apenas àquela parte do trabalho dos cientistas do passado que pode facilmente ser visto como contribuições para a formulação e resolução dos problemas do paradigma constante nesses textos. Em parte devido a selecção e, em parte, a distorção, os cientistas de épocas anteriores são representados implicitamente como tendo trabalhado

acerca do mesmo conjunto fixo de problemas e de acordo com o mesmo conjunto fixo de cânones que a mais recente revolução na teoria e método científico fez parecer científicos (Kuhn, 1996 [1962]: 138)

A expectativa a respeito desta análise não é pois a de encontrar em cada texto uma descrição da evolução do entendimento do fenómeno, mas antes a de poder, a partir das diferentes narrativas, referentes a diferentes enquadramentos disciplinares e também a diferentes tempos, melhor perceber o que é e como evolui o conhecimento que a cada momento é tido como consensual.

Entremos então no cenário dos textos usados no ensino nas ciências da vida e biomedicina para explorar o modo pelo qual são apresentadas neste contexto as questões do envelhecimento eritrocitário e renovação da população de eritrócitos no sangue. O problema toma aspectos muito diferenciados pelo que se entendeu fazer esta análise no âmbito de diferentes enquadramentos disciplinares dentro dessa grande área do conhecimento. Nesse sentido, e porque era importante cobrir a área de hematologia – um domínio central na investigação do fenómeno (veja-se o Capítulo 3, secção 3.3) –, interessou não restringir as fontes a livros de texto. Efectivamente, neste domínio, um dos textos fundamentais que vem sendo usado é um manual. Tendo interessado olhar ainda a área de (bioquímica e) biologia molecular – nota-se que esta é igualmente uma área importante das publicações relacionadas com o envelhecimento eritrocitário –, bem como de histologia, na procura de um retrato morfológico, o estudo efectuado incidiu sobre quatro manuais/livros de texto – *“Hematology”/“Williams’ Hematology”*, *“Molecular Biology of the Cell”*, *“Histologia Básica”*, *“Wheater’s Functional Histology”* –, os quais, pela sua utilização comum, podem ser considerados representativos relativamente a cada um desses domínios do conhecimento biológico e biomédico²¹. Vejamos então o que descrevem esses diferentes textos.

“Hematology”/“Williams’ Hematology”

Editado por Williams e colaboradores, *“Hematology”*, (ou *“Williams Hematology”* a partir da edição de 2001), é um texto usado no âmbito das ciências farmacêuticas para o ensino da hematologia. Analisou-se uma série de edições, da terceira à quinta, de 1983, 1991 e 2001, respectivamente, as quais cobrem um período importante relativamente à investigação em torno do envelhecimento eritrocitário (veja-se o Capítulo 3). Interessou particularmente o capítulo dedicado à destruição

²¹ Esta selecção teve como critério o seu uso continuado em cursos da U.Porto.

de eritrócitos, da autoria de diferentes especialistas nestas três edições (Cooper & Jandl, 1983; LaCelle, 1991; Beutler *et al.*, 2001).

Ao longo destas edições é patente uma evolução da descrição do conhecimento acerca do processo. Começando pela terceira edição, tem-se:

*Embora exista uma quantidade de dados considerável descrevendo o modo de destruição de eritrócitos anormais, conhece-se relativamente pouco sobre o envelhecimento eritrocitário normal e o modo de destruição de células senescentes. Têm sido descritas uma variedade de alterações no eritrócito à medida que este envelhece, embora o seu significado, **se algum**, na destruição final da célula seja desconhecido. (Cooper, 1983: 378; ênfase adicionada)*

Será importante destacar nesta descrição a observação sobre uma eventual falta de significado na destruição final das células das alterações que se observam com seu envelhecimento normal. Na edição seguinte continua uma anotação sobre a escassez de informação a respeito do envelhecimento eritrocitário, mas adianta-se já algo mais. Assim:

Apesar do conhecimento do tempo de vida aproximado do eritrócito, a informação relativa aos mecanismos de destruição eritrocitária normal é limitada. Um mecanismo satisfatório para a eliminação de eritrócitos senescentes e defeituosos deve incluir meios para capturar células em fluxo, sistemas para identificar as células a serem removidas, e um processo fagocítico para catabolizar as células seleccionadas. As características da vasculatura de órgãos específicos tais como baço, fígado e medula parecem proporcionar um tal mecanismo e este capítulo descreve os processos envolvidos na destruição normal e acelerada de eritrócitos. (LaCelle, 1991: 398)

Há que recordar que no período compreendido entre estas duas edições, que cobre grande parte da década de oitenta, houve um grande crescimento do número anual de publicações relacionadas com o fenómeno de envelhecimento eritrocitário (veja-se o Capítulo 3). A descrição mais detalhada que se pode encontrar na edição de 1991 reflectirá isso mesmo. Mas será interessante notar o avanço que é incluído na edição de 2001. Continuando aí presente uma nota sobre o facto de permanecer aberta a questão, é agora enfatizada a perca da assimetria da distribuição de fosfolípidos na membrana. Citando em extensão:

Os eritrócitos humanos normais possuem um tempo de vida finito de aproximadamente 120 dias com muito escassa destruição aleatória. As alterações de senescência no eritrócito que o marcam para destruição não são inteiramente compreendidas, mas a exposição de fosfatidilserina na membrana parece ser de maior importância. (Beutler, 2001: 355)

Pode especular-se a respeito deste destaque na perspectiva de práticas experimentais – a exposição de fosfatidilserina na superfície das células velhas constitui o fundamento de um método que passou a ser proeminente na caracterização de populações celulares, com marcação específica destas células – ou ainda da generalidade do mecanismo – esta alteração ocorre na generalidade das células, não é específica do eritrócito.

“Molecular Biology of the Cell”

Um dos livros de texto fundamentais nos cursos da área das ciências da vida e biomedicina é *“Molecular Biology of the Cell”*, de Bruce Alberts e colaboradores, tendo sido por isso fundamental considerá-lo no âmbito do presente estudo. Analisou-se a série de edições da primeira à quinta, cobrindo o período de 1989 a 2008. A evolução temporal da descrição do fenómeno de envelhecimento dos eritrócitos e do mecanismo de renovação da população circulante ao longo de várias edições publicadas mostra aspectos interessantes do ponto de vista da dinâmica de produção e comunicação de conhecimento; é especialmente interessante a evolução da edição de 1994 para a de 2002. Segundo este texto, o eritrócito:

[...] não pode crescer ou dividir-se; a única forma possível de fazer mais eritrócitos é através de células estaminais. Para além disso, os eritrócitos possuem um tempo de vida limitado – cerca de 120 dias em humanos ou 55 dias em murganhos. Os eritrócitos gastos são fagocitados e digeridos por macrófagos no fígado e baço, que removem mais de 10^{11} eritrócitos senescentes em cada um de nós em cada dia. (Alberts et al., 1994: 1169)

Esta descrição mantém-se no essencial ao longo das primeiras três edições do livro, apenas o detalhe do número de células que são diariamente removidas não faz parte do texto inicial. Na quarta edição, publicada em 2002, os autores acrescentam:

Os eritrócitos novos protegem-se activamente deste destino: possuem uma proteína na sua superfície que liga a um receptor inibitório nos macrófagos assim prevenindo a sua fagocitose. (Alberts et al., 2002: 1459)

Este novo modo de apresentar a questão, que se mantém em edição posterior, é curioso. Sendo de certa forma uma inversão do problema do destino dos eritrócitos circulantes, a ênfase é não no envelhecimento destas células durante o período em que se encontram em circulação mas antes no facto de que essas se mantêm na corrente sanguínea enquanto conservam à sua superfície uma proteína que inibe o

processo de reconhecimento de células para remoção. A passagem não especifica referência à identificação da proteína envolvida no processo. Dos dados apresentados anteriormente (veja-se o Capítulo 3), pode admitir-se que está em causa a proteína CD47, um marcador de próprio como se encontra descrita (Oldenborg *et al.*, 2000).

“Histologia Básica”

O livro de texto de Junqueira e Carneiro, *“Histologia Básica”*, é uma referência essencial na formação em morfologia, sendo genericamente usado no ensino pré-graduado nas ciências da vida e biomedicina. Nas edições analisadas (Junqueira & Carneiro, 1990, 1995, 1999, 2004), da sétima à décima, cobrindo o período de 1990 a 2004, pode notar-se a permanência sem grande alteração da descrição do envelhecimento eritrocitário e da remoção de células envelhecidas de circulação. Assim:

Durante a maturação na medula óssea, o eritrócito perde o núcleo e os outros organelos, não podendo renovar as suas moléculas. Ao cabo de 120 dias (em média), as enzimas já estão em nível crítico, o rendimento dos ciclos metabólicos geradores de energia é insuficiente e o corpúsculo é digerido pelos macrófagos, principalmente no baço. (Junqueira & Carneiro, 2004: 228)

A descrição anterior surge num capítulo dedicado a células do sangue. Encontra-se ainda informação relevante no capítulo sobre sistema imunitário e órgãos linfáticos. Tem-se aí a seguinte informação:

*Os glóbulos vermelhos do sangue têm uma vida média de 120 dias e, quando envelhecidos, são destruídos principalmente no baço. Esse fenómeno de remoção das hemácias em vias de degeneração é denominado **hemocaterese** e ocorre também, embora com intensidade muito menor, na medula óssea. Há indicações de que a redução da flexibilidade das hemácias e modificações de sua membrana são os sinais para a destruição das hemácias envelhecidas. (ibidem: 280)*

A última frase desta passagem é acrescentada na edição 1999, sendo que no restante a descrição não é alterada. A pesquisa estendeu-se ainda à terceira edição do livro (Junqueira & Carneiro, 1974), importando aqui apenas um apontamento sobre a escassa referência quer ao processo de envelhecimento eritrocitário quer ao processo de remoção selectiva de células velhas. Este facto não é surpreendente, tendo em conta o padrão de evolução temporal da produtividade científica no tópico que se apresentou anteriormente (veja-se o Capítulo 3) e que

mostra as décadas de setenta e oitenta como especialmente profícuas em termos de conhecimento produzido.

“Wheater’s Functional Histology”

Na área da histologia, foi ainda considerado um outro livro de texto de referência, o *“Wheater’s Functional Histology”*, de Young e colaboradores, tendo sido analisadas edições que cobrem o período de 1993 a 2006. Nesta última edição (Young *et al.*, 2006), tem-se o seguinte retrato:

*O tempo de vida de um eritrócito é em média de 120 dias e é parcialmente determinado pela sua capacidade em manter a forma bicôncava. Sem os organelos apropriados, os eritrócitos são incapazes de substituir enzimas que e proteínas membranares que se deterioram, levando a uma capacidade diminuída de bombear iões sódio da célula, de captar água e ao desenvolvimento de uma forma esferóide anormal. Estas células são removidas da circulação no baço e fígado [...].(Young *et al.*, 2006: 47)*

Esta descrição do tempo de vida eritrocitário mantém-se desde a terceira edição (Burkitt *et al.*, 1994 [1993]; Young & Heath, 2000; Young *et al.*, 2006), a primeira sob o título *“Wheater’s Functional Histology”*. A ênfase na influência da morfologia da célula no processo é neste texto, e como seria expectável, bem explícita e deve ser destacada.

Procurando concluir sobre o modo como o fenómeno de envelhecimento eritrocitário surge descrito nestes textos e sua evolução, há que fazer um primeiro apontamento a respeito da maneira de referir o fenómeno enfatizando um ou outro aspecto desse fenómeno. A diferença que se encontra quando se consideram os diferentes enquadramentos disciplinares é notória. Há que ter conta que o caso de *“Hematology”*/*“Williams’ Hematology”* é um pouco diferente dos restantes pois o livro, embora usado no ensino pré-graduado, é de facto um manual. Acompanha-se aqui mais de perto a evolução do conhecimento no tópico, a “ciência de revistas” para usar a expressão de Fleck. De resto, há que notar que entre autores dos capítulos em causa e editores do livro se encontram investigadores que têm um lugar relevante nos estudos do envelhecimento eritrocitário. O caso de *“Molecular Biology of the Cell”* é talvez aquele que introduz uma maior surpresa na presente análise, ao fazer a dada altura uma descrição que, tendo aí suporte, não parece ser a dominante nos artigos de revista interpretando o reconhecimento de células para remoção de um modo simétrico a esse.

Mas, ainda em relação com a questão dos livros de texto e manuais importa aqui um outro apontamento. Dado o modo como a ciência é usualmente aí apresentada, isenta da sua dinâmica, surge o interesse em saber quais os lugares ou as oportunidades para a reflexão e análise crítica sobre ciência e produção de conhecimento científico na formação de futuros cientistas. Na declaração anteriormente referida saída da “*World Conference on Science*”, na secção sobre “ciência na sociedade e ciência para a sociedade”, podemos encontrar a indicação de que os planos de estudos na formação científica devem incluir “ética científica, bem como história e filosofia da ciência e seu impacto cultural” (*Science for the Twenty-First Century: A New Commitment*, 2000: 466). Tendo em mente essa recomendação, seria difícil não considerar explorar o modo como os estudos do envelhecimento eritrocitário poderiam constituir uma contribuição interessante. A implementação de um exercício desse tipo, ou o seu estudo, está fora do âmbito desta tese. Aqui, porque vem a propósito, fica apenas uma breve reflexão sobre o que o caso poderia proporcionar no sentido de mostrar, neste contexto de ensino-aprendizagem, alguns aspectos de dinâmica da ciência; o que se segue é um pequeno excursão que parte da ideia de que a melhor resposta à questão de saber, no contexto da formação científica, quais os lugares e oportunidades para reflexão e análise crítica sobre ciência talvez seja todos, ou sempre que um tal debate se revele oportuno. Faça-se então esse desvio.

São na verdade vários os pontos de entrada que os trabalhos desenvolvidos em torno do envelhecimento eritrocitário oferecem. Será útil considerar a evolução temporal do número anual de publicações no tópico do envelhecimento eritrocitário e a partir daí organizar uma discussão nessa perspectiva? Talvez, e assim sendo, a primeira pergunta a colocar perante esses dados (para melhor referência veja-se o Capítulo 3, figura 3.3) será, naturalmente, a de saber o que estes podem dizer. Mas a questão é fértil e do debate irão surgir muitas outras interrogações. Por exemplo, relativamente à emergência do problema – como surgiu o problema biológico/biomédico do envelhecimento eritrocitário? Ou sobre o estabelecimento de sistemas experimentais – como se pode abordar no laboratório o problema do envelhecimento eritrocitário? Uma questão (não muito distante da anterior), sobre exequibilidade (“*doability*”) – quais as condições que tornam este problema exequível do ponto de vista científica? Ou ainda, sobre a emergência de novas concepções – como mudam e o que pode implicar essa mudança? E, pelo meio,

será fácil enquadrar afirmações de livro de texto. Claro está que poderão levantar-se várias outras questões, mas com estas, no final ter-se-á já uma cronologia de desenvolvimentos mais importantes. Por outras palavras, será possível construir “activamente” na aula uma cronologia de desenvolvimentos principais e, no processo, envolver os estudantes numa discussão sobre dinâmica da ciência.

Em conclusão, o alerta para este tipo de questões dentro de uma unidade curricular de ciências naturais não será difícil com o caso dos estudos do envelhecimento eritrocitário – não será também com outros casos – e essa chamada de atenção poderá ser um importante contributo na formação de estudantes de ciências.

6.2. Narrativas na interface com o público

O entusiasmo com a possibilidade de que os estudos no eritrócito pudessem ser úteis para um melhor conhecimento do fenómeno de envelhecimento biológico bem patente nos textos especializados levou a que se tivesse procurado saber o que acompanha os estudos do envelhecimento eritrocitário no seu “círculo exotérico” fleckiano e, assim, uma eventual expressão desta investigação em notícias de jornal. Tal como no caso da formação científica, o estudo não procurou ser exaustivo sendo apenas uma pequena incursão neste campo. Nesse sentido, e pela facilidade de acesso a conteúdos nessa publicação, fez-se uma breve pesquisa na versão online do diário *The New York Times*. Algumas notícias encontradas merecem aqui referência. Vejamos.

