



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO**

**AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE HEMÁCIAS  
HUMANAS E SUAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

**FRANCISCO FERNANDES AMANCIO**

**Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências  
na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:  
Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior**

**São Paulo**

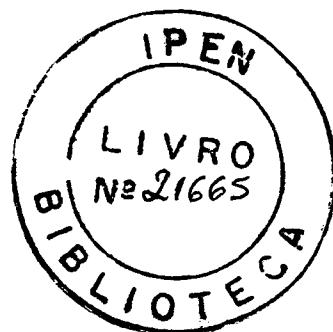
**1998**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE HEMÁCIAS  
HUMANAS E SUAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

**FRANCISCO FERNANDES AMANCIO**



**Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Doutor em Ciências  
na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior**

**SÃO PAULO**

**1998**

## DEDICATÓRIA

Dedicado à

Maria,

Rafael

Paula e

Felipe.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Aos meus pais, José Amancio Carlos (in memoriam) e  
Maria Fernandes Amancio, mentores do nosso crescimento.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e, especialmente:

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, o Orientador, Conselheiro e amigo de todas as horas.

À Dra. Ana Maria Mendonça de A. Melo, pela participação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Paulo A. Silveira, pelas importantes sugestões durante os exames de qualificação e seminário de área e pela franquia do seu laboratório no Hemocentro-do HC-FMUSP.

Ao Prof. Dr. José Roberto Rogero, pelas contribuições durante os exames de qualificação e seminário de área e por haver me apresentado ao Prof. Heitor.

Ao pessoal do corpo técnico, administrativo e auxiliares do IPEN-TBR-TBM, pela substancial ajuda durante os primeiros passos.

Às bibliotecárias da biblioteca Terezine A. Ferraz – Maria Tereza Zavitoski e Doralice Lima Xavier, que foram nosso elo de ligação com o acervo.

À Profa. Dra. Barbara Maria Rzycki, pela importante ajuda, quando foi necessária a troca de irradiador, nos nossos experimentos.

Ao Eng<sup>o</sup> Carlos Gaia da Silveira pelo aporte técnico especializado durante as irradiações.

À Eng<sup>a</sup> Elizabethe Sebastiana Ribeiro Somessari, pelo mesmo motivo.

À Dra. Luiza Guglielmi, que gentilmente nos cedeu a cepa de mieloma utilizada na busca da produção de anticorpos monoclonais.

Ao Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, pelo valioso assessoramento durante as avaliações de resposta imune, feitas por citometria de fluxo.

À Sra. Katsue Yasumura, pelo apoio técnico durante as avaliações citométricas das hemácias irradiadas.

À Srta. Iara Keiko Yokomizo, pelo apoio técnico recebido durante as avaliações de hemácias irradiadas por ectacitometria laser assistida.

Ao biólogo Luiz Roberto M. Mundel, pela valiosa ajuda durante a inoculação de células em camundongos, bem como, durante a retirada de mielomas e recuperação de líquido ascítico

À técnica Roselaine P. A. Cardoso, pela dedicação e auxílio técnico em diferentes etapas do nosso trabalho.

À bióloga Isabel Cristina Alves, pelo suporte técnico e dedicação no manejo e manutenção dos animais experimentais.

Ao técnico Almir Robson Ferreira, pelo suporte técnico fotográfico.

Ao doutorando Bruno A. Cardi, pelas discussões sugestões e ajuda em diferentes etapas de nosso trabalho.

Ao doutorando Roberto Hiramoto, pelo mesmo motivo.

Ao biólogo Andrés Jimenez Galisteo Jr., pelo desvendar dos mistérios da computação.