Em primeiro lugar, a notícia *“Israeli Scientists Devise Means of Identifying Red Blood Cells”* (Fellows, 1961). Publicado na edição de 27 de Agosto de 1961, o texto anuncia que cientistas israelitas tinham conseguido encontrar maneira de distinguir entre eritrócitos velhos e novos através da observação de membranas por microscopia electrónica. Em questão, o trabalho desenvolvido por David Danon e Yehuda Marikovsky, no *Weizmann Institute of Science*, em Rehovoth. Na mesma linha de afirmações que se podem encontrar em diversos artigos científicos especializados (veja-se o Capítulo 3 e o Capítulo 5), nesta notícia afirma-se ter sido “aberto um novo caminho para a investigação sobre o envelhecimento do eritrócito, o qual é uma das formas mais simples de uma célula, e assim talvez do processo de envelhecimento em geral” (ibidem). Esta ideia de que o eritrócito possa constituir um modelo privilegiado em estudos do envelhecimento, a qual como se viu anteriormente mobiliza investigadores e é apresentada como interesse desse trabalho de pesquisa, é também transmitida para públicos não especializados como

serão os leitores deste jornal. Pode especular-se a respeito com a atenção e fascínio que a possibilidade despertava na própria comunidade científica, com a necessidade de justificar financiamentos públicos ou ainda com a correspondência a expectativas por parte dos não especialistas – o fenómeno de envelhecimento biológico tem um interesse amplo, nada nos é mais familiar do que o tempo que passa e isso suscita o nosso interesse no desenvolvimento desta área de investigação. Mas parece especialmente relevante o facto de que em causa está uma possibilidade de caracterizar visualmente o processo. Este aspecto parece central no texto. Citando a descrição dos resultados:

Ao investigar a estrutura da superfície de membranas de eritrócitos com um microscópio electrónico, descobriram que as membranas não tinham todas a mesma aparência: a maioria tinha uma superfície granular, com grandes dobras concêntricas; uma minoria eram mais finas e lisas, e esticadas de tal modo que tinham ficado com relativamente poucas dessas dobras. (Fellows, 1961)

A notícia prossegue com a referência ao fraccionamento da população total por idade e, assim, a identificação de que as células novas eram as de aparência granular e as velhas as de aparência lisa. No texto não é identificada qualquer publicação dos autores com essas observações das membranas, mas os detalhes apresentados permitem associá-la a um artigo publicado no mesmo ano (Danon & Marikovsky, 1961) e no qual estão incluídas imagens de microscopia electrónica de membranas de eritrócitos novos e velhos. As diferenças do aspecto dessas membranas são claras e estão de acordo com uma série de alterações que como entretanto ficou bem estabelecido seguem o fenómeno de envelhecimento, e em especial a perda da forma de disco bicôncavo no final do tempo de vida.

Para concluir sobre esta notícia fica a nota de que a possibilidade de distinguir visualmente células novas e velhas trouxe os estudos do envelhecimento eritrocitário para a esfera popular. Eram os primórdios da microscopia electrónica (cf. Bessis, 1973 [1972]) e é fácil encontrar na imprensa dessa altura várias notícias relativas a este novo recurso no estudo das células. A este propósito, há que referir mais uma vez o trabalho desenvolvido por Marcel Bessis na caracterização ultra-estrutural de células do sangue e aqui não só pela sua presença em notícias mas sobretudo pela publicação do livro *“Corpuscles: Atlas of Red Cell Shapes”* (Bessis, 1974), destinado a não especialistas e onde a “morte do eritrócito” é ilustrada pelo processo de eritrofagocitose observado em microscopia electrónica de varrimento.

Estando o envolvimento da microscopia electrónica na investigação do envelhecimento dos eritrócitos documentada na literatura científica especializada, como se pode conferir num mapa de co-ocorrência de palavras-chave em publicações relacionadas com o envelhecimento eritrocitário anteriormente apresentado (veja-se o Capítulo 3, figura 3.6), a importância que aqui se encontra acrescenta-lhe significado e leva a que se tome mais atenção ao papel das práticas de visualização no desenvolvimento da investigação à volta do problema do envelhecimento eritrocitário.

Outra notícia que interessa referir brevemente é ainda da década de sessenta e reporta trabalho de investigação realizado no mesmo instituto e também pelo grupo de David Danon. “*Blood Cell Tests Aid Aging Study: Device to Measure Fragility Is Described by Israeli*” (Schmeck Jr., 1966) anuncia o desenvolvimento de um instrumento para medir fragilidade osmótica dos eritrócitos designado por *Fragiligraph*. Em causa um parâmetro que se sabia alterado pelo fenómeno de envelhecimento, sendo que a notícia enfatiza o interesse do equipamento na monitorização de sangue armazenado em banco para transfusão. Traz assim para o círculo exotérico esta vertente dos estudos do envelhecimento eritrocitário situada no cruzamento com a clínica e, efectivamente, algo que pela altura se encontrava em discussão entre especialistas como mostra a iniciativa “*Fragiligraph Symposium*” decorrida em Nova Iorque em 1967 (Fragiligraph symposium, 1968). No Capítulo 4 explorou-se já a ocorrência de vários cruzamentos com a clínica nos estudos relacionados com o envelhecimento eritrocitário. Também aqui, como em relação à notícia anteriormente referida, podemos observar que o facto de ter expressão em notícias, de estar presente na interface com o público, confere a este aspecto dos estudos uma relevância adicional.

As notícias mencionadas foram facilmente encontradas e são relevantes no propósito desta tese. Haverá outras...

PARTE III
SOBRE O PAPEL DE SISTEMAS EXPERIMENTAIS NA DINÂMICA DA CIÊNCIA

Capítulo 7. Entre Sistemas Experimentais, Controvérsia e Mudança

Na configuração e reconfiguração de coisas epistémicas, os cientistas encontram resistência, resiliência e recalcitração. Nem tudo serve. Se há construção, ela é constrangida.

– Rheinberger, 1997: 225

Centremos a atenção de novo no laboratório, observando de perto a sua cultura material. Haverá que perceber em maior detalhe alguns procedimentos experimentais fundamentais nos estudos do envelhecimento eritrocitário. Olhando para o modo como estes estudos foram feitos, na sua globalidade, pode notar-se o recurso a diferentes procedimentos baseados em diferenças relacionadas com a idade para isolar células de diferentes idades – caso da densidade (Pranker, 1958; Leif & Vinograd, 1964; Piomelli *et al.*, 1967; Murphy, 1973; Corash *et al.*, 1974; Rennie *et al.*, 1979; Mackie *et al.*, 1987), da fragilidade osmótica (Marks & Johnson, 1958) ou ainda de vários outros parâmetros –, a criação de uma população eritrocitária circulante especialmente “envelhecida” por supressão da eritropoiese na sequência de transfusões repetidas (Ganzoni *et al.*, 1971), o recurso à biotinilação, um processo que envolve a marcação de células com biotina para reinfusão, envelhecimento *in vivo* das células marcadas e então recuperação *in vitro* dessas células com recurso a uma cromatografia de afinidade em coluna de avidina (Suzuki & Dale, 1987) –, ou ainda o estudo do armazenamento de células na perspectiva de que essa condição, de certo modo, mimetiza o processo de envelhecimento *in vivo* (Bosman & Kay, 1988), conforme seria sugerido por vários investigadores (cf. Clark, 1988b). Esta ideia de se usar a condição de armazenamento para estudar o envelhecimento eritrocitário que ocorre *in vivo* tinha sido já mencionada anteriormente (veja-se o Capítulo 1).

Foram sendo várias as abordagens experimentais ao problema do envelhecimento eritrocitário, mas muitos dos estudos foram realizados com recurso a uma separação de células baseada na densidade como meio de obtenção de células de diferentes idades. Foi esse o caso da série de trabalhos de investigação do grupo de Marguerite Kay, que resultaram na evidência do aparecimento do designado antigénio da célula senescente. Foi esse, de facto, o caso dos trabalhos de grande

parte dos autores mais produtivos no campo dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário identificados anteriormente no âmbito da análise bibliométrica (veja-se o Capítulo 3). A relevância da separação baseada na densidade encontra-se, de resto, patente nos mapas semânticos então apresentados. A separação de células baseada na densidade merece pois destaque, sendo essencial explorar o estabelecimento de um sistema experimental centrado em frações de densidade, um sistema experimental que permitiu a obtenção de muita evidência a respeito do problema mas que, no entanto, se manteve sempre algo de controversia.

7.1. À procura de isolar células de diferentes idades

A evidência de uma correlação entre densidade dos eritrócitos e a sua idade encontrada nos anos cinquenta abriu caminho a uma série de trabalhos com vista à abordagem experimental dos estudos do envelhecimento de eritrócitos. Tinha sido já brevemente referido (veja-se o Capítulo 1 e o Capítulo 3) que esta descoberta, por Borun e colaboradores (1957), tem uma importância metodológica inequívoca pois acabou por possibilitar um meio de isolar células de diferente idade. Células de diferentes idades tornaram-se frações de densidade, tendo sido a separação de células baseada na sua densidade – implementada por diferentes investigadores de um modo mais ou menos elaborado – uma abordagem frequente nos anos que se seguiram.

Haverá que perceber melhor o que foi a contribuição de Borun e colaboradores (ibidem). Como descrevem estes investigadores, o seu trabalho demonstrou que a densidade de eritrócitos humanos aumenta com a idade das células, tendo mostrado ainda a possibilidade de isolamento de populações de células de diferentes idades médias fazendo uma separação tendo em conta esse aumento de densidade. Resumidamente, o seu trabalho consistiu em marcar eritrócitos na sua formação com o radioisótopo ^{59}Fe e então seguir ao longo de alguns meses a distribuição do radioisótopo em frações celulares de diferente densidade.

As experiências foram realizadas em oito indivíduos com doença crónica mas sem patologia do sangue, isto é, hematologicamente normais, aos quais o radioisótopo foi administrado intravenosamente. Era na altura conhecido que a incorporação do radioisótopo se limita às células imaturas da linha eritróide, ou seja, às células precursoras dos eritrócitos circulantes. No estudo da evolução temporal da distribuição do radioisótopo foi observado que a concentração de ^{59}Fe era

inicialmente mais elevada na fracção menos densa, diminuindo progressivamente com o decorrer do tempo e concomitantemente aumentando na fracção mais densa.

No artigo, os resultados são apresentados em duas figuras. A primeira é constituída por seis gráficos (dados para seis dos indivíduos incluídos no estudo) nos quais se representa a concentração do radioisótopo em função do tempo para três fracções de densidade. São claras as variações individuais apesar da tendência observada. A segunda consiste num gráfico em que, para os oito indivíduos estudados, as razões entre concentrações do radioisótopo nas fracções menos densa e mais densa, respectivamente, são representadas em função do tempo. Sendo esta a forma segundo a qual os autores reportam a correlação, a conclusão que apresentam no final do artigo é a de que “[o]s dados indicam que as camadas superior, do meio e inferior de eritrócitos centrifugados têm idade média de células jovem, intermédia e avançada, respectivamente” (ibidem: 679).

Como mencionado acima, a possibilidade de recurso a um isolamento de células de diferente idade por esta via é já apontada por Borun e colaboradores. Estes resultados de envolvendo marcação isotópica são inequívocos acerca de uma correlação entre idade e densidade da célula, mas é essencialmente essa a contribuição do artigo – apresentar evidência da correlação. A implementação (e optimização) de um procedimento prático de obtenção de fracções de diferente densidade, apesar de anunciada, não é aí tratada.

A separação de eritrócitos por idade baseada na densidade da célula que se tornou um pilar da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário não significa um procedimento único, sendo várias as maneiras de o fazer. Efectivamente, e como brevemente referido atrás (veja-se também o Capítulo 1), foram sendo usados diferentes procedimentos, incluindo a centrifugação de suspensões em meio de densidade uniforme (incluindo o próprio plasma sanguíneo) ou ainda a centrifugação em gradiente de densidade, quer gradiente contínuo quer gradiente descontínuo. Haverá que explorar com mais detalhe alguns desses procedimentos. Será importante começar por um estudo inicial sobre o envelhecimento eritrocitário com recurso a este tipo de abordagem. Fazendo uma marcação de células na sua formação com o radioisótopo ^{59}Fe , semelhante à do estudo de Borun e colaboradores e que lhe permitiu ter ideia da idade das células usadas nos ensaios, T. A. J. Pranker (1958) caracterizou eritrócitos separados com base na densidade

em termos de alguns parâmetros bioquímicos. O fraccionamento de células aqui realizado foi feito após centrifugação de suspensões de células numa solução de albumina bovina a 30%, tendo sido confirmado que os eritrócitos em diferentes camadas da coluna de células pós-centrifugação possuíam diferente idade e que apresentavam diferenças em relação aos parâmetros estudados. Este trabalho de Prankerd não é um estudo metodológico, isto é, o foco do artigo não é o desenvolvimento de um dado método. Refiro-o aqui pelo que pode mostrar do estado do conhecimento então existente. As fracções de densidade são aqui objectos epistémicos, a necessidade de incluir no estudo a marcação de células com um radioisótopo ilustra-o. De resto, é curioso notar a primeira afirmação que o autor faz na discussão de resultados – “[a] distribuição de ^{59}Fe na coluna de eritrócitos centrifugados mostra claramente que o método é um meio satisfatório de separar células velhas de novas [...]” (ibidem: 330). A marcação não surge aqui como mera avaliação da separação; pelo contrário ela parece ser necessária para se perceber que as diferentes fracções obtidas e analisadas correspondem a células de diferente idade.

O trabalho de Robert C. Leif e Jerome Vinograd (1964), por seu turno, é precisamente o desenvolvimento de um método prático baseado na densidade para a obtenção de células de diferentes idades. Estes investigadores reportam a implementação de uma separação em gradiente de densidade, fazendo referência à dificuldade que existe na recolha de células em separações em meio de densidade uniforme – “[a] massa de células empacotadas é difícil de fraccionar”, notam (ibidem: 520). Este artigo “descreve um método para o fraccionamento quantitativo de eritrócitos num gradiente linear de albumina sérica bovina” (ibidem). De acordo com a sua natureza metodológica, são pormenorizados os aspectos práticos. Primeiro, sobre a preparação dos gradientes lineares de densidade, depois sobre a aplicação das células nos gradientes, a centrifugação, os inúmeros controlos (incluindo a verificação de que as células se separam no gradiente com base na sua densidade). Será de referir por último que os autores complementam o trabalho com exame das fracções por microscopia.

O estudo de Daniel J. O’Connell e colaboradores (1965) contempla procedimentos de sedimentação, flutuação e centrifugação, e apresenta uma série de detalhes interessantes relativos à recolha de fracções. Assim, no caso das experiências sobre a sedimentação, para remover amostras de células inseriram um tubo de vidro até à altura desejada, sendo que a extremidade inferior desse tubo tinha sido

dobrada em forma de J no sentido de permitir a aspiração da amostra com perturbação mínima das células abaixo. No caso das experiências de centrifugação, as camadas de células foram removidas com uma seringa e agulha, sendo que esta tinha abertura lateral em vez da usual extremidade aberta para permitir retirar apenas as células localizadas ao nível da abertura e perturbação mínima das células abaixo na coluna. E para o controlo da profundidade da abertura da agulha desenvolveram um sistema sofisticado para montar a seringa e rodar o tubo contendo as células para permitir que todas as células localizadas a um determinado nível fossem recolhidas. O'Connell e colaboradores iniciam a discussão afirmando que “[o] valor da centrifugação como técnica para separar células de diferentes grupos de idade não carece de mais suporte experimental” (ibidem: 779). Os autores defendem que os seus resultados mostram que as precauções relativamente a uma redistribuição de células na recolha de fracções contribuíram para um método melhorado e reproduzível de separar eritrócitos para estudo posterior, sendo que o sucesso da separação será em grande medida dependente da adequação do procedimento de recolha de fracções de densidade. O recurso a gradientes descontínuos de densidade de certo modo contorna este problema de uma redistribuição de células durante a recolha de fracções. Quando se olha para o gradiente descontínuo na fotografia na figura 1.5 (veja-se o Capítulo 1), na qual se podem observar bandas discretas²², a afirmação é facilmente entendida. O artigo de Sergio Piomelli e colaboradores (1967) é a esse respeito pioneiro, apresentando uma análise das vantagens do recurso a separação em gradiente descontínuo de densidade. Nesse trabalho, os investigadores fizeram a separaram de eritrócitos de coelho em fracções de diferentes densidades com recurso a um gradiente descontínuo de albumina sérica bovina. Como descrevem:

Esta técnica aproveita completamente as pequenas diferenças no peso específico, uma vez que é atingido um equilíbrio de densidade, resultando num grau de resolução mais elevado. Os grupos de células assim divididas foram facilmente separadas sem remistura e foram usadas para avaliar a relação entre o peso específico e a idade das células com ¹⁴C-glicina como marcador de idade. Foi feita uma comparação entre o grau de fraccionamento obtido com esta técnica e o obtido por ultracentrifugação na ausência do gradiente. (ibidem: 660)

²² É irrelevante, neste propósito, qual o meio usado para a construção do gradiente, nesse caso diferente do usado neste artigo de Piomelli e colaboradores (1967), sendo importante apenas o facto de que trata de um gradiente descontínuo.