À prof. Dra. Kaio Okasaki pelas valiosas sugestões que contribuíram para a melhoria qualitativa deste trabalho

A ajuda financeira concedida pelo programa **CAPES/PICDT** na forma de bolsa de estudos, possibilitou o desenvolvimento deste trabalho

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF COBALT-60 IONIZING RADIATION ON HUMAN ERYTHROCYTE AND ITS MEMBRANE PROTEINS**

**Francisco Fernandes Amancio**

Ionizing radiation has several uses, as sterilization and radiotherapy, by its effects on living beings. Recently, it has been used, at relatively lower doses (25 Gy), on blood for transfusions, mainly to eliminate undesirable graft vs host reactions, for use in multi transfused or immunocompromized patients. Here, we study the effect of larger doses of cobalt-60 ionizing radiation (25-1600 Gy) on human erythrocytes, by citometric, physiologic, biochemical and immunological methods, looking for its effects and its detection. The red cells presented a clear dose-dependent increase in its volume, when irradiated in doses higher than 200 Gy, more significant in stored blood, but without hemolysis. Osmotic fragility was increased only after irradiation of more than 400 Gy. By ektacytometry, there was a lower deformability of irradiated red cells, at low stress (0.3 Pa), similar to capillary flow, but without alteration in higher stress (3 Pa), found in cardiac chambers. By SDS-PAGE, it was demonstrated that irradiated isolated erythrocyte membranes had aggregation of spectrin molecules, and decay of bands with lower molecular mass. This effect could be attributed to the radiation-induced hydroxyl radical, by specific scavenger studies. Those modifications were both antigenic and immunogenic in experimental animals, and the induced antibodies recognizes, by ELISA and immunoblot, both native or irradiated membrane proteins. They recognize rather irradiated whole erythrocyte than native ones, by hemagglutination, indirect immunofluorescence or flow cytometry assays. Our data suggests that human red cells could be irradiated at higher doses than those usually employed, with possible effect on other contaminant pathogens, without loss of viability of its use in transfusions. After improvements, irradiation induced epitopes detection could be a new tool in biological dosimetry.



## RESUMO

### AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE DO COBALTO-60 SOBRE HEMÁCIAS HUMANAS E SUAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

Francisco Fernandes Amancio

A radiação ionizante tem múltiplos usos, por seus efeitos sobre seres vivos, como a esterilização de materiais e radioterapia. Recentemente e em doses relativamente baixas (25 Gy), tem sido usada em sangue para transfusões, visando a eliminação de reações enxerto vs hospedeiro, em pacientes politransfundidos ou imunossuprimidos. Aqui, estudamos os efeitos de doses maiores de radiação ionizante do cobalto-60 (25-1600 Gy) sobre hemácias humanas, por métodos citométricos, fisiológicos, bioquímicos e imunológicos, para determinação dos efeitos deste processo e detecção de modificações. Hemácias humanas A+ apresentaram um aumento de volume dose-dependente, quando irradiadas acima de 200 Gy, mais evidente nas obtidas de sangue estocado, sem hemólise significativa. Havia uma maior fragilidade osmótica apenas em doses superiores a 400 Gy. Por ectacitometria, as hemácias irradiadas apresentavam uma menor deformabilidade em estresses (0,3 Pa) semelhantes ao fluxo capilar, embora inalterada em estresses maiores (3 Pa) compatíveis às câmaras cardíacas. Por estudos de SDS-PAGE, foi possível demonstrar que haviam alterações como agregações de espectrina e desaparecimento de bandas de massa molecular menor, em membranas purificadas irradiadas. Estes efeitos estavam relacionados ao radical hidroxil, formado pela radiação, demonstrado por captadores específicos. Estas modificações foram antigênicas e imunogênicas em modelos de imunizações em animais, tanto por ELISA como por imunomarcção de proteínas isoladas. Os anticorpos produzidos reconheciam preferentemente hemácias integras irradiadas, por técnicas de hemaglutinação, imunofluorescência indireta e citometria de fluxo. Nossos dados comprovam que as hemácias humanas podem ser irradiadas com doses superiores à aquelas usualmente utilizadas, com possível efeito sobre patógenos contaminantes, sem perda da viabilidade do material para uso em transfusões. Desde que aprimorada, a detecção de epítopos modificados pela radiação pode oferecer uma nova ferramenta dosimétrica.