Trata-se da implementação de um novo método e portanto, como já se referiu anteriormente a propósito do estudo de Prankerd, complementar o estudo com determinação da idade das células por marcação isotópica é essencial.

Mais tarde, sai do mesmo grupo um trabalho que descreve a separação de eritrócitos por idades num gradiente simplificado (Corash *et al.*, 1974). O procedimento é essencialmente o mesmo, o meio utilizado para a preparação dos gradientes descontínuos é que é diferente e apresenta algumas vantagens – segundo os autores, é fácil a preparação soluções de arabinogalactano com densidade definida bem como com controlo de outros parâmetros como a sua tonicidade (avaliada pela osmolaridade) e acidez/basicidade (avaliada pelo pH). O controlo deste últimos parâmetros é essencial para que a separação seja efectivamente uma separação baseada na densidade e, neste aspecto, o arabinogalactano trazia vantagens claras. Para além disso, o arabinogalactano – um produto de origem vegetal – era considerado biologicamente inerte; recorde-se aqui que, no âmbito dos trabalhos desenvolvidos mais tarde por este mesmo grupo, se procurava implementar a preparação de células novas para transfusão envolvendo nesse procedimento uma separação em gradiente de arabinogalactano (veja-se o Capítulo 4). Na altura em que foi desenvolvido este primeiro estudo, o arabinogalactano disponível comercialmente não tinha pureza adequada pelo que, no artigo, os autores descrevem ainda como fazer essa purificação. Ou seja, o arabinogalactano apresentava na altura a grande desvantagem de não estar disponível comercialmente numa forma purificada. Esse problema foi entretanto resolvido e quando no âmbito do trabalho desenvolvido no grupo da U.Porto anteriormente apresentado (veja-se o Capítulo 1) foram feitas separações de eritrócitos humanos em gradiente descontínuo de densidade de arabinogalactano baseadas neste procedimento de Corash e colaboradores já não era necessário fazer essa purificação.

Tendo em conta esse problema na preparação de gradientes de arabinogalactano, Carolyn M Rennie e colaboradores implementaram um fraccionamento de eritrócitos em gradientes de Percoll que apresentam como rápido (1979). Já se tinha mencionado (veja-se o Capítulo 1) este meio como contendo partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona. Rennie e colaboradores notam a sua disponibilidade comercial e por isso a sua escolha. No artigo, reportam o estabelecimento de um método para o fraccionamento de eritrócitos por idades, num gradiente contínuo de densidade, em que recorrem ao estudo de uma série de

parâmetros eritrocitários que se sabia sofrem alteração com o avanço da idade da célula, volume da célula, concentração em hemoglobina, actividades enzimáticas e teor em ião potássio. Estes investigadores descrevem as vantagens do Percoll como sendo a rapidez com que se consegue fazer a separação, o facto de que proporciona uma distribuição por de células por densidade numa ampla gama de valores, a facilidade com que essa gama de densidade pode ser alterada e, finalmente, ser pouco dispendioso e estar disponível comercialmente em estado puro. Como referido, o arabinogalactano foi entretanto disponibilizado comercialmente numa forma já purificada (actualmente pode ser adquirido como Larcoll, na Sigma), mas será de notar que, relativamente ao recurso ao Percoll, e devido a uma maior viscosidade, permanece a desvantagem de ser necessária uma centrifugação dos gradientes a uma aceleração centrífuga mais elevada e assim a necessidade de recurso a equipamento mais sofisticado.

Antes de concluir sobre separações de células baseadas na densidade será interessante recuar de novo no tempo para olhar um trabalho desenvolvido por David Danon e Yehuda Marikovski (1964). Trata-se não do desenvolvimento de um método preparativo com o isolamento de células de diferente idade, mas antes da determinação do perfil de densidades de uma população de eritrócitos. Eram os primórdios das separações por densidade e que este estudo mostrou foi que seria possível fazer a determinação do perfil de densidades de uma população de eritrócitos com sedimentação num conjunto de capilares com soluções de ésteres de ftalato de diferente densidade. Claro está que este método poderia ter interesse no âmbito de um estudo fundamental do envelhecimento eritrocitário, mas salienta-se aqui o facto de que a reprodutibilidade do método permitiu que os investigadores elaborassem acerca do seu potencial para fins de diagnóstico. Esta referência mostra mais uma vez a ligação destes trabalhos o mundo da clínica.

Embora muitos grupos de investigação tenham recorrido a uma separação de células baseada na densidade, foram usadas diferentes variantes do método. Esta variedade de detalhes dos procedimentos parece indiciar que a separação baseada na densidade não chegou a ser objecto técnico no sentido usado por Rheinberger (cf. 1997), uma coisa epistémica suficientemente estabilizada de tal forma que passa a fazer parte do repertório técnico do arranjo experimental, uma espécie de caixa negra. Com efeito, o fraccionamento da população total por densidade,

juntamente com o estabelecimento de marcadores de idade, manteve-se ela própria um objecto de controvérsia como se explora nas secções seguintes.

7.2. Entre marcadores de idade e sinais para a remoção de células velhas

A avaliação da obtenção de células de diferente idade requer a determinação de marcadores de idade. Claro está que os trabalhos de marcação isotópica de células na sua formação, de que se falou quando da referência às determinações do tempo de vida do eritrócito (veja-se Capítulo 4), ou na secção anterior, no âmbito da implementação de procedimentos para um fraccionamento baseado na densidade das células, não constitui um processo prático ou exequível no âmbito da maior parte dos estudos. A procura de marcadores de idade surge assim como um interesse importante também do ponto de vista prático, tendo motivado vários dos estudos levados a cabo. A falta de um marcador inequívoco para células senescentes, que permita avaliar o isolamento dessa população de células, isto é, que permita confirmar se uma dada fracção de células é mesmo constituída por células velhas no limite do seu tempo de vida, acabou por ser um problema. Vários investigadores se referem a isto. Margaret R. Clark escreve exactamente isso: “[u]ma das dificuldades em avaliar métodos para o isolamento de células senescentes é a falta de um marcador inequívoco para a população de células senescentes” (1988b: 515). Refere de seguida os estudos de uma série de enzimas que sofrem diminuição da sua actividade ao longo do tempo de vida do eritrócito, ou ainda o teor em creatina da célula. Mas refere igualmente as dificuldades na interpretação de resultados relativos a esses potenciais marcadores. Apresenta então outros candidatos possíveis – hemoglobina glicada, proporção de componentes da proteína membranar 4.1.

Relativamente a enzimas e o seu uso como marcadores de idade, haverá que fazer aqui uma referência adicional. O declínio da actividade de algumas enzimas eritrocitárias com o envelhecimento da célula foi extensamente explorado por Ernest Beutler (cf. 1988b), sendo interessante notar a discussão que este investigador protagoniza a propósito de enzimas e no sentido de se saber se as células são removidas enquanto ainda não apresentam um comprometimento funcional significativo ou antes porque já o apresentam. Beutler entende ser mais plausível a primeira possibilidade. A questão que aqui está em discussão é, de certa forma, relacionada com o problema das escalas. Um marcador de idade não será necessariamente um sinal para a remoção de células. O eritrócito envelhece,

havendo uma série de alterações que acompanham esse processo. Mas se o interesse é perceber o que determina a remoção das células, será preciso fazer um apelo ao nível de organização mais elevado. Continuemos esta discussão no contexto da análise de controvérsias na secção seguinte.

7.3. Diferentes objectos e controvérsias

A controvérsia que se gerou a respeito do fraccionamento baseado na densidade das células como meio de obtenção de células de diferente idade e, em especial, de células velhas, acompanhou o recurso a esse procedimento, conforme observado no final da secção 7.1. Mencionou-se anteriormente que o fraccionamento por densidade, não sendo o único método foi sem dúvida um método relevante na sua ampla utilização. De um dos lados desta controvérsia esteve Ernest Beutler que foi manifestando regularmente a sua reserva em relação às fracções de densidade. Esse debate está bem documentado em “*Red Cell Senescence*”, o número especial da revista *Blood Cells* já por várias vezes mencionado ao longo da tese. Fá-lo no editorial do volume, “*Isolation of the aged*” (1988a), repetindo essa ideia num outro artigo no mesmo volume e ainda em discussões que seguem artigos de outros autores. No referido editorial, Beutler afirma:

A conveniência é importante na escolha de métodos a serem usados em ciência, mas não deve ser usada como substituto de rigor. Não há um método simples de isolar eritrócitos velhos, mas existem presentemente métodos que permitem obter células velhas. Embora muito mais difíceis de implementar do que a simples centrifugação de eritrócitos num gradiente de densidade, proporcionam preparações relativamente puras de eritrócitos velhos. A sua aplicação deverá proporcionar-nos dados menos ambíguos acerca daquilo que realmente acontece quando a célula atinge o final do seu tempo de vida. (Beutler, 1988a: 4)

Em “*The relationship of red cell enzymes to red cell life-span*” (1988b), volta a tocar no assunto, escrevendo ser “lamentável que mesmo em 1987 tantos investigadores, alguns sendo cientistas distintos publicando em revistas proeminentes [...], continuem a considerar células “densas” como sendo equivalentes a células “velhas” (ibidem:71). Na discussão que se segue a este artigo, Hans U. Lutz (1988) nota esta frase de Beutler para a reformular no sentido de dizer que será lamentável que tantos investigadores continuem a reclamar ter isolado células de uma determinada densidade sem mostrar evidência por uma segunda sedimentação das fracções num novo gradiente. A questão das

separações de células de diferentes idades baseada na densidade é controversa, mas a questão que se coloca é sobretudo com a identificação da população que está na eminência de ser removida. Serão estas as células difíceis de isolar.

Há pois o interesse em conseguir identificar estas células mais velhas, sendo que a este respeito, a perda da assimetria fosfolipídica da membrana, e especificamente no que se refere à fosfatidilserina (Schroit *et al.*, 1985), acabou por constituir uma possibilidade relevante. A exposição de fosfatidilserina não será tanto um marcador de envelhecimento mas mais um sinal para a remoção de células. A ocorrência é importante, não é específica do eritrócito, teve um potencial metodológico – foram desenvolvidos métodos baseados na exposição de fosfatidilserina e com recurso à citometria de fluxo e/ou à separação imunomagnética de células – e está implicada no processo remoção de células apoptóticas. Em estudos recentes, vários investigadores têm vindo a recorrer a este procedimento (a par ou não de um fraccionamento por densidades).

Capítulo 8. “No Nível de Dez Angströms” – Trocando Escalas para uma Visão Completa?

Certamente, aproxima-se depressa o dia em que morfologista, químico e físico se encontrarão em terreno comum. No nível de 10 angströms, a química pode ser morfologia e a morfologia física! Assim, as complexidades são simplificadas, e o simples torna-se mais complexo do que nunca.

– Bessis, 1958: 412

A descoberta de que, com o aumento da idade do eritrócito, ocorrem nesta célula importantes alterações a nível morfológico, conduz a um olhar mais atento à cultura visual neste domínio de pesquisa. A questão que chama agora a atenção e que acabou por ser incontornável considerar é a de perceber qual o papel das práticas de representação e produção de imagens, nomeadamente a microscopia electrónica, na produção de conhecimento acerca do envelhecimento eritrocitário. Esse tipo de prática levou os estudos do envelhecimento eritrocitário para a esfera não especializada, como se apresentou já, e naturalmente teria também uma importância reconhecida entre especialistas. Na exposição que se segue, revisitam-se ou exploram-se alguns casos e procura-se reflectir sobre o papel das visualizações e do uso de imagens na dinâmica de produção de conhecimento científico, particularmente no que se refere à ocorrência de diferentes níveis de organização e análise.

8.1. Visualizações

Nas décadas de sessenta e setenta, a possibilidade de distinguir visualmente eritrócitos novos e eritrócitos velhos, trouxe a investigação neste domínio para a imprensa não especializada (veja-se o Capítulo 6); referiu-se então o caso de uma notícia de jornal relativa aos trabalhos desenvolvidos por David Danon e Yehuda Marikovsky (Fellows, 1961). Qualquer que seja a leitura que se faça acerca do que motivou esta notícia no *The New York Times*, é um facto que o registo transmite claramente o entusiasmo dos investigadores com o avanço reportado nesse texto. Para além disso, uma breve pesquisa em revistas científicas que cobrem estes

estudos mostra também esse interesse relativamente às possibilidades que a microscopia electrónica representava. O editorial por Marcel Bessis, publicado na *Blood* (1958) e ao qual pertence a citação no título e no início do capítulo, ilustra-o bem. A afirmação de que tinha então passado a ser possível “examinar células e tecidos em grande detalhe e cortar um leucócito em 800 secções!” (ibidem: 410) é um exemplo do tom entusiástico no artigo. Neste editorial, Bessis prossegue afirmando que a introdução do microscópio electrónico tinha trazido uma nova concepção da estrutura celular; agora, as macromoléculas tinham passado a ser visíveis (embora, como nota, com uma resolução ainda aquém da desejada) e, assim, a microscopia electrónica tinha estabelecido uma ligação entre a morfologia e a bioquímica. Este apontamento aproxima-se da questão das implicações que a natureza multi-escalar dos seres vivos têm no seu estudo, podendo entender-se as palavras de Bessis no sentido de que a microscopia electrónica proporcionaria oportunidade para uma articulação e integração de conhecimento referente a diferentes escalas.

A forma da célula é aqui um aspecto importante, sendo bem sabido que o eritrócito tem características morfológicas peculiares. Referiu-se anteriormente (veja-se o Capítulo 3) que se trata de uma célula altamente pleomórfica. As diferentes formas que podem ser encontradas – tanto em condição normal como patológica – e as alterações de forma que ocorrem numa variedade de circunstâncias e que seguem o envelhecimento da célula foram estudadas extensivamente por microscopia electrónica, desde a década de cinquenta, primeiro com recurso ao microscópio electrónico de transmissão e mais tarde com recurso também ao microscópio electrónico de varrimento. A contribuição de Bessis na caracterização microscópica de eritrócitos e mais genericamente de células do sangue é extensa (cf. Bessis, 1950, 1972, 1973 [1972], 1974). São, de facto várias, as frentes em que o seu trabalho se apresenta, não só entre especialistas como também na interface com públicos não especializados.

Relativamente ao eritrócito e seu envelhecimento, a alteração de forma que se sabe ocorrer é relevante sob vários aspectos e assim, a microscopia electrónica de varrimento tem especial importância no seu estudo – as imagens obtidas por este procedimento são representações da superfície exterior dos objectos, sendo portanto claras a respeito da forma desses mesmos objectos. Recorde-se que no contexto de ensino pré-graduado nas ciências da vida e biomedicina e particularmente no que se refere à histologia (veja-se o Capítulo 6), a perda da

forma de disco bicôncavo é tomada como uma alteração importante que acompanha o envelhecimento da célula, sendo o tempo de vida do eritrócito apresentado nesse contexto como parcialmente determinado pela capacidade da célula de manter a forma bicôncava. Não há contudo uma morfologia específica de eritrócito velho (cf. Beutler *et al.*, 2001) – as alterações que ocorrem com o envelhecimento da célula verificam-se também noutras condições e patologias.

Será conveniente mostrar quais são essas alterações morfológicas. As imagens incluídas na figura 8.1 foram obtidas por microscopia electrónica de varrimento, mostram eritrócitos de diferentes formas e estão organizadas no sentido de indicar alterações de forma que ocorrem próximo do final do tempo de vida da célula, com diminuição do excesso de área de superfície exterior, que caracteriza o disco bicôncavo, e aproximação a uma forma esférica.

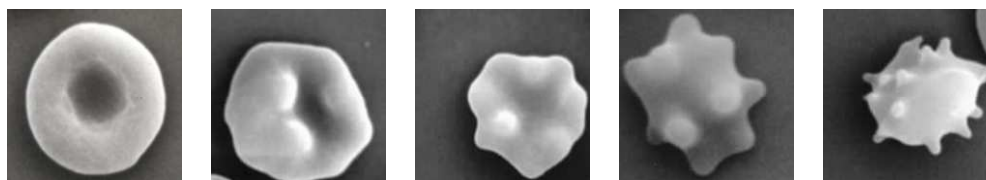


Figura 8.1. Eritrócitos humanos de diferentes formas em microscopia electrónica de varrimento. Da esquerda para a direita: discócito (primeira imagem) e diferentes equinócitos (restantes imagens). [Fonte: trabalho não publicado da autora com recurso ao serviço do CEMUP.]

As visualizações para melhor perceber características morfológicas da célula são fundamentais, mas os investigadores procuraram (e procuram) observar outras características. Podem referir-se trabalhos de Marikovsky e Danon sobre a carga superficial da membrana da células (1969), visualizações iniciais do processo de eritrofagocitose (cf. Essner, 1960; Bessis & de Boisfleury, 1970), ou ainda, visualizações da estrutura do esqueleto da membrana celular que foram possíveis mais tarde (cf. Byers & Branton, 1985; Liu *et al.*, 1987). Deve referir-se igualmente o interesse que parecia haver em mostrar o valor de diagnóstico da microscopia electrónica (cf. Lewis & Stuart, 1970).

Antes de concluir este ponto sobre visualizações, um breve apontamento do ponto de vista da biofísica ou, mais especificamente, da formação nessa área. Como se refere num dos livros de texto que têm vindo a ser aqui trazidos – “*The Physical Basics of Biochemistry*”, dirigido a estudantes da área da ciências da vida –, “[c]omo seres visuais, tendemos a preferir ‘ver’ os objectos em que estamos interessados

construindo uma sua imagem no espaço [...]” (Bergethon, 1998: 4); na sequência da passagem citada surge neste texto a informação acerca da importância do recurso à microscopia para a visualização de estrutura. Serve aqui esta citação sobretudo para documentar a afirmação de que os cientistas são treinados no sentido do reconhecimento da importância das práticas de obtenção de imagens.

8.2. Modos de ver, argumentar e compreender

Como refere Michael Lynch, “[o] problema da visibilidade em ciência é mais do que uma questão de proporcionar ilustrações para publicação” (1985: 43). Será essencial tomar atenção ainda ao modo como é veiculada ou traduzida a informação que uma imagem contém. As práticas de visualização são importantes e vários investigadores se têm dedicado a estas questões no âmbito dos estudos sobre a ciência; assim, as práticas de representação visual, incluindo a de produção de imagens, assim como a sua utilização na argumentação científica, tem sido extensamente explorada e debatida. Desde logo, Ludwik Fleck e em especial através num texto em que parte da ideia de que para ver é necessário previamente conhecer (1986 [1947]). Referem-se ainda como exemplos, trabalhos de outros autores, para além de Lynch: o texto de Bruno Latour (1986), uma série de contribuições no livro editado por Michael Lynch e Steve Woolgar (1990), o estudo de Alberto Cambrosio e Peter Keating (2000), a análise de Regula Valérie Burri e Joseph Dumit (2007), o estudo de Alberto Cambrosio e colaboradores (2008) sobre a estratégia argumentativa do uso de imagens de microscopia, ou ainda, mais recentemente, diferentes contribuições no livro editado por Luc Pauwels (2006) e, em particular, a contribuição deste autor no sentido da definição de um enquadramento teórico para este tipo de análise (Pauwels, 2006). A listagem não termina aqui, mas tome-se agora atenção às visualizações e uso de imagens no caso dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário.

Voltemos assim aos trabalhos de Marcel Bessis. Como é bem conhecido e se notou anteriormente, as contribuições deste autor na visualização de células do sangue são numerosas. Porque se entendeu central relativamente ao tópico dos estudos observados nesta tese, analisou-se mais atentamente um artigo específico deste autor publicado em co-autoria com Anne de Boisfleury: *“Étude des différentes étapes de l’erythro-phagocytosis par microcinématographie et microscopie électronique a balayage”* (Bessis & de Boisfleury, 1970). As imagens incluídas neste

artigo podem também ser encontradas no livro *“Living Blood Cells and their Ultrastructure”*, mas interessou fazer aqui uma análise mais focada, decorrendo daí a opção tomada de explorar essas imagens no contexto desse artigo. A densidade de figuras na publicação – todas incluindo fotografias – bem como a variedade metodológica subjacente à obtenção dessas imagens é significativa e merece ser explorada.

No que se segue, e porque me parecia haver um encontro dos meus interesses na análise deste artigo de Bessis e Boisfleury com os objectivos no estudo de Cambrosio e colaboradores (2008), atrás mencionado, procurei adoptar aqui a abordagem desses autores. Nesse trabalho, debruçando-se sobre exemplos da genética molecular e da imunologia, estes investigadores estudaram a estratégia argumentativa que fundamenta o recurso a imagens de microscopia electrónica como evidência decisiva. Nesse sentido, o seu estudo baseia-se na análise de dois artigos científicos específicos. Relativamente ao caso desses documentos, os autores referem que as figuras neles incluídas “derivam parte do seu poder do arranjo numa sequência que mimetiza operações experimentais” (ibidem: 131), sendo que “[o] argumento visual acompanha o relato de texto das etapas de uma experiência de bioquímica ou de genética molecular” (ibidem). E concluem que não será tanto na instrumentação mobilizada que reside a força de evidência do artigo, mas antes nas “práticas materiais e argumentativas que derivam destas utilizações desses instrumentos” (ibidem).

Explorando o artigo “Étude des différentes étapes de l’erythro-phagocytosis par microcinématographie et microscopie électronique a balayage”

Vejamos então mais de perto o artigo de Bessis e Boisfleury (1970), tomando atenção ao modo como se encontra organizado. O artigo trata da eritrofagocitose, o processo que envolve o reconhecimento de eritrócitos velhos e sua remoção da corrente sanguínea. Depois da habitual introdução para apresentar o estado do conhecimento no tópico do artigo – na qual os autores remontam a um período em ainda se admitia que a fragmentação em circulação fosse um processo relevante de destruição normal de eritrócitos –, Bessis e Boisfleury acabam por esclarecer o que avança em concreto a sua publicação. E fazem-no de um modo assertivo, peremptório, referindo que o artigo descreve – do modo mais preciso que até então tinha sido feito – as diferentes etapas do processo de eritrofagocitose, designadamente, a aderência do eritrócito à célula fagocítica, a sua ingestão e

fragmentação (antes ou durante a ingestão). A narrativa é sobretudo uma descrição visual baseada em dez figuras que incluem um total de trinta e sete fotografias. É especialmente interessante o modo como ao longo do artigo se encontram organizadas essas imagens obtidas com recurso a diferentes técnicas de microscopia. A figura 8.2²³ pretende evidenciar a sequência/alternância de texto e imagens ao longo das dezanove páginas do documento; inclui ainda informação sobre o método usado na obtenção de cada imagem, designadamente microscopia electrónica de varrimento, microscopia electrónica de transmissão, microscopia de contraste de fases ou microscopia de interferência.

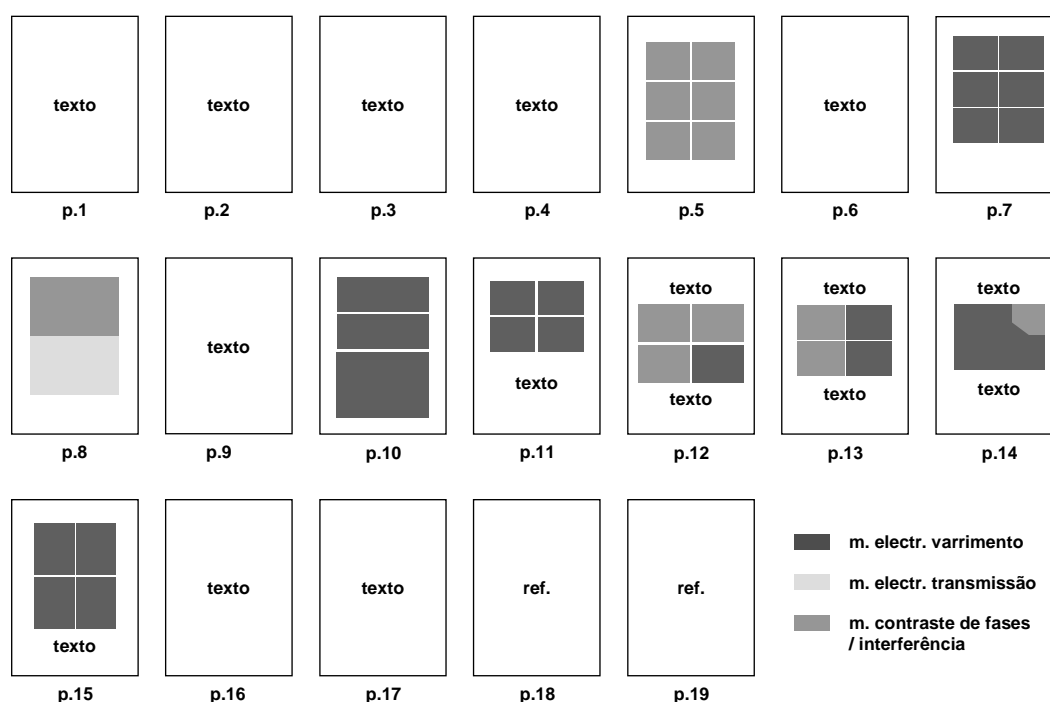


Figura 8.2. Distribuição de texto e figuras no artigo de Bessis e Boifleury (1970), destacando a sequência/alternância de métodos de obtenção das imagens, designadamente, microscopia electrónica de varrimento (“m. electr. varrimento”), microscopia electrónica de transmissão (“m. electr. transmissão”) e microscopia de contraste de fases ou de interferência (“m. contraste de fases/interferência”).

A primeira figura é uma sequência de imagens do processo de ingestão de um eritrócito por uma célula fagocítica visualizada por microcinematografia em contraste de fases, captadas em função do tempo.

²³ A representação na figura é inspirada na figura 2 do artigo de Cambrosio e colaboradores (2008). Não são tanto as fotografias que o artigo inclui que importa aqui destacar, mas antes o modo como essas imagens se encontram reunidas nas diferentes figuras e se distribuem ao longo do artigo.

A figura que se segue, por sua vez, consiste numa série de imagens de microscopia electrónica de varrimento que se referem ao mesmo desenvolvimento, o processo de ingestão de eritrócitos por células fagocíticas. O recurso ao plural na frase anterior é propositado. Efectivamente, é necessário fazer aqui uma observação a respeito do arranjo de imagens nesta segunda figura. Sendo de microscopia electrónica de varrimento, as fotografias não se referem à ingestão de um mesmo eritrócito; a microscopia electrónica envolve a fixação das células e uma série de outros procedimentos drásticos que antecedem a captação de imagem e implica que nessa altura as células já não estejam funcionais. Assim, esta segunda figura será uma justaposição de imagens correspondentes a diferentes células e nas quais o processo foi captado em diferente fase. A selecção e organização de imagens nesta figura parece procurar mimetizar aquilo que se tem na figura anterior. Feito o comentário, há que notar que a sequência de imagens do processo de eritrofagocitose nesta segunda figura é talvez, na tridimensionalidade característica da microscopia electrónica de varrimento, mais convincente. E assim, de um certo modo, estas duas figuras suportam-se mutuamente na força e na “genuinidade” da evidência que veiculam.

A terceira figura reúne imagens que evidenciam a aderência entre o eritrócito e a célula fagocítica obtidas por microscopia de contraste de fase e por microscopia electrónica de transmissão. Pode fazer-se uma nota semelhante à anterior – uma imagem de material não fixado e uma outra do mesmo processo obtida com material fixado (“morto”); o que se vê numa e noutra é diferente, mas as duas fotografias reforçam-se ou “validam-se” uma à outra.

A quarta e a quinta figuras (ambas em p.10) mostram, respectivamente, diferentes etapas do fecho da “boca” fagocítica e um fagócito após esse fecho. Há que recordar a observação feita anteriormente de que diferentes etapas significam em microscopia electrónica, de varrimento neste caso, a observação de células diferentes.

A sexta figura mostra a ocorrência de eritrofagocitose de vários eritrócitos por uma mesma célula fagocítica.

As sétima, oitava e nona figuras voltam a fazer o tipo de comparação que já se referiu a propósito das terceira figura, reunindo fotografias do mesmo processo obtidas por diferentes métodos. Estas comparações são cruciais do ponto de vista do uso destas imagens como evidência decisiva.

Finalmente, uma referência ainda à décima figura apenas no sentido da sua descrição; a figura mostra a ocorrência de fagocitose de eritrócitos com forma de disco bicôncavo, uma imagem possível apenas porque estas células tinham sido previamente fixadas; a forma evidenciada nas imagens anteriores não é a de disco bicôncavo.

O que é notório na sequência de imagens ao longo do artigo é o cruzamento de resultados obtidos por diferentes técnicas de microscopia. Este cruzamento é, de resto, anunciado e enfatizado no texto. Segundo os autores, o artigo compara imagens de microcinematografia, que seguem o fenómeno ao longo do tempo, imagens de microscopia electrónica de transmissão, que mostra fenómenos em corte e tem alta resolução, e ainda imagens de microscopia electrónica de varrimento, que permite observar as células em três dimensões e assim ter “uma imagem dos fenómenos que se aproxima mais da realidade” (Bessis & de Boisfleury, 1970: 225). Procurando resumir, as imagens apresentadas neste artigo são poderosas mas sobretudo no arranjo em que surgem, no qual cada imagem é “validada” por uma outra obtida por um método diferente. É de facto a sequência de imagens do mesmo processo, obtidas por diferentes técnicas, em conjunto com o texto que explicita esse cruzamento de dados que confere a força de prova ao documento. Não o fazem as imagens isoladamente, como nos casos explorados por Cambrosio e colaboradores (2008), mas antes as imagens inseridas numa certa narrativa.

Breve excurso

A análise deste artigo de Bessis e Boisfleury pretende ilustrar o modo como em determinada altura foi essencial o recurso a práticas de visualização para a compreensão do processo de remoção de células. O mesmo se poderia fazer a respeito do processo de envelhecimento em si. Na verdade, as imagens do artigo de Danon e Marikovsky que estará na base da notícia referida inicialmente (Fellows, 1961) oferecem também oportunidade de uma análise interessante – não a desenvolvo aqui – na medida em que poderão ser reinterpretadas com base no conhecimento posteriormente obtido a respeito do envelhecimento eritrocitário.

Para uma análise dos estudos sobre a morfologia dos eritrócitos, seria difícil não ter considerado o trabalho de Marcel Bessis. O trabalho de visualização de eritrócitos (o seu dano e destino) desenvolvido pelo autor e seus colaboradores foi vasto e pioneiro. Refiro-me às imagens, ao modo como contribuem para a produção de

conhecimento e também às reflexões de Bessis a este respeito. Assim, cito uma passagem do prefácio de *“Living Blood Cells and their Ultrastructure”*:

Um provérbio chinês antigo diz que uma imagem vale mais do que mil palavras. As imagens neste livro foram escolhidas para minimizar a necessidade de descrições. Cada uma foi seleccionada pela quantidade de informação que contém e pelo seu valor evocativo. Uma imagem bonita tem virtudes de explanação e sugestão que activam a imaginação e fixam a imagem indelevelmente na memória de cada um. No entanto, tem de admitir-se que os problemas que uma tal imagem evoca e o prazer que dá dependem do nível de conhecimento daqueles que a olham. (Bessis, 1973 [1972]: v)

A última frase é essencial para a compreensão do excerto e vem no mesmo sentido do texto de Fleck atrás mencionado (1986 [1947]).