# SUMÁRIO

	Página
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 - OBJETIVOS</b>	12
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	13
3.1 <b>MATERIAIS</b>	13
3.1.1 Fontes de irradiação	13
3.1.2 Sangue	13
3.1.3 Animais	13
3.1.4 Reagentes	13
3.1.5 Meios de cultura de célula	14
3.2 <b>MÉTODO</b>	14
3.2.1 Purificação e irradiação de hemácias humanas	14
3.2.2 Estudos citométricos	15
3.2.3 Estudos de hemólise isosmótica e de resistência globular ao choque osmótico	15
3.2.4 Estudos da deformidade celular ao “stress” rotacional	16
3.2.5 Purificação de “ghosts”	16
3.2.6 Irradiação de “ghosts”	17
3.2.7 Irradiação na presença de captadores específicos (scavengers) para classe de radicais livres induzidos pela radiação	17
3.2.8 Análise de proteínas (SDS-PAGE)	17
3.2.9 Produção de anticorpos	18
3.2.9.1 Policlonais	18
3.2.9.2 Monoclonais	19
3.2.10 Detecção de especificidade de anticorpos policlonais produzidos contra “ghost” de hemácias irradiadas	20
3.2.10.1 Elisa	20
3.2.10.2 Western blot	21
3.2.10.3 Hemaglutinação	21
3.2.10.4 Reação de imunofluorescência indireta (IFI)	22

3.2.10.5 Citometria de fluxo	22
<b>4 – RESULTADOS</b>	<b>24</b>
4.1 Radiação de hemácias	24
4.2 Estudos citométricos	24
4.3 Fragilidade osmótica	26
4.4 Purificação e irradiação de “ghosts”	28
4.5 Produção de anticorpos anti-“ghosts” de hemácias irradiadas	30
4.5.1 Imunização de coelhos e camundongos	30
4.5.2 Detecção de anticorpos por hemaglutinação de hemácias irradiadas	30
4.5.3 Detecção de anticorpos anti-ghosts de hemácias irradiadas por ensaio imunoenzimático(ELISA)	31
4.5.4 Detecção de anticorpos em hemácias integras por imunofluorescência indireta	32
4.5.5 Identificação de anticorpos em proteínas separadas em SDS-PAGE(Western-Blot)	34
4.6 Citometria de fluxo	35
4.6.1 Ensaio de citometria de fluxo com absorção prévia de anticorpos.	37
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>7 - BIBLIOGRAFIA</b>	<b>50</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## *As radiações e seus usos*

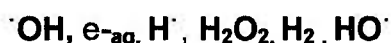
A relação entre radiação e seres vivos sugere um pacto bem estabelecido e antigo que foi se consolidando ao longo do tempo pelos diferentes mecanismos da evolução. Por este caminho podemos tentar compreender a estreita relação existente entre radiação da luz visível e fotossíntese, Ultra Violeta e síntese de vitaminas na pele dos mamíferos(Kagan, et.al.1992) e até a bioluminescência dos microorganismos. Essa relação, no entanto, não é sempre harmônica, pois a luz visível pode causar danos em maior ou menor grau quando associada a substâncias que potenciam os efeitos da luz como as furocumarinas e psoralen (Kayagova, et. al.1997) por outro lado o homem por diferentes caminhos vem quebrando o pacto inicial e favorecendo uma ação mais intensa dos componentes do Ultra Violeta, reconhecidamente mutagênicos.

Do ponto de vista das radiações ionizantes, o grau de dispersão com que ocorrem os materiais radioativos na natureza, impõe uma radiação de fundo, cujas energias são perfeitamente compatíveis com o desenvolvimento dos sistemas biológicos. O conhecimento da tecnologia das radiações permitiu concentrar essa radiação primitivamente dispersa, tornando disponível uma modalidade desta energia, cuja aplicabilidade, para fins pacíficos se estende aos mais diversificados ramos de atividade humana. Em face das suas características, tais como poder de penetração e capacidade de modificação da matéria, as radiações ionizantes, do tipo gama, encontram aplicabilidade na agricultura, indústria de laminados, conservação de alimentos(Osterholm & Potter,1997). Além disso, também auxiliam na produção de equipamentos de precisão, aferição de soldas em poços de petróleo submarinos, dentre outros usos.