Um apontamento sobre publicações de anos mais recentes

A utilização de imagens de eritrócitos obtidas por microscopia electrónica de varrimento tem uma expressão alargada. Será importante notar um outro modo como mais recentemente têm vindo a oferecer força argumentativa. Nas últimas décadas tornou-se uma prática corrente a avaliação de populações celulares por citometria de fluxo. Já se mencionou esse facto anteriormente (veja-se o Capítulo 7). É frequente nestes textos que imagens de microscopia acompanhem um outro tipo de representação de células, ou melhor de populações de células – os histogramas e os gráficos *dot-plot* no âmbito da análise por citometria de fluxo. Tomamos aqui o exemplo de um artigo de Daniela Bratosin e colaboradores (1997). No artigo, os autores reportam o desenvolvimento de um método de avaliação da eritrofagocitose e apresentam esses dois tipos de representação.

Alberto Cambrosio e Peter Keating analisam a transformação no modo de representar visualmente populações de células a que o recurso à citometria de fluxo conduziu (2000). No contexto dos estudos que se analisam nesta tese interessa sobretudo notar o frequente recurso aos dois tipos de representação. A figura 8.3 reproduz as fotografias de microscopia electrónica de varrimento publicadas no referido artigo de Bratosin e colaboradores. Mostram-se apenas as imagens de microscopia, mas o que se pretende argumentar aqui é que a inclusão destas fotografias no artigo tem o interesse de clarificar a informação das representações que derivam da citometria de fluxo, como se as imagens de microscopia veiculassem uma “maior realidade”. Isso será assim neste artigo e nas numerosas publicações que fazem este mesmo uso das imagens.

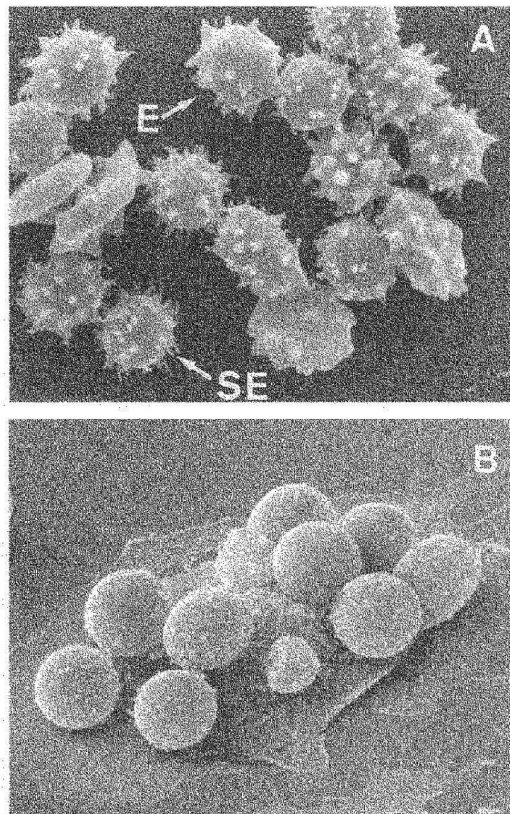


Figure 4. Scanning electron microscopy.
A: Heterogenous human erythrocyte population isolated by ultracentrifugation in Percoll gradient. Mixture of echinocytes (E) and spherocytes (SE).
B: Preferred capture of senescent RBC after incubation of the above population with murine peritoneal macrophages. Spherocytes only have been captured.

Figura 8.3. Figura 4 de Bratosin *et al.* (1997) evidenciando em microscopia electrónica de varrimento a eritrofagocitose selectiva de células velhas. [Reproduzida de *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III – Sciences de la Vie*, Vol. 320, Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.-P., Slomianny, C., Estaquier, J., Russo-Marie, F., Huart, J.-J., Freyssinet, J.-M. Aminoff, D., Ameisen, J.-C. e Montreuil, J., “Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages”, 811-818, Copyright 1997, com permissão de Elsevier.]

Para concluir esta breve análise da cultura visual em torno do envelhecimento eritrocitário e da remoção selectiva de células velhas por eritrofagocitose, pode notar-se que, apesar de não existir uma morfologia específica de células velhas, mas apenas alterações morfológicas com o envelhecimento que ocorrem igualmente em variadas condições para além desta, procurar ver (e mostrar) esses processos tem sido um aspecto com alguma centralidade na dinâmica de produção de conhecimento nesta área. A citação de Bessis que foi feita no início do capítulo é

interessante no propósito da análise aqui em curso – a microscopia electrónica iria proporcionar uma plataforma de integração de vários conhecimentos. Uma plataforma para a troca de escalas que permite uma visão completa?

Capítulo 9. Uma Biografia do Eritrócito em Envelhecimento

Mais do que um e menos do que muitos.

– Mol (e Stathern), 2002: 82

Em última análise esta tese trata da dinâmica da biomedicina e fá-lo a partir do percurso de um objecto particular, o “eritrócito em envelhecimento”. No âmbito da investigação realizada, procurei explorar o campo de estudos que se desenvolveu em torno do fenómeno de envelhecimento do eritrócito tomando particular atenção às práticas, isto é, tentando observar a dinâmica desses estudos a partir do modo como o conhecimento foi sendo obtido. No decorrer da pesquisa, passou a ser importante considerar a carreira desse objecto. A análise apresentada até aqui mostra um padrão de existência múltiplo, densamente conectado, onde a relação entre o laboratório de investigação e a clínica, a combinação entre teoria e contingências práticas, e, por fim mas não em último, as características peculiares da célula, assumem papéis chave. É pois uma leitura do eritrócito em envelhecimento como um objecto múltiplo aquilo que se propõe e explora aqui, considerando os diferentes modos de existência nos quais esta célula se encena em relação com o fenómeno de envelhecimento. “Mais do que um e menos do que muitos” é a conclusão de Annemarie Mol (2002) no final do seu estudo etnográfico sobre a arterioesclerose levado a cabo num hospital universitário holandês. A proximidade da interpretação que aqui faço do eritrócito em envelhecimento à análise que Mol faz no seu estudo é clara. A investigação subjacente a esta tese não se tinha orientado no sentido perceber a origem do objecto, a sua ontologia. No entanto, no final, reconhecer essa multiplicidade nos dados que resultaram de uma investigação que foi, de facto, uma pesquisa focada nas práticas parece proporcionar uma leitura interessante desses dados.

Mas este capítulo é quase uma conclusão e assim será um texto extraordinariamente breve.

Para compreender condições de anemia hemolítica

Voltemos à origem dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário. Viu-se anteriormente que o problema do envelhecimento desta célula, e mais especificamente no caso humano, surge ligado ao mundo da clínica. A carreira do eritrócito em envelhecimento começou aqui. Interessava melhor compreender a base de algumas condições de anemia e nesse propósito, a determinação do tempo de vida do eritrócito foi mobilizando uma série de investigadores de tradições diversas. Mesmo neste âmbito do interesse em melhor compreender uma dada condição clínica, e à semelhança do que acontece com as partículas citoplasmáticas estudadas por Rheinberger (1990), o eritrócito em envelhecimento atravessa uma série de disciplinas; este objecto não pertence à hematologia, ou à bioquímica ou à fisiologia apenas. A determinação do tempo de vida por Shemin e Rittenberg (1946) é um dos casos que o ilustra na medida em que respondendo a um problema clínico o trabalho que apresentam é essencialmente de âmbito fundamental. O problema do envelhecimento eritrocitário surge claro no trabalho deste investigadores – o eritrócito “tem um tempo de vida”, como concluem.

Para entender a sobrevivência de eritrócitos transfundidos

Na verdade, a questão anterior seria mais a de compreender condições de anemia hemolítica e práticas médicas relacionadas. Era fundamental perceber a sobrevivência de eritrócitos transfundidos nos indivíduos afectados por essa condição. O eritrócito em envelhecimento foi aqui ensaiado através da sua sobrevivência em circulação pós reinfusão. E neste âmbito, tanto a marcação isotópica como a análise matemática constituíram, em tempos iniciais, procedimentos fundamentais. Mas este modo de existência do eritrócito em envelhecimento está muito ligado a um outro, o que tem lugar nos bancos de sangue.

Para compreender a lesão de armazenamento e prolongar o tempo de permanência em banco

Compreender a lesão de armazenamento é essencial para saber como prolongar o tempo de permanência destas células em banco. É essencial ainda para melhor compreender as complicações que surgem com transfusões de eritrócitos. O eritrócito em envelhecimento é aqui um objecto mais complexo – cada eritrócito

armazenado é um eritrócito em envelhecimento, mas a unidade de células armazenadas também envelhece ela própria. E esta complexidade traz consigo um problema de linguagem: “*age of blood*” refere-se à “idade” de uma unidade de células que individualmente tinham na altura da colheita idades diferentes. Muitos dos trabalhos recentes realizados neste contexto avaliam as células por citometria de fluxo com base na exposição de fosfatidilserina e surgem aqui uma série de questões de regulação, havendo necessidade de considerar escalas adicionais que incorporem a dimensão social. A noção de plataforma biomédica de Keating e Cambrosio (2003) terá nesta análise especial relevância.

Para investigar o envelhecimento biológico

Um dos modos de existência do eritrócito em envelhecimento que tem particular importância na dinâmica de produção de conhecimento neste campo é o do eritrócito como modelo para o estudo do envelhecimento biológico. Praticado essencialmente através de fracções de densidade, afigurava-se pelos anos oitenta como um objecto promissor para a elucidação de um problema central em biologia, tendo sido então destacada essa carreira do eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento.

Para...

Investigar o processo de apoptose? O caso deste modo de existência será especialmente interessante na medida em que torna o eritrócito, uma célula onde seria impossível ocorrer apoptose, uma célula que pode ser um modelo para o estudo de algumas etapas desse processo.

Mesmo que a sua contribuição nesse âmbito possa ser limitada, a este modo de existência do objecto está associada uma renovação do problema do envelhecimento eritrocitário e do entendimento do processo e assim expectativas em relação ao avanço do conhecimento.

Ultrapassando escalas?

Um dos aspectos a que foi dedicada atenção relaciona-se com a centralidade das questões de escala. A leitura que Annemarie Mol (2002) apresenta de uma multiplicidade da realidade na prática é também importante do ponto de vista da natureza multi-escalar do problema que constitui o foco dos estudos aqui em

análise. *“Unscaling the body”* é uma concepção que Mol explora com base na ideia de que a ontologia médica não é um conjunto de objectos que vão desde o pequeno ao grande. Como afirma, não há um enquadramento que possa conter todos os outros e nesse sentido ser um “todo”. Nas suas palavras: “[c]ertamente, na prática os objectos podem fazer parte uns dos outros. Quando um objecto se encena, um outro pode fazer parte dele. Mas isto não é uma questão de escala, mesmo porque estas inclusões podem ser recíprocas” (ibidem: 121). Trará esta análise algo de novo ao debate acerca das escalas no estudo dos sistemas vivos? A resposta será afirmativa...

Conclusões

Chegado este momento, é altura de recapitular e procurar extrair conclusões. A investigação que aqui reporto iniciou-se com o interesse em melhor compreender a dinâmica das ciências da vida e da biomedicina. A pesquisa explorou em particular o caso da produção de conhecimento em torno do fenómeno de envelhecimento eritrocitário, tendo-se procurado observar esse campo de estudos desde os seus primórdios. O caso da investigação relacionada com este problema, nos diferentes aspectos que assume – e que são facilmente perceptíveis –, nas diferentes escalas em que se pratica, bem como nas diferentes questões que suscita, parecia poder proporcionar uma contribuição rica do ponto de vista dos estudos sobre a ciência. Seguindo uma tendência de investigação com uma tradição de já algumas décadas neste domínio, o presente trabalho focou-se nas práticas científicas, no modo como se estabelecem abordagens experimentais e no que essas implicam em termos do conhecimento que assim se constrói. Sendo esse o foco, baseou-se nomeadamente na análise de dados bibliométricos e também de narrativas em textos publicados. O trabalho aproveitou uma breve e anterior experiência laboratorial interpretada como etnografia – centrar a atenção nas práticas é um interesse que decorre também dessa experiência.

São questões importantes dos estudos sobre a ciência saber como se articulam investigação (e conhecimento) fundamental e de âmbito clínico, perceber como circula o conhecimento produzido, entender apropriações de conhecimento de um contexto a outro ou ainda o que determina a mobilização para o estudo de um dado problema. Como terá ficado claro anteriormente, o problema a que esta tese se refere envolve essas questões. Interessou-me perceber o papel de sistemas experimentais na dinâmica dos estudos em torno do fenómeno de envelhecimento eritrocitário e em particular explorar relação com as diferentes escalas nas quais esses estudos têm vindo a ser praticados. A investigação reportada organizou-se nesse propósito, tendo tido como preocupações principais saber como se articulam e se integram conhecimentos bem como entender deslocamentos.

O caso que explorei tem presença no âmbito de diferentes contextos disciplinares. Com efeito, o problema do envelhecimento eritrocitário tem um interesse amplo, sendo pertinente no âmbito de investigação fundamental, de uma variedade de

condições clínicas ou ainda do armazenamento de células para transfusão. Para além destas vertentes, uma outra surge particularmente relevante, a do eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento. Procurei então mapear este campo de investigação nos seus diferentes desdobramentos. A investigação que levei a cabo incluiu uma análise bibliométrica e, nessa perspectiva, pode enquadrar-se no âmbito da TAR (Callon *et al.*, 1986); nesse âmbito, o campo de estudos que se desenvolveu em torno do fenómeno de envelhecimento eritrocitário foi estudado de modo global, isto é sem privilegiar nenhuma das vertentes anteriores. A pesquisa baseou-se ainda numa análise mais detalhada de alguns textos publicados, sendo o foco principal dessa análise os objectos epistémicos e o modo como estes surgem, se desenvolvem e por vezes se transformam em objectos técnicos. É clara a inspiração no trabalho de Rheinberger (1997), considerando os sistemas experimentais como unidades centrais de análise na dinâmica da ciência. Naturalmente, o estudo que fiz teve presente a narrada breve experiência laboratorial no tema; várias questões tratadas ao longo da tese tiveram a sua origem aí. A investigação foi ainda colher inspiração ao trabalho de Cambrosio e Keating (2003), considerando, para além da noção de sistema experimental, a concepção de plataforma biomédica desenvolvida por estes autores.

Penso que ao longo da tese ficou bem patente a abrangência do campo de estudos. Os resultados da análise bibliométrica realizada mostram-no bem. Foi possível observar ainda que esses estudos se referem, no seu todo, a uma multiplicidade de escalas, decorrendo desse facto uma diversidade de equipamentos e arranjos experimentais na investigação do problema, assim como de áreas disciplinares envolvidas e nas quais se utilizam linguagens diferentes.

Foram analisadas com maior detalhe duas circunstâncias particulares. De início, alguns cruzamentos da investigação laboratorial com o mundo da clínica. Explorou-se a sua presença na emergência do problema, tendo-se observado ainda desse ponto de vista alguns momentos particulares do desenvolvimento do campo, como o dos trabalhos realizados no sentido do desenvolvimento de preparados eritrocitários enriquecidos em células novas para transfusão. Depois, o recurso ao eritrócito como modelo em estudos do envelhecimento biológico. Estes trabalhos com eritrócitos importam não só pelo conhecimento a respeito destas células, mas também pela sua utilização como modelo experimental. Esta vertente dos estudos do envelhecimento eritrocitário tem proeminência na década de oitenta, quando as

expectativas dos investigadores relativamente à adequação do eritrócito como modelo experimental para esse tipo de estudos – baseadas principalmente na simplicidade desta célula – eram elevadas, devidamente anunciadas e motivadoras de iniciativas colaborativas.