Os efeitos das radiações sobre a matéria dependem primordialmente da absorção de energia. Essa interação pode ocorrer de forma direta, quando o fóton incidente é absorvido pela matéria, diretamente gerando a ionização ou energização da molécula; ou de forma indireta, quando moléculas do meio absorvem a energia e sofrem modificações físicas que propiciam a gênese de novas entidades químicas reativas, de vida média mais longa, por vezes biologicamente nocivas(Riley, 1994). Da mesma forma, as radiações ionizantes,

ao promoverem excitações e ou ionizações de moléculas, direta ou indiretamente, exercem um grande poder modificador sobre os seres vivos, podendo inclusive ter auxiliado na geração da vida(Draganic *et al*, 1985). As ionizações promovidas, via radiação gama ao serem absorvidas pela matéria, são basicamente feitas mediante interação com elétrons orbitais por um efeito fotoelétrico ou efeito Compton. Para energias superiores a 1,02 MeV, podem ocorrer interações com o núcleo atômico, determinando a formação de pares(Seltzer, 1993).

Nos sistemas biológicos, onde a água é um elemento preponderante, os efeitos da radiação são na sua maioria indiretos e devidos à radiólise da água(Schuessler & Shilling 1984) que forma radicais fortemente reativos capazes de transferir a energia adquirida para moléculas orgânicas(Hagen, 1989). A espectrometria de massa da água revela a presença das espécies químicas  $\text{HO}^2$ ,  $\text{HO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e pequenas quantidades de  $\text{H}_2$  e  $\text{O}$  (Butler, Land & swallow. 1984). A absorção da radiação ionizante por essas espécies químicas pode promover ionizações, conduzindo a novos arranjos estruturais e originando espécies primária em solução, do tipo:



Na interação desses radicais com as moléculas orgânicas, os radicais hidroxilas atuam como poderosos oxidantes, enquanto o elétron aquoso, funciona como um poderoso agente redutor (Feldberg & Carew, J.A. 1981).Pela sua prevalencia e reatividade a maioria dos efeitos biológicos da radiação, relacionados ao dano de proteínas ou ácidos nucléicos tem sido relacionada à ação deste radical livre( Butler *et .al*, 1984, Davies *et al*, 1987).

Na Biologia e na Medicina, as radiações ionizantes encontram as mais diversificadas aplicações, pelos seus vários efeitos. Materiais descartáveis de uso médico, materiais cirúrgicos(Grecz *et al*, 1987) e biológico(Mair, 1988) são mantidos em condições estéreis pela irradiação com doses ótimas de radiação ionizante, geralmente acima de 20kGy. A radiação X continua sendo um excelente auxiliar em procedimentos diagnósticos, enquanto a radiação gama encontra aplicabilidade no tratamento de carcinomas(cobaltoterapia). A capacidade de induzir modificações estruturais em proteínas (Schuessler & Shilling, 1984), lipídios (Bonfont-Rousselot *et al*, 1993) e ácidos

nucleicos(Seach *et al*, 1996), tem recomendado seu uso na inativação de venenos para uso em imunógenos(Nascimento *et al* 1996) ou no processamento de antígenos (Edelman *et al*, 1993) ou inativação de microorganismos patogênicos(Kim & Thayer, 1995).

#### *O sangue humano.*

O sangue humano tem inúmeras aplicações em Medicina, servindo para repor as perdas de seus vários constituintes em pacientes com choque hemorrágico ou insuficiente produção de alguns de seus elementos. Em sua composição encontramos duas frações principais, um meio líquido, plasma, constituído de proteínas e sais, e uma parte celular, composta de hemácias, leucócitos e plaquetas. Todas as células do sangue possuem um ancestral comum, células pluripotentes, das quais se originam por diferenciação celular, sendo que cada um apresenta funções específicas. Assim, os leucócitos, células nucleadas do sangue, também são divididos em vários grupos celulares, sendo principais os neutrófilos, células de defesa inespecíficas, e os linfócitos responsáveis pela resposta imune específica. As plaquetas, fragmentos celulares dos megacariócitos, são responsáveis pela manutenção da integridade vascular, atuando tanto mecânicamente como no sistema de coagulação(Nakauchi & Gachelin, 1993)

O maior contingente celular do sangue é composto de hemácias. Estas células anucleadas são repletas de hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio, circulando por todo o organismo. Estas células são formadas na medula óssea, apresentando uma maturação bem conhecida que termina na produção maciça de hemoglobina. Durante a sua maturação, ocorre a perda do núcleo e a aquisição de uma forma bicôncava característica, mantida por um interessante citoesqueleto. Esta arquitetura celular, forma um conjunto bastante flexível permitindo que uma célula de 8 $\mu$  atravessê repetidas vezes por capilares de 3,5 $\mu$ m, perfazendo um percurso de quase 500 Km durante sua vida útil de aproximadamente 100 dias(Hoffbrand & Petit,1993).

#### *O sangue como um órgão transplantado*

Quase sempre associada a atos religiosos, rejuvenescimento ou prolongamento da vida a idéia e a prática das transfusões de sangue tem um

passado empírico e folclórico, repleto de insucessos, até os primórdios do século XX, quando os grupos sanguíneos e uma solução anti-coagulante adequada foram descobertos(Greenwalt, 1997)

Em doentes agudos ou com choque hemorrágico, estas preparações mostraram-se salvadoras, permitindo a recuperação de inúmeras vidas. Com o aprimoramento da armazenagem, soluções e materiais para uso em transfusões, hoje é possível usar sangue ou seus subprodutos até quarenta e dois dias após a coleta, na maior parte dos centros hospitalares. Em pacientes crônicos, com doenças hematológicas ou em grupos especiais de pacientes com altos volumes de sangue transfundido, leucócitos contaminantes e grupos sanguíneos de menor importância passaram a ser um novo problema. Antes de Landstainer, as transfusões davam sucesso aleatório, pois a incompatibilidade para os grupos sanguíneos de maior prevalência levava a hemólise rápida das hemácias transfundidas, com suas conseqüências(Greenwalth, 1997). A descoberta de outros fatores presentes na superfície de hemácias levou a detecção de novas síndromes relacionadas a incompatibilidade sanguínea, com doença hemolítica, em fetos e neonato, relacionadas ao antígeno Rh da superfície de hemácias(Bowman, 1997). Embora cercada de medidas profiláticas corretas, este tipo de terapia está sujeita a vários problemas como os decorrentes de reações entre o hospedeiro e o sangue transplantado, com poucos estudos sobre a resposta dos leucócitos transplantados contra o hospedeiro até 1960. Os mecanismos envolvidos nessa forma de resposta imune, são hoje estudados como doença do enxerto versus hospedeiro(Leitman & Holland, 1985). Os primeiros estudos sobre a doença relatam a ocorrência de uma síndrome, descrita em animais experimentais irradiados e que ocorria seis semanas após receberem infusão de macerados celulares homólogos de baço, linfonodos ou timo, ou células da medula óssea, para regeneração dos efeitos da radiação. Os animais apresentavam perda de peso, aumento do baço, diarreia, anemia e diminuição dos leucócitos circulantes(Bekkum, 1965). Após esse período, foram descobertos os antígenos de histocompatibilidade, responsáveis pela cooperação entre células da resposta imune(Bodmer *et al*, 1966). Hoje, sabemos que esta forma de resposta é em geral causada pela maior ou menor histocompatibilidade do hospedeiro em resposta a proliferação celular de linfócitos T maduros

provenientes do doador(Thomas *et al*, 1975), embora uma certa discussão tenha havido(Persijn *et al*, 1982).

### *Usos do sangue e seu derivados*

Diversas condições clínicas podem recomendar o uso do sangue total ou de seus derivados, de forma ocasional ou em tratamentos continuados. Dentre as múltiplas indicações da hemoterapia, situam-se as desordens do recém nascido de caráter imuno-hematológico, que requerem transfusões, até na vida intra-uterina(Winkelstein & Kiss, 1997) ou ainda, doenças sistêmicas do sangue, transplante de órgãos ou determinadas intervenções cirúrgicas, onde o volume do sangue utilizado é muito elevado(Utley *et al*, 1995). Assim, além do sangue total, são utilizados rotineiramente nos centros hospitalares, a administração de plasma concentrados de plaquetas ou de hemácias, inclusive com medidas padronizadas para seu uso(Hillmann *et al*, 1979). Desde que o doador seja absolutamente saudável, apenas os fatores supracitados relativos a novos antígenos ou células apresentadas ao doador são considerados.