O caso tratado oferece exemplos interessantes acerca do papel de sistemas experimentais na dinâmica de produção de conhecimento científico e à medida que a investigação se foi desenvolvendo, alguns aspectos revelaram-se especialmente importantes, acabando por isso por motivar uma reflexão mais atenta. Assim, em primeiro lugar foi possível perceber a importância da estabilização de sistemas experimentais, explorando a controvérsia relacionada com a separação de eritrócitos baseada por idade. Muitos dos estudos foram realizados através do fraccionamento da população total por densidades e a discussão que foi acompanhando os trabalhos questiona as fracções de densidade como objectos técnicos. Por um outro lado, quando olhamos para estudos relativamente recentes deparamo-nos com o caso da identificação e separação de células de diferente idade pela exposição de fosfatidilserina na sua superfície exterior. A perda da assimetria da membrana, em que se baseiam estes procedimentos mais recentes tem aplicação mais alargada, isto é, não é uma particularidade dos estudos com eritrócitos. E pode especular-se que essa não especificidade da metodologia tenha facilitado analogias entre o processo de envelhecimento eritrocitário e o de apoptose e assim aberto caminho a uma mudança conceptual. Nesse sentido, terá aqui havido uma mudança no entendimento do fenómeno relacionada com a adopção de novas práticas.

Desviando-me ligeiramente, importa aqui fazer uma outra consideração. É interessante notar que um resultado central dos estudos em torno do envelhecimento eritrocitário, a determinação do tempo de vida da célula por Shemin e Rittenberg (1946) – o qual foi também o estudo que forneceu ainda evidência inequívoca da remoção selectiva de células por idade –, tenha sido obtido sobretudo pela aplicação de uma nova possibilidade metodológica. As contribuições científicas destes autores situam-se no campo das ciências da vida, mas possuem uma ênfase mais molecular. De certo modo, ocorrências deste tipo suportam a ideia defendida por Rheinberger (1997) de que a experimentação tenha uma vida própria – que a introdução de uma nova tecnologia constitua uma força motriz do processo de investigação científica, que os avanços científicos sejam menos determinados por teorias do que pelas contingências que surgem no caminho. E, um pouco no

mesmo sentido, refiro um aspecto dos trabalhos do grupo da U.Porto em que estive envolvida e que tive já oportunidade de expôr – uma nova possibilidade metodológica pela disponibilidade do equipamento de RPE fez com que nesse grupo se revisitasse uma questão já antiga mas ainda em aberto relativa ao comportamento osmótico do eritrócito e os resultados obtidos acabaram por dirigir no sentido do estudo do envelhecimento da célula.

Voltemos às circunstâncias que motivaram reflexão mais aprofundada. Os trabalhos de visualização no âmbito dos estudos do envelhecimento eritrocitário acabaram por constituir o segundo ponto, tendo interessado perceber a articulação de conhecimentos referentes a diferentes escalas, níveis de organização e análise. Este tipo de trabalhos trouxe a investigação do envelhecimento eritrocitário para junto de públicos não especializados e isso justificou que o papel das práticas de obtenção de imagens na produção de conhecimento, incluindo o modo como essas são usadas em artigos científicos, fosse explorado em mais detalhe. De certo modo, a descrição do processo de envelhecimento eritrocitário que se encontra em livros de texto de histologia – atribuindo um papel crucial à alteração de forma – vem no mesmo sentido, isto é, leva a considerar o papel das visualizações como um aspecto importante a explorar. O caso analisado em maior detalhe mostrou o cuidado colocado na “validação” de imagens pelo recurso a diferentes procedimentos e comparação de resultados e ainda o uso dessas imagens como instrumento de retórica.

A variedade de vertentes dos estudos do envelhecimento eritrocitário é um dado importante e defendo aqui que essas correspondem a diferentes modos de existência de um objecto biomédico, o “eritrócito em envelhecimento”. Assim, apresentei por último a proposta de que na descrição da dinâmica da investigação em torno do envelhecimento eritrocitário é vantajoso recorrer à caracterização do “eritrócito em envelhecimento” como um objecto múltiplo. “Mais do que um, menos do que muitos” (Mol, 2002), este objecto apresenta então diferentes modos de existência e ensaia-se em diferentes escalas. Claro está que a tese não trata de ontologia; o seu foco, como tenho vindo a repetir e terá ficado bem explícito, são as práticas científicas ou a experimentação. E, no entanto, numa consideração final foi útil recorrer ao trabalho de Annemarie Mol – que fala de objectos que se performam e da multiplicidade da realidade na prática – para melhor sintetizar a informação que resultou da pesquisa, interpretando nesse sentido os seus resultados. Não se discutiu ontologia nem tão pouco a proposta de Mol. Aqui, houve apenas um

encontro (difractivo) com as suas ideias para concluir uma leitura da dinâmica do campo de estudos desenvolvido em torno do envelhecimento eritrocitário.

Chego a este ponto com a noção de que na resposta a questões iniciais se foram abrindo outras. A afirmação é mais ou menos um lugar comum nestas circunstâncias, mas é exactamente essa a percepção. Continuando com o “lugar comum”, há aí um misto de agrado (porque colocar questões é importante) e de desapontamento (porque houve respostas que ficaram por dar). Vários dos aspectos tratados relacionam-se com interrogações e caminhos que foram surgindo durante a pesquisa. Outras ficaram por desenvolver – há que fazer opções para fechar etapas – e podem ser vistas como pontos de partida para nova exploração.

Procuro ilustrar fazendo referência a alguns aspectos interessantes para trabalho futuro. Uma questão levantada que me parece relevante relaciona-se com resultados – que apropriações ocorreram dos dados relativos ao envelhecimento eritrocitário? Haverá algo incorporado no caso dos estudos que visam o desenvolvimento do eritrócito como sistema de transporte de fármacos no organismo? E no armazenamento de células para transfusão? Qual a contribuição dos estudos no eritrócito na compreensão do envelhecimento biológico? Ficou para mim clara também a importância das questões de regulação, nomeadamente no caso das práticas de transfusão sanguínea. A questão aqui pode ser colocada em termos de saber que conhecimentos e que actores são envolvidos no estabelecimento de orientações.

E se as questões abertas constituírem inícios de investigações futuras, o trabalho terá sido mais interessante ainda...

Referências

- Almeida, M.S., Damas, A.M. & Quintanilha, A. 1990. The effect of osmotic stress on the intracellular volume and viscosity of different density populations of human erythrocytes. *Revista Portuguesa de Hemorreologia* 4:181-190.
- Aminoff, D. 1985. Senescence and sequestration of RBC from circulation. In *Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as a Model*, editado por J.W. Eaton, D.K. Konzen & J.G. White. New York: Alan R. Liss.
- Aminoff, D. 1988. The role of sialoglycoconjugates in the aging and sequestration of red cells from circulation. *Blood Cells* 14:229-247.
- Aon, M.A. & Cortassa, S. 1997. *Dynamic Biological Organization: Fundamentals as Applied to Cellular Systems*. London: Chapman & Hall.
- Ashby, W. 1919. The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man. *Journal of Experimental Medicine* 29:267-281.
- Ashby, W. 1921. Study of transfused blood. I. The periodicity in eliminative activity shown by the organism. *Journal of Experimental Medicine* 34:127-146.
- Ashby, W. 1948. The span of life of the red blood cell. *Blood* 3:486-500.
- Bartosz, G. 1991. Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. *Gerontology* 37:33-67.
- Bartosz, G. & Leyko, W. 1980. Aging of the erythrocyte I. Increase in the microviscosity of cell interior as determined by the spin label method. *Blut* 41:131-136.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78:547-581.
- Berg, C.P., Engels, I.H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S.F., Schulze-Osthoff, K. & Wesselborg, S. 2001. Human mature red blood cells express caspase-3, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 8:1197-1206.
- Bergethon, P.R. 1998. *The Physical Basics of Biochemistry*. New York: Springer-Verlag New York.
- Bernard, C. 1978 [1865]. *Introdução à Medicina Experimental*. Traduzido por M.J. Marinho. Lisboa: Guimarães & C.^a Editores. Edição original, Introduction à l'Étude de la Médecine Expérimentale.
- Bernstein, R.E. 1959. Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells. *Journal of Clinical Investigation* 38:1572-1586.
- Bessis, M. 1950. Studies in electron microscopy of blood cells. *Blood* 5:1083-1098.

- Bessis, M. 1958. At the level of ten angstroms. *Blood* 13:410-412.
- Bessis, M. 1972. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* 12:721-746.
- Bessis, M. 1973 [1972]. *Living Blood Cells and their Ultrastructure*. Traduzido por R.I. Weed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. Edição original, Cellules du Sang, Normal et Pathologique.
- Bessis, M. 1974. *Corpuscles: Atlas of Red Cell Shapes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bessis, M. & de Boisfleury, A. 1970. Étude des différentes étapes de l'erythrophagocytose par microcinématographie et microscopie électronique à balayage. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* 10:223-41.
- Beutler, E. 1988a. Isolation of the aged. *Blood Cells* 14:1-5.
- Beutler, E. 1988b. The relationship of red cell enzymes to red cell life-span. *Blood Cells* 14:69-75.
- Beutler, E. 1995. A greeting from the editor. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 21:1.
- Beutler, E. 2000. Back to the future in RBC preservation. *Transfusion* 40:893-895.
- Beutler, E., Coller, B.S., Lichtman, M.A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U., eds. 2001. *Williams Hematology*. 6^a ed. New York: McGraw-Hill.
- Biagioli, M. 1999. Introduction. Science studies and its disciplinary predicament. In *The Science Studies Reader*, editado por M. Biagioli. New York: Routledge.
- Biochemistry: What? Why? & How? London: Biochemical Society.
- Biondi, C., Cotorruelo, C., Garcia Borrás, S., Rocca, L., Einsinck, A., Marini, A. & Racca, A. 2003. Study of phagocytosis of senescent erythrocytes in young and elderly individuals. *Clinical and Experimental Medicine* 2:197-198.
- Blumwald, E., Mehlhorn, R.J. & Packer, L. 1983. Studies of osmoregulation in salt adaptation of cyanobacteria with ESR spin-probe techniques. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:2599-2602.
- Bonsignore, A., Fornaini, G., Fantoni, A., Leoncini, G. & Segni, P. 1964. Relationship between age and enzymatic activities in human erythrocytes from normal and fava bean-sensitive subjects. *Journal of Clinical Investigation* 43:834-842.
- Borun, E.R., Figueroa, W.G. & Perry, S.M. 1957. The distribution of Fe⁵⁹ tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. *Journal of Clinical Investigation* 36:676-679.
- Bosman, G.J.C.G.M., Cluitmans, J.C.A., M., G.Y.A., Werre, J.M., Willekens, F.L.A. & Novotný, V.M.J. 2011. Susceptibility to hyperosmotic stress-induced

phosphatidylserine exposure increases during red blood cell storage. *Transfusion* 51:1072-1078.

Bosman, G.J.C.G.M. & Kay, M.M.B. 1988. Erythrocyte aging: a comparison of model systems for simulating cellular aging in vitro. *Blood Cells* 14:19-35.

Bosman, G.J.C.G.M., Lasonder, E., Lutten, M., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Novotný, V.M.J., Bos, H. & De Grip, W.J. 2008. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 48:827-835.

Bosman, G.J.C.G.M., Werre, J.M., Willekens, F.L.A. & Novotny, V.M.J. 2008. Erythrocyte ageing *in vivo* and *in vitro*: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion Medicine* 18:335-347.

Bosman, G.J.C.G.M., Willekens, F.L.A. & Werre, J.M. 2005. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cellular Physiology and Biochemistry* 16:1-8.

Bracey, A.W., Klein, H.G., Chambers, S. & Corash, L. 1983. Ex vivo selective isolation of young red blood cells using the IBM-2991 Cell Washer. *Blood* 61:1068-1071.

Bratosin, D., Estaquier, J., Ameisen, J.C. & Montreuil, J. 2002. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. *Vox Sanguinis* 83 Suppl 1:307-310.

Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, D., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., Montreuil, J. & Ameisen, J.C. 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 8:1143-1156.

Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.-P., Slomianny, C., Estaquier, J., Russo-Marie, F., Huart, J.-J., Freyssinet, J.-M., Aminoff, D., Ameisen, J.-C. & Montreuil, J. 1997. Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. *Comptes Rendus de l'Académie des Science - Series III - Sciences de la Vie* 320:811-818.

Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.P., Estaquier, J., Huart, J.J., Ameisen, J.C., Aminoff, D. & Montreuil, J. 1998. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80:173-195.

Brewer, G.J. & Powell, R.D. 1963. Hexokinase activity as a function of age of the human erythrocyte. *Nature* 199:704-705.

Brown, I.W., Jr. & Eadie, G.S. 1953. An analytical study of in vivo survival of limited populations of animal red blood cells tagged with radioiron. *Journal of General Physiology* 36:327-343.

Bull, B.S. 1986. Publishing and being published in the hematologic literature - a discussion on "Blood Cells" publishing policies. *Blood Cells* 12:271-280.

Burkitt, H.G., Young, B. & Heath, J.W. 1994 [1993]. *Wheater - Histologia Funcional*. Traduzido por C.L.C. Araújo. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Edição original, Wheater's Functional Histology.

Burri, R.V. & Dumit, J. 2007. Social studies of scientific imaging and visualizations. In *The Handbook of Science and Technology Studies*, editado por E.J. Hackett, O. Amsterdamska, M. Lynch & J. Wajcman. Cambridge: The MIT Press.

Byers, T.J. & Branton, D. 1985. Visualizations of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:6153-6157.

Callender, S.T., Loutit, J.F. & Jope, E.M. 1946. Discussion on the life and death of the red blood corpuscle. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 39:755-762.

Callender, S.T., Powell, E.O. & Witts, L.J. 1945. The life-span of the red cell in man. *Journal of Pathology and Bacteriology* 57:129-139.

Callon, M. 1999 [1986]. Some elements of a sociology of translation: domestication of the scallops and the fishermen of St. Brieuc Bay. In *The Science Studies Reader*, editado por M. Biagioli. New York: Routledge.

Callon, M., Courtial, J.-P. & Penan, H. 1993. *La Scientométrie*. Paris: Presses Universitaires de France.

Callon, M., Law, J. & Rip, A. 1986. Putting texts in their place. In *Mapping the Dynamics of Science and Technology*, editado por M. Callon, J. Law & A. Rip. Houndmills: The Macmillan Press.

Callon, M., Law, J. & Rip, A., eds. 1986. *Mapping the Dynamics of Science and Technology*. Houndmills: The Macmillan Press.

Cambrosio, A., Jacobi, D. & Keating, P. 2008. Phages, antibodies and demonstration. *History and Philosophy of the Life Sciences* 30:131-158.

Cambrosio, A. & Keating, P. 2000. Of lymphocytes and pixels: the technovisual production of cell populations. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 31:233-270.

Clark, M.R. 1988a. Calcium extrusion by high-density human red blood cells. *Blood Cells* 14:119-131.

Clark, M.R. 1988b. Senescence of red blood cells: progress and problems. *Physiological Reviews* 68:503-554.

Cohen, A.R., Schmidt, J.M., Martin, M.B., Barnsley, W. & Schwartz, E. 1984. Clinical trial of young red cell transfusions. *The Journal of Pediatrics* 104:865-868.

Connor, J., Pak, C.C. & Schroit, A.J. 1994. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *Journal of Biological Chemistry* 269:2399-2404.

- Cooper, R.A. & Jandl, J.H. 1983. Destruction of erythrocytes. In *Hematology*, editado por W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev & M.A. Lichtman. New York: McGraw-Hill.
- Corash, L.M., Piomelli, S., Chen, H.C., Seaman, C. & Gross, E. 1974. Separation of erythrocytes according to age on a simplified density gradient. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 84:147-151.
- Creager, A.N.H. 2002. *The Life of a Virus: Tobacco Mosaic Virus as an Experimental Model, 1930-1965*. Chicago: University of Chicago Press.
- Creager, A.N.H., Lunbeck, E. & Wise, M.N., eds. 2007. *Science without Laws: Model Systems, Cases, Exemplary Narratives*. Durham and London: Duke University Press.
- Dacie, J. 1979. Evolution of ideas on the life-span of the red blood cell. *Journal of the Royal Society of Medicine* 72:447-452.
- Dacie, J. 2001. The immune haemolytic anaemias: a century of exciting progress in understanding. *British Journal of Haematology* 114:770-785.
- Damas, A.M., Almeida, M.S. & Quintanilha, A. 1990. ESR and erythrocyte studies. In *Biomechanical Transport Processes*, editado por F. Mosora, C.G. Caro, E. Krause, H. Schmid-Schönbein, C. Baquay & R. Pellissier. New York: Plenum Press.
- Danon, D. & Marikovsky, Y. 1961. Morphologie des membranes des érythrocytes jeunes et âgés. Observations au microscope électronique. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 155:12-16.
- Danon, D. & Marikovsky, Y. 1964. Determination of density distribution of red cell population. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 64:668-674.
- Daugas, E., Candé, C. & Kroemer, G. 2001. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death and Differentiation* 8:1131-1133.
- Dumaswala, U.J., Zhuo, L., Jacobsen, D.W., Jain, S.K. & Sukalski, K.A. 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biology & Medicine* 27:1041-1049.
- Eadie, G.S. & Brown, I.W., Jr. 1953. Red blood cell survival studies. *Blood* 8:1110-1136.
- Eaton, J.W., Konzen, D.K. & White, J.G., eds. 1985. *Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as A Model*. Vol. 195, *Progress in Clinical and Biological Research*. New York: Alan R. Liss, Inc.
- Essner, E. 1960. An electron microscopic study of erythrophagocytosis. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 7:329-333.
- Fellows, L. 1961. Israeli scientists devise means of identifying red blood cells. *The New York Times*, August 27.

Fleck, L. 1986 [1935]. *La Génesis y el Desarrollo de un Hecho Científico*. Traduzido por L. Meana. Madrid: Alianza Editorial.

Fleck, L. 1986 [1947]. To look, to see, to know. In *Cognition and Fact - Materials on Ludwik Fleck*, editado por R.S. Cohen & S. T. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company.

Fragiligraph symposium. 1968. *Blood* 31:406-408.

Franco, R.S. 2009. The measurement and importance of red cell survival. *American Journal of Hematology* 84:109-114.

Gabrio, B.W. & Finch, C.A. 1954. Erythrocyte preservation. I. The relation of the storage lesion to *in vivo* erythrocyte senescence. *Journal of Clinical Investigation* 33:242-246.

Galison, P. 1997. *Image and Logic: A Material Culture of Microphysics*. Chicago: The University of Chicago Press.

Gamow, G. 1954 [1953]. *O Sr. Tompkins no Mundo da Biologia*. Traduzido por E.J. Mendes. Lisboa: Livraria Escolar Editora. Edição original, Mr. Tompkins Learns the Facts of Life.

Ganzoni, A.M., Oakes, R. & Hillman, R.S. 1971. Red cell aging in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 50:1373-1378.

Garfield, E. & Melino, G. 1997. The growth of the cell death field: an analysis from the ISI-Science citation index. *Cell Death and Differentiation* 4:352-361.

Gaudillière, J.-P. 2004. Genesis and development of a biomedical object: styles of thought, styles of work and the history of sex steroids. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 35:525-543.

Giulivi, C., Hochstein, P. & Davies, K.J. 1994. Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Radical Biology & Medicine* 16:123-129.

Glaser, R. 2001 [1996]. *Biophysics*. Berlin: Springer-Verlag. Edição original, Biophysik.

Glass, G.A. & Gershon, D. 1984. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochemical Journal* 218:531-537.

Glomski, C.A. & Tamburlin, J. 1989. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. I - Hemoglobin: the universal respiratory pigment. *Histology and Histopathology* 4:509-515.

Graziano, J.H., Piomelli, S., Seaman, C., Wang, T., Cohen, A.R., Kelleher, J.F., Jr. & Schwartz, E. 1982. A simple technique for preparation of young red cells for transfusion from ordinary blood units. *Blood* 59:865-868.

Greenhalgh, S. 2001. *Under the Medical Gaze: Facts and Fictions of Chronic Pain*. Berkeley: University of California Press.

- Hacking, I. 1983. *Representing and Intervening*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hagner, M. & Rheinberger, H.-J. 1998. Experimental systems, objects of investigation and spaces of representation. In *Experimental Essays - Versuche zum Experiment*, editado por M. Heidelberger & F. Steinle. Baden-Baden: Nomos Verlagsgesellschaft.
- Hajdu, S.I. 2003. A note from history: the discovery of blood cells. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 33:237-238.
- Hall, A.C. & Ellory, J.C. 1986. Evidence for the presence of volume sensitive KCl transport in "young" human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 858:317-320.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 2:298-300.
- Hess, J.R. 2010. Red cell storage. *Journal of Proteomics* 73:368-373.
- Hochstein, P. & Jain, S.K. 1981. Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Federation Proceedings* 40:193-188.
- Holme, S. 2005. Current issues related to the quality of stored RBCs. *Transfusion and Apheresis Science* 33:55-61.
- Hudson, G. 1986. Cellular and molecular aspects of aging: the red cell as a model. *Journal of Anatomy* 147:266.
- Hunter, P.J. & Borg, T.K. 2003. Integration from proteins to organs: the Physiome Project. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:237-243.
- Hunter, W. 1887. The duration of life of red blood-corpuses after transfusion, in its bearing on the value of transfusion in man. *The British Medical Journal* 1:192-200.
- Ihler, G.M., Glew, R.H. & Schnure, F.W. 1973. Enzyme loading of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:2663-2666.
- Jacob, H.S., Ingbar, S.H. & Jandl, J.H. 1965. Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia. *Journal of Clinical Investigation* 44:1187-1199.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1974. *Histologia Básica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1990. *Histologia Básica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1995. *Histologia Básica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1999. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 2004. *Histologia Básica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Karon, B.S., Hoyer, J.D., Stubbs, J.R. & Thomas, D.D. 2009. Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion* 49:1435-1442.
- Kay, M.M.B. 1975. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages *in situ*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72:3521-3525.
- Kay, M.M.B. 1981. Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding on senescent somatic cells. *Nature* 289:491-494.
- Kay, M.M.B. 1991. *Drosophila* to bacteriophage to erythrocyte: the erythrocyte as a model of molecular and membrane aging of terminally differentiated cells. *Gerontology* 37:5-32.
- Kay, M.M.B., Bosman, G.J.C.G.M., Johnson, G.J. & Beth, A.H. 1988. Band-3 polymers and aggregates, and hemoglobin precipitates in red cell aging. *Blood Cells* 14:275-289.
- Kay, M.M.B., Goodman, S.R., Sorensen, K., Whitfield, C.F., Wong, P., Zaki, L. & Rudloff, V. 1983. Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:1631-1635.
- Keating, P. & Cambrosio, A. 2003. *Biomedical Platforms: Realigning the Normal and the Pathological in Late-Twentieth-Century Medicine*. Cambridge: MIT Press.
- Keller, E.F. 2005. The century beyond the gene. *Journal of Biosciences* 30:3-10.
- Kerr, J.F.R. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182:471-474.
- Knorr Cetina, K. 1999. *Epistemic Cultures*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Koch, C.G., Li, L., Sessler, D.I., Figueroa, P., Hoeltge, G.A., Mihaljevic, T. & Blackstone, E.H. 2008. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *New England Journal of Medicine* 358:1229-1239.
- Kohler, R.E. 1994. *Lords of the Fly: Drosophila Genetics and the Experimental Life*. Chicago: University of Chicago Press.
- Kontopodis, M., Niewöhner, J. & Beck, S. 2011. Investigating emerging biomedical practices: zones of awkward engagement on different scales. *Science, Technology, & Human Values* 36:599-615.
- Kriebardis, A.G., Antonelou, M.H., Stamoulis, K.E., Economou-Peterson, E., Margaritis, L.H. & Papassideri, I.S. 2007. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 47:1212-1220.

- Kriebardis, A.G., Antonelou, M.H., Stamoulis, K.E., Economou-Peterson, E., Margaritis, L.H. & Papassideri, I.S. 2008. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 48:1943-1953.
- Kuhn, T.S. 1996 [1962]. *The Structure of Scientific Revolutions*. 3^a ed. Chicago and London: University of Chicago Press.
- LaCelle, P.L. 1991. Destruction of erythrocytes. In *Hematology*, editado por W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev & M.A. Lichtman. New York: McGraw-Hill.
- Lang, K.S., Lang, P.A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S., M. & Lang, F. 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry* 15:195-202.
- Latour, B. 1986. Visualisation and cognition: drawing things together. *Knowledge and Society: Studies in the Sociology of Culture Past and Present* 6:1-40.
- Latour, B. 1995 [1987]. *La Science en Action*. Paris: Gallimard. Edição original, Science in Action. How to Follow Scientists and Engineers Through Society.
- Law, J. 1986. The heterogeneity of texts. In *Mapping the Dynamics of Science and Technology*, editado por M. Callon, J. Law & A. Rip. Houndmills: The Macmillan Press.
- Law, J. & Hassard, J., eds. 1999. *Actor Network Theory and After*. Oxford: Blackwell.
- Leif, R.C. & Vinograd, J. 1964. The distribution of buoyant density of human erythrocytes in bovine albumin solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 51:520-528.
- Lewis, S.M. 1986. Cellular and molecular aspects of aging: the red cell as a model. *Journal of Clinical Pathology* 39:465-466.
- Lewis, S.M. & Stuart, P.R. 1970. The diagnostic value of electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 63:465-468.
- Liu, S.-C., Derick, L.H. & Palek, J. 1987. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *Journal of Cell Biology* 104:527-536.
- Lockshin, R.A. 1997. The early modern period in cell death. *Cell Death and Differentiation* 4:347-351.
- Lomax, T.L. & Mehlhorn, R.J. 1985. Determination of osmotic volumes and pH gradients of plant membrane and lipid vesicles using ESR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 821:106-114.
- Löwy, I. 1994. Ludwik Fleck e a presente história das ciências. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos* 1:7-18.
- Lutz, H., U. 1988. Red cell density and red cell age. A commentary to: "The relationship of red cell enzymes to red cell life-span". *Blood Cells* 14:76-80.

Lynch, M. 1985. Discipline and the material form of images. An analysis of scientific visibility. *Social Studies of Science* 15:37-66.

Lynch, M. & Woolgar, S., eds. 1990. *Representation in Scientific Practice*. Cambridge: The MIT Press.

Mackie, L.H., Frank, R.S. & Hochmuth, R.M. 1987. Erythrocyte density separation on discontinuous "Percoll" gradients. *Biorheology* 24:227-230.

Magnani, M. & De Flora, A., eds. 1991. *Red Blood Cell Aging*. Vol. 307, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York and London: Plenum Press.

Marikovsky, Y. & Danon, D. 1969. Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation. *Journal of Cell Biology* 43:1-7.

Marks, P.A. & Johnson, A.B. 1958. Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation* 37:1542-1548.

Matos, M.A.R. 1984. Aplicação da Ressonância Paramagnética Electrónica ao Estudo do Eritrócito. Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Porto.

Mazzocchi, F. 2008. Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Reports* 9:10-14.

McEvoy, L., Williamson, P. & Schlegel, R.A. 1986. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83:3311-3315.

McLellan, S.A., Walsh, T.S. & McLellan, D.B. 2002. Should we demand fresh red blood cells for perioperative and critically ill patients? *British Journal of Anaesthesia* 88:6-9.

McMahon, T.A. & Bonner, J.T. 1983. *On Size and Life*. New York: W. H. Freeman and Company.

Mehlhorn, R.J., Candau, P. & Packer, L. 1982. Measurements of volumes and electrochemical gradients with spin probes in membrane-vesicles. In *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press.

Mills, C.W. 1959. *The Sociological Imagination*. New York: Oxford University Press.

Mohandas, N. & Gallagher, P.G. 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112:3939-3948.

Mol, A. 2002. *The Body Multiple: Ontology in Medical Practice*. Durham, NC: Duke University Press.

Morange, M. 1994. *Histoire de la Biologie Moléculaire*. Paris: Éditions La Découverte.

Moreira, T. & Palladino, P. 2008. Squaring the curve: the anatomo-politics of ageing, life and death. *Body & Society* 14:21-47.

Morell, V. 1997. Microbiology's scarred revolutionary. *Science* 276:699-702.

Murphy, J.R. 1973. Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 82:334-341.

Noble, D. 2008. Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology. *Experimental Physiology* 93:16-26.

Noble, D. 2010. Biophysics and systems biology. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 368:1125-1139.

Nunes, J.A. 1996. Escala, heterogeneidade e representação: para uma cartografia da investigação sobre cancro. *Revista Crítica de Ciências Sociais* 46:9-46.

Nunes, J.A. 2008. O resgate da epistemologia. *Revista Crítica de Ciências Sociais* 80:45-70.

Nunes, J.A. & Roque, R. 2008. Introdução. In *Objectos Impuros: Experiências em Estudos sobre a Ciência*, editado por J.A. Nunes & R. Roque. Porto: Edições Afrontamento.

O'Connell, D.J., Caruso, C.J. & Sass, M.D. 1965. Separation of erythrocytes of different ages. *Clinical Chemistry* 11:771-781.

Offner, P.J. 2004. Age of blood: does it make a difference. *Critical Care* 8:S24-S26.

Oldenborg, P.-A. 2004. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leukemia & Lymphoma* 45:1319-1327.

Oldenborg, P.-A., Zheleznyack, A., Fang, Y.-F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D. & Lindberg, F.P. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051-2054.

Partridge, L. 2011. Some highlights of research on aging with invertebrates, 2010. *Aging Cell* 10:5-9.

Pauwels, L. 2006. A theoretical framework for assessing visual representational practices in knowledge building and science communications. In *Visual Cultures of Science: Rethinking Representational Practices in Knowledge Building and Science Communication*, editado por L. Pauwels. Lebanon: University Press of New England.

Pauwels, L., ed. 2006. *Visual Cultures of Science: Rethinking Representational Practices in Knowledge Building and Science Communication*. Lebanon: University Press of New England.

Piagnerelli, M., Silva, E., Garrido, A., Lambermont, M., Knobel, E., Vincent, J.-L. & De Backer, D. 2003. Age of red blood cell transfusions in critically ill patients: comparison of two opposite transfusion policies. *Intensive care medicine* 29:660-661.

Pinkofsky, H.B. 1997. The effect of donor age on human erythrocyte density distribution. *Mechanisms of Ageing and Development* 97:73-79.

Piomelli, S., Lurinsky, G. & Wasserman, L.R. 1967. The mechanism of red cell aging. I. Relationship between cell age and specific gravity evaluated by ultracentrifugation in a discontinuous density gradient. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 69:659-674.

Piomelli, S., Seaman, C., Reibman, J., Tytun, A., Graziano, J., Tabachnik, N. & Corash, L. 1978. Separation of younger red cells with improved survival *in vivo*: an approach to chronic transfusion therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:3474-3478.

Potthast, T. 2009. Paradigm shifts versus fashion shifts? Systems and synthetic biology as new epistemic entities in understanding and making 'life'. *EMBO Reports* 10:S42-S45.

Pranker, T.A.J. 1958. The ageing of red cells. *Journal of Physiology* 143:325-331.

Quintanilha, A., ed. 1988. *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*. Vol. 146, NATO ASI Series. New York: Plenum Press.

Quintanilha, A.T. & Mehlhorn, R.J. 1978. pH gradients across thylacoid membranes measured with a spin-labeled amine. *FEBS Letters* 91:104-108.

Rennie, C.M., Thompson, S., Parker, A.C. & Maddy, A. 1979. Human erythrocyte fractionation in "Percoll" density gradients". *Clinica Chimica Acta* 98:119-125.

Rheinberger, H.-J. 1990. Cytoplasmic particles. In *Biographies of Scientific Objects*, editado por L. Daston. Chicago and London: The University of Chicago Press.

Rheinberger, H.-J. 1997. *Toward a History of Epistemic Things: Synthesizing Proteins in the Test Tube*. Stanford: Stanford University Press.

Rifkind, J.M., Araki, K., Mohanty, J.G. & Suda, T. 1985. Age dependent changes in erythrocyte membrane function. In *Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as A Model*, editado por J.W. Eaton, D.K. Konzen & J.G. White. New York: Alan R. Liss.

Rous, P. 1923. Destruction of the red blood corpuscles in health and in disease. *Physiological Reviews* 3:75-105.

Rous, P. & Turner, J.R. 1916. The preservation of living blood cells in vitro: I. Methods of preservation. *Journal of Experimental Medicine* 23:219-237.

Rouse, J. 1998. Kuhn and scientific practices. *Division I Faculty Publications Paper 17* (wescholar.wesleyan.edu/div1facpubs/17).

Rouse, J. 2002. *How Scientific Practices Matter: Reclaiming Philosophical Naturalism*. Chicago: University of Chicago Press.