### *O risco da transfusão*

A transfusão sangüínea, embora seja de uso corriqueiro, continua sendo uma medida que envolve riscos. Recentemente, tornou-se uma prática usual a transfusão homóloga(Blais, 1996) como forma de prevenir os riscos das incompatibilidades entre grupos sanguíneos e outras reações imunológicas adversas.

Reações hemolíticas, clinicamente importantes decorrentes das transfusões, estão com maior freqüência associadas ao sistema ABO e Rh(Mair & Benson, 1998). Reações associadas a outros sistemas são raras e ocasionais.

Contaminações operacionais, decorrentes do manuseio do sangue pode ocorrer nas diferentes fases do processo, por bactérias, fungos e microorganismos saprófitas, sendo isolados de frascos contaminados, cepas do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Bacillus*. A fonte pode ser o próprio sangue, assepsia incorreta ou material esterilizado incorretamente. O uso de antissépticos pode não ser eficaz na prevenção das diferentes formas de infecção (Soerensen, 1975), mas as contaminações bacterianas geralmente são de mais fácil



identificação, por apresentarem freqüentemente intenso crescimento(Burstain *et al*, 1997).

Por outro lado, infecções parasitárias podem ser veiculadas, por ocasião das transfusões ou durante a utilização de concentrados de plaquetas ou de hemácias. Assim, a existência de protozoários no sangue periférico durante o período de coleta torna possível a transmissão da malária, sendo descritos casos de malária após transfusão em áreas endêmicas e áreas não endêmicas(Soerensen 1975). Outras parasitoses onde o parasita se mantém no sangue sem crescimento evidente, como a doença de Chagas, toxoplasmose, leishmaniose visceral e outras, podem ser veiculadas durante as transfusões(Shulman, 1994). Bactérias com comportamento semelhante, como *Treponema pallidum*, podem representar um risco para transfusões, embora estes agentes sejam mais frágeis, sendo eliminados por armazenagem prolongada do sangue em temperaturas de 4°C, mas continua a existir o risco potencial da transmissão da sífilis via transfusão, caso hajam menores tempos de conservação, o que é freqüente(van der Shuis *et al*, 1985).

As infecções virais são também um importante e crucial problema, sendo um fator de risco maior nas transfusões. Os vírus são agentes submicroscópicos de difícil eliminação e alta transmissão em materiais biológicos, sendo facilmente veiculados pelo sangue, mesmo após cuidadosa armazenagem(Tyler & Fields, 1996; Chamberland, 1998). Doenças como as hepatites virais B e C, Mononucleose infecciosa, Citomegalovirose e AIDS podem se propagar por esse caminho(Gurtler, 1994). As avaliações sorológicas, destinadas a manter um estoque de sangue isento de todas as formas de contaminação, pelo descarte de material com contato prévio com o agente, requerem o emprego de recursos laboratoriais tecnicamente sofisticados(Poleski, 1996), bem como pessoal especializado, o que resulta em custo social e econômico, pelo descarte do material doado possivelmente contaminado.(Schmunis *et al*, 1998).

### *Radiação e sangue*

Leucócitos têm sido utilizado como modelo para identificar a exposição à radiação, problema recente, motivado pelo aumento da capacidade humana de concentrar material radioativo ou produção de radiações com elevados níveis energéticos.(Müller & Streffer, 1991). Neste aspecto, o estudo dos efeitos da

radiação concentram-se na agressão às células nucleadas, tanto por lesão do DNA (Mill *et al*, 1996; Anonymous, IAEA, 1986) quanto pela indução de apoptose em linfócitos e outras células (Haimovitz Friedman *et al*, 1994), resultando em morte celular.

Dentre os diversificados usos das radiações ionizantes na área médica, a irradiação de sangue e derivados tem sido indicada como forma de eliminar problemas relacionados com a rejeição do tipo transplante versus hospedeiro, causa de insucesso nas transfusões especialmente em politransfundidos ou imunosuprimidos. Acidentes desta natureza estão relacionados com falhas no sistema imune do receptor, que se revela incapaz de eliminar linfócitos transfundidos. Irradiar sangue, é portanto uma prática rotineiramente adotada pelos mais aparelhados bancos de sangue em todos os continentes. Neste caso, o alvo principal dentre os diferentes componentes do tecido sanguíneo são os linfócitos, por estarem diretamente envolvidos com os mecanismos das rejeições (Fagiolo *et al*, 1983). Os esquemas de irradiação do sangue foram portanto muito bem estudados, atendem aos propósitos estabelecidos e obedecem a legislações recomendadas pela FDA. As doses recomendadas são de 2500 cGy (Cable, 1966; Butch & 1996) com estocagem nunca superior a 28 dias após a irradiação. As hemácias, no entanto, são sabidamente mais radioresistentes do que linfócitos e plaquetas.

A manutenção dos estoques de sangue e derivados requer avaliações laboratoriais onerosas, para prevenir a veiculação de diferentes microorganismos patogênicos encontrados no sangue. Essa vigilância implica em investimentos elevados. Entretanto, uma possível redução dos custos e ganho de qualidade do sangue e derivados pode advir do incremento da dose usualmente adotada pelos bancos de sangue (Sweeney *et al*, 1994). Foi descrito que radiação ionizante nas doses de 200Gy produziu sensível redução da parasitemia em *Plasmodium falciparum*(Waki *et al*, 1983.), e *Toxoplasma gondii* (Dubey *et al*, 1996, Hiramoto, 1998), com esterilização, donde se vislumbra a possibilidade de ampliação dos benefícios da irradiação do sangue com redução dos custos e ganho de qualidade.

A relatada radioresistencia presente nas hemácias(Button *et al*, 1981) nos pareceu uma atraente característica biológica, necessitando de avaliações mais aprofundadas quanto a extensão e fixação dos danos radioinduzidos. Assim,

averiguações sobre mudanças moleculares ocorridas na membrana conseqüentes ao uso das radiações ionizantes, capazes de interferir na habilidade de modificação espacial celular, das hemácias, quando fisiologicamente solicitadas pela hemodinâmica própria de cada compartimento corpóreo, a ser irrigado, durante a circulação sanguínea (Stuart & Nash, 1990; Nash & Gratzler, 1993). Modificações desta natureza, poderiam ser mensuradas em simuladores adequados do tipo ektacitometro, Laser assistido, que pelas suas avançadas características tecnológicas, conseguem submeter as células a diferentes níveis de pressão rotacional, similares aos experimentados pelas hemácias quando no meio circulante (Mohandas & Chasis 1993).

A questão da armazenagem do sangue irradiado, bem como os limites de irradiação também poderia ser revista, quanto aos aspectos relativos a fragilidade osmótica e perdas iônicas referidas na literatura (Arseniev *et al*, 1994). Para tanto, avaliações citométricas, associadas a variações da osmolaridade do meio poderiam nos levar a proposição de novos parâmetros para irradiação e conservação do sangue e derivados.

A maioria dos estudos envolvendo radiações e seus efeitos sobre sistemas biológicos, foram direcionados aos danos à molécula de DNA, devido à implicações decorrentes, como alterações na síntese de proteína, herança biológica e morte celular (Müller & Streffer, 1991).

Embora igualmente afetadas, as proteínas foram apenas ocasionalmente avaliadas com finalidades dosimétricas, sendo a radiação usada mais como tecnologia para finalidades específicas (Nascimento *et al*, 1996). Os efeitos da radiação sobre proteínas do soro foram estudados de forma externa, com doses elevadas de radiação, com detecção de agregação e perda de algumas frações (Schuessler & Schilling, 1984). Para uma avaliação dosimétrica, as alterações induzidas pela radiação ionizante sobre proteínas de membranas seriam um modelo ideal, pelo menor número de proteínas envolvido e maior acessibilidade para uso de sondas como anticorpos, quer em proteína isolada ou células irradiadas.

O estudo da fixação dos danos induzidos pela radiação ionizante a membrana de hemácias humanas é um alvo ideal como modelo experimental para dosimetria biológica dos efeitos da radiação, pelas suas peculiaridades celulares. Assim, a facilidade de obtenção do tecido sanguíneo, a simplicidade da

metodologia de purificação de hemácias e purificação de “ghosts”, a ausência de outros organelos celulares, a presença de um único sistema de membranas aliada ao conhecimento acumulado sobre a sua estrutura e fisiologia, auxiliam na compreensão do fenômeno.