Santos-Silva, A., Castro, E.M.B., Teixeira, N.A., Guerra, F.C. & Quintanilha, A. 1995. Altered erythrocyte membrane band 3 profile as a marker in patients at risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 116:199-209.

Santos, B.S. 1988. Uma cartografia simbólica das representações sociais: prolegómenos a uma concepção pós-moderna do direito. *Revista Crítica de Ciências Sociais* 24:139-172.

Schiødt, E. 1938. On the duration of life of the red blood corpuscles. *Acta Medica Scandinavica* 95:49-79.

Schmeck Jr., H.M. 1966. Blood cell tests aid aging study. *The New York Times*, May 4.

Schroit, A.J., Madsen, J.W. & Tanaka, Y. 1985. *In vivo* recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry* 260:5131-5138.

Science for the Twenty-First Century: A New Commitment. 2000. Paris: UNESCO.

Shemin, D. & Rittenberg, D. 1946. The life span of the human red blood cell. *Journal of Biological Chemistry* 166:627-636.

Silva, P.C. 1992. Exercício Físico e Lesão Oxidativa. Relação com a Capacidade Aeróbia (Avaliação da Lipoperoxidação da Membrana Eritrocitária). Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto.

Smith, I.C.P., Scheir-Muccill, S. & Marsh, D. 1976. Spin labeling. In *Free Radicals in Biology*, editado por W.A. Pryor. New York: Academic Press.

Smith, J.A. 1995. Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Medicine* 19:9-31.

Smith, J.E. 1991. Comparative hematology. In *Hematology*, editado por W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev & M.A. Lichtman. New York: McGraw-Hill.

Snyder, L.M., Leb, L., Piotrowski, J., Sauberman, N., Liu, S.C. & Fortier, N.L. 1983. Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking *in vivo*: a marker for red cell senescence. *British Journal of Haematology* 53:379-384.

Soto, A.M., Rubin, B.S. & Sonnenschein, C. 2009. Interpreting endocrine disruption from an integrative biology perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304:3-7.

Soto, A.M. & Sonnenschein, C. 2004. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the old paradigm? *Bioessays* 26:1097-1107.

Soto, A.M. & Sonnenschein, C. 2005. Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *Journal of Biosciences* 30:103-118.

Soto, A.M., Sonnenschein, C. & Miquel, P.A. 2008. On physicalism and downward causation in development and cancer biology. *Acta Biotheoretica* 56:257-274.

Sparrow, R.L., Healy, G., Patton, K.A. & Veale, M.F. 2006. Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycophorin A and the release of annexin V. *Transfusion and Apheresis Science* 34:15-23.

Stengers, I. 1996. *Cosmopolitiques I - La Guerre des Sciences*. Paris: La Découverte.

Suzuki, T. & Dale, G.L. 1987. Biotinylated erythrocytes: in vivo survival and in vitro recovery. *Blood* 70:791-795.

Tinmouth, A. & Chin-Yee, I. 2001. The clinical consequences of the red cell storage lesion. *Transfusion Medicine Reviews* 15:91-107.

Tucker, E.M. & Young, J.D. 1982. Reticulocyte maturation in culture. In *Red Cell Membranes - A Methodological Approach*, editado por J.C. Ellory & J.D. Young. London: Academic Press.

von Wülfingen, B.B. 2009. Biology and the systems view. Is there a move towards systems approaches in the life sciences? *EMBO Reports* 10:S37-S41.

Young, B. & Heath, J.W. 2000. *Wheater's Functional Histology*. 4^a ed. London: Churchill Livingstone.

Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A. & Heath, J.W. 2006. *Wheater's Functional Histology*. 5^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone - Elsevier.

Zubair, A.C. 2010. Clinical impact of blood storage lesions. *American Journal of Hematology* 85:117-122.

ANEXO. Análise Bibliométrica – Métodos

Apresentam-se neste anexo os detalhes metodológicos da análise bibliométrica realizada para caracterização do campo dos estudos do envelhecimento eritrocitário; o enquadramento teórico da abordagem é parte do Capítulo 2, estando os resultados do estudo e sua discussão incluídos no Capítulo 3. Basicamente, avaliaram-se indicadores bem estabelecidos e frequentemente utilizados neste tipo de investigação²⁴, quer indicadores de produtividade – como o crescimento da literatura, autores mais produtivos e revistas mais produtivas –, quer indicadores de relações de primeira geração – nomeadamente através da análise de co-autorias e co-citações – quer de segunda geração – como a análise de co-ocorrência de palavras. Como fonte de dados recorreu-se a duas bases de dados bibliográficas. Os procedimentos no âmbito de cada um dos aspectos da análise bibliométrica são expostos depois de um breve apontamento sobre as bases de dados seleccionadas como fonte e no qual se procura explicitar o recurso a ambas bem como o interesse de cada uma, vantagens relativas e limitações.

Fontes de dados

A análise teve por base as referências incluídas em duas bases de dados bibliográficas de utilização alargada: a PubMed (PM), versão on-line de acesso livre da base de dados MEDLINE, um serviço desenvolvido pelo *National Center for Biotechnology Information* da *U.S. National Library of Medicine* e disponível no endereço pubmed.org²⁵; a *Web of Science*[®] (WoS), ou mais especificamente o *Science Citation Index Expanded*[™], da *Thomson Reuters*, na sua versão on-line disponível no endereço webofknowledge.com²⁶ do portal da *Web of Knowledge*. O recurso a estas duas bases de dados, que têm uma cobertura diferente e que, para cada referência, incluem parâmetros diferentes, teve por objectivo a procura de recolha de informação mais completa.

A PM foi criada em 1996, disponibilizando on-line conteúdo da MEDLINE, uma base de dados bibliográfica na área das ciências da vida e focada especialmente na

²⁴ Adopta-se aqui a nomenclatura utilizada por Michel Callon e colaboradores (cf. Callon *et al.*, 1993).

²⁵ [Conforme último acesso em Agosto de 2012.]

²⁶ Idem.

biomedicina. Actualmente, a PM permite acesso a referências desde o final dos anos mil novecentos e quarenta até ao presente, sendo possível ainda aceder a algum material mais antigo. São bem conhecidas duas limitações importantes da PM em bibliometria: a ausência de referências citadas e uma cobertura incompleta de endereços. A larga utilização da PM pelos investigadores da área fez com que se considerasse como fonte interessante no propósito deste trabalho – a ideia foi então ter uma percepção do campo tão próxima quanto possível daquela que vão tendo esses investigadores no decurso seu trabalho. Para além disso, a PM aproveita um sistema indexação da MEDLINE com recurso ao léxico MeSH (*Medical Subject Headings*) da *National Library of Medicine*²⁷, que permite um resultado de pesquisa eficaz/sensível.

A WoS tem uma cobertura multidisciplinar e reúne em ambiente da Web uma série de recursos, incluindo o *Science Citation Index Expanded*TM, o *Social Sciences Citation Index*TM e ainda o *Arts & Humanities Citation Index*[®]. Tem a sua origem em recursos originariamente do *Institute of Scientific Information (ISI)*, entidade criada por Eugene Garfield no final dos anos cinquenta e mais tarde adquirida pela *Thomson Corporation*, em 1992. Esta base de dados bibliográfica é muito utilizada em estudos bibliométricos, pela sua cobertura temporal e de área disciplinar, bem como pelo tipo de dados que contém: o facto de incluir informação das referências citadas nos diferentes artigos será a sua maior vantagem no âmbito desses estudos. O *Science Citation Index Expanded*TM tem uma cobertura desde 1899, sendo a informação mais completa a partir de 1991 pela inclusão de palavras-chave dos autores e dos termos *KeyWords Plus*[®] baseados nos títulos dos artigos citados.

Recursos informáticos

A análise dos dados bibliográficos foi realizada em Bibexcel, um programa desenvolvido por Olle Pearson na Universidade de Umeå, Suécia. O programa encontra-se disponível no endereço www.umu.se/inforsk/Bibexcel/²⁸, sendo de utilização livre para fins académicos. A última versão utilizada para o presente trabalho foi a de 2008-12-08.

Para a visualização de redes, recorreu-se ao programa Pajek desenvolvido para análise e visualização de redes sociais por Vladimir Batagelj e Andrej Mrvar (V. Batagelj, A. Mrvar: *Pajek – Program for Large Network Analysis*. Home page:

²⁷ Em: www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh. [Conforme último acesso em Julho de 2012.]

²⁸ [Conforme último acesso em Julho de 2012.]

<http://pajek.imfm.si/doku.php²⁹>). O Pajek é também de utilização livre para fins académicos. Usou-se aqui a versão 1.24.

Dados

Ao longo do trabalho são mencionados dados que cobrem o período até ao final do ano de 2011. Embora no decurso da investigação tenham sido analisados dados descarregados em diferentes momentos, os dados que se apresentam referem-se apenas a uma versão da análise actualizada para o final de 2011 com dados obtidos em Maio e Junho de 2012. Apresentam-se de seguida detalhes referentes a cada conjunto de dados.

– envelhecimento eritrocitário

Os últimos dados da PM referentes ao envelhecimento dos eritrócitos foram obtidos em 25 Maio de 2012; foi efectuada uma pesquisa básica para a expressão “*erythrocyte aging*” em “*All Fields*”; a pesquisa realizada para a expressão como “*Text Word*” resultou num mesmo número de referências. Foram assim obtidas 3712 referências; eliminados duplicados e a referência com data de publicação 2012 (incluída nos resultados da pesquisa por ter sido disponibilizada on-line em 2011), o ficheiro analisado inclui 3708 referências com data de publicação até ao final 2011. É relevante notar a respeito que a expressão “*erythrocyte aging*” foi introduzida no vocabulário MeSH no ano de 1967, tendo sido classificados documentos até 1965, e que, portanto, ao período anterior corresponde um rendimento na pesquisa realizada que será inferior.

Na WoS, uma pesquisa simples pela expressão “*erythrocyte aging*” não permite obter um conjunto de referências que possa ser considerado representativo da investigação no tema. Assim, optou-se por uma pesquisa combinando uma série de designações que se entendem equivalentes; foram consideradas as seguintes (pesquisadas em *Topic*): “*erythrocyte aging*”, “*red cell aging*”, “*red blood cell aging*”, “*RBC aging*”, “*erythrocyte age**”, “*red cell age**”, “*red blood cell age**”, “*RBC age**”, “*erythrocyte senescence*”, “*red cell senescence*”, “*red blood cell senescence*”, “*RBC senescence*”, “*senescence of the erythrocyte*”, “*senescence of the red blood cell*”, “*senescence of the red cell*”, “*senescence of the RBC*”, “*erythrocyte survival*”, “*red cell survival*”, “*red blood cell survival*”, “*RBC survival*”, “*young* erythrocyte**”, “*young* red cell**”, “*young* red blood cell**”, “*young* RBC**”, “*old* erythrocyte**”, “*old* red*

²⁹ Idem.

*cell**, “*old* red blood cell**”, “*old* RBC**”, “*senescent erythrocyte**”, “*senescent red cell**”, “*senescent red blood cell**”, “*senescent RBC**”, “*age of the erythrocyte**”, “*age of the red cell**”, “*age of the red blood cell**”, “*age of the RBC**”, “*age of erythrocyte**”, “*age of red cell**”, “*age of red blood cell**”, “*age of RBC**”, considerou-se ainda a ocorrência simultânea de *erythrocyte**, ou “*red cell**”, ou “*red blood cell**”, ou *RBC**, e “*cell* aging*”, ou “*cell* age**”, ou “*cell* senescence*”, ou “*senescent cell**”, numa última pesquisa acrescentaram-se as expressões mais abrangentes “*ag* of the erythrocyte*”, “*ag* of the red blood cell*”, “*ag* of the red cell*”, “*ag* of the RBC*”.

Os dados cuja análise se apresenta resultam de uma pesquisa efectuada em 3 de Junho de 2012 que permitiu encontrar um total de 1913 referências que foram descarregadas juntamente com as referências citadas.

– *envelhecimento celular*

Porque interessou situar os dados do estudo do envelhecimento eritrocitário no contexto mais alargado do estudo do envelhecimento celular, descarregaram-se ainda da PM referências indexadas pela expressão “*cell aging*” em “*All Fields*”. Os últimos dados da PM referentes ao envelhecimento celular foram obtidos em 5 de Junho de 2012, tendo sido assim obtidas 9175 referências; analisados duplicados e removidas as referências com data de publicação 2012 (incluídas nos resultados da pesquisa por terem sido disponibilizadas on-line em 2011), o ficheiro analisado incluiu 9106 referências com data de publicação até ao final 2011. Estes dados foram objecto de análise principalmente em termos da evolução temporal do número de publicações, sendo apenas brevemente mencionados no texto. Também neste caso é relevante fazer referência à introdução da expressão “*cell aging*” no vocabulário MeSH que aconteceu em 1992.

– *eriptose*

No caso do estudo em torno da introdução do termo “*eryptosis*”, os últimos dados foram descarregados em 15 de Maio de 2012; a pesquisa foi realizada para “*All Fields*”, no caso PM, e para o termo como “*Topic*”, no caso WoS. Os ficheiros analisados incluem 118 e 124 referências, nos casos PM e WoS, respectivamente.

Tanto no caso dos dados PM como no dos dados WoS é necessário algum trabalho de reformatação dos ficheiros obtidos para ser possível o seu estudo com recurso ao Bibexcel. Esse trabalho foi efectuada no EndNote[®], Microsoft[®] Office Word e

Excel. Os ficheiros de texto assim tratados foram depois convertidos para o formato “Dialog” usando o Bibexcel.

Adicionalmente, tendo em conta a variabilidade de nomes usados por um mesmo autor, foi necessário ainda proceder a uma verificação cuidada destes nomes e posterior normalização (sempre que isso foi justificado). A verificação foi feita para o conjunto os autores com um número de documentos publicados tal que não restaram dúvidas de que os nomes dos autores incluídos nos resultados – autores que publicaram pelo menos um dado número de documentos (discriminado sempre que se apresentam dados) – tinham sido todos objecto de verificação, não tendo ficado de fora outros que pudessem vir a ter a si associado um mesmo número de documentos. Neste trabalho, para além da confirmação no próprio documento, recorreu-se ainda à informação de outras bases de dados e nomeadamente a SciVerse Scopus³⁰. Só foram alterados/corrigidos nomes quando pareceu certo tratar-se de um mesmo indivíduo. A maior parte das vezes o problema prende-se com o uso de um número diferente de iniciais e nesses casos optou-se pela designação menos precisa, isto é, com menor número. Outras vezes o problema deriva de uso ou não de hífen e/ou espaço em nomes complexos, tendo-se nestes casos optado pela designação que pareceu ser mais frequente. Foram ainda corrigidas gralhas.

Análise dos dados e visualização de redes

A análise bibliométrica dos dados foi realizada no sentido de seguir o crescimento da literatura, incluindo a identificação de autores e revistas mais produtivas. De notar que no caso do nome das revistas envolvidas, para os dados WoS, e porque essa informação pode ser obtida em vários campos, se recorreu à informação em “SO”. Para além disso, procurou-se ainda observar o padrão de colaboração na área bem como os temas abordados na literatura do envelhecimento eritrocitário, tendo sido usado neste caso o método da co-ocorrência de palavras aplicado a palavras-chave. Nos casos em que essa informação estava disponível, foi ainda feita análise de citações ou ainda de co-citações.

Para cada um destes aspectos, calcularam-se frequências e/ou co-ocorrências. Estes últimos dados obtidos no Bibexcel podem ser aí transformados em ficheiros adequados a ser lidos pelo programa Pajek. Todas as visualizações de redes que se apresentam são baseadas no algoritmo Kamada-Kawai (que procura uma

³⁰ Em: www.scopus.com. [Conforme último acesso em Agosto de 2012.].

minimização de energia do modelo) tal como este se encontra implementado no programa. Para a construção dos mapas e tendo em conta a sua legibilidade, considerou-se um número de possíveis vértices de aproximadamente 200. Em cada mapa, o tamanho dos vértices é proporcional à sua frequência; entre mapas, em figuras diferentes, esses tamanhos não são aqui comparáveis. Sempre que tal se justificou no sentido de uma melhor visualização, foram feitos pequenos ajustes nas posições dos vértices.