Detalhado estudo dos mais expressivos polipeptídeos encontrados na membrana dos eritrócitos humanos, foi conduzido, usando eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, determinando-se o perfil eletroforético das proteínas isoladas de “ghosts” de membrana, comparando a eficiência de corantes e relatando a presença de agregados de proteína quando estas foram tratadas com solventes orgânicos ácidos, ou quando submetidas a elevação de temperatura na presença de baixas concentrações de SDS (Fairbanks *et al*, 1971).

A formação de ligações intermoleculares ou cross-links nas maiores proteínas de membrana foi estudada quando ficou demonstrado que este tipo de ligação ocorria em proteínas tratadas com formaldeído, e glutaraldeído, formando agregados de alto peso molecular (Steak, 1984). Posteriormente, foi encontrada a formação de agregados de alto peso molecular quando proteínas isoladas *ghost* de hemácias foram irradiadas com raios X, sendo que a maioria destes resultavam da agregação de pequenas frações de espectrina, provavelmente determinadas por pontes dissulfídicas S-S, como mecanismo molecular para a formação destas ligações (Schuurhuis *et al*, 1984)

Em estudo semelhante, modificações estruturais em proteínas de membranas irradiadas foram observadas (Todo *et al*, 1982). Foi demonstrado por SDS-PAGE, que a espectrina é uma proteína de grandes dimensões e que possui duas sub-unidades pesando 240 kDa e 215 kDa respectivamente e que era o alvo principal com maior radiosensibilidade aos raios X, quando comparado com outras menores proteínas de membrana. Esse fenômeno se acentuou de forma proporcional ao aumento da dose de radiação. É sugerido que a extensão da fibra de espectrina, cerca de 1000 angstroms favorece a ação dos radicais livres. Foi também sugerido que a banda 3, uma proteína 88 kDa, não se modifica com a ação da radiação ionizante até a dose máxima utilizada nos seus experimentos, 400Gy em condições aeróbicas. Outras observações relativas as modificações estruturais de proteínas de membranas irradiadas foram feitas em hemácias íntegras, com o auxílio da microscopia de contraste de fase. Neste caso é possível observar que modificações conformacionais da membrana começam a

acontecer na dose de 400Gy, sendo no entanto descartada a formação de agregados, por haver trabalhado em altas concentrações de SDS (Todo *et al*, 1982).

As abordagens encontradas na literatura especializada abrangem aspectos resultantes das modificações radioinduzidas, em proteínas isoladas de hemácias e avaliam seu comprometimento estrutural. Outros estudos se debruçam sobre modificações espaciais das hemácias irradiadas, visíveis em suspensão aquosa, à luz da microscopia eletrônica. Entretanto o potencial modificador das radiações ionizantes tem sido pouco aproveitado no sentido de avaliar o comportamento de hemácias irradiadas quando no meio circulante e em diferentes patamares de pressão, desencadeadas pelo estreitamento e alargamento dos vasos, bem como pelas bombas e válvulas propulsoras encontradas no seu trajeto. Embora o rastreamento dessas células irradiadas seja de difícil execução no sistema circulatório, o uso de simuladores adequados pode simplificar essa tarefa e ainda fornecer dados numéricos confiáveis (Treicheler 1993).

Os estudos relativos aos efeitos das radiações ionizantes, contemplam de forma isolada a ação dessas radiações sobre proteínas, de membranas, a peroxidação de lipídios ou ainda o efeito dessas radiações sobre as hemácias intactas, em alguns aspectos de sua fisiologia. Esses estudos no entanto se concentram sobre modificações físicas estruturais detectáveis por diferentes ensaios. São esparsas as referências aos aspectos fisiológicos das hemácias irradiadas (Helszer *et al*, 1980). Foi estudada a fisiologia das hemácias irradiadas, em associação com radicais livres e uma mistura de scavengers, com enfoque principal em medidas das variações de permeabilidade da membrana, feitas em "ghosts" irradiados e re-selados (Kong *et al*, 1981). Não encontramos na literatura levantada referências aos efeitos das radiações ionizantes sobre a geração de novos epítomos em proteínas estruturais de membrana e/ou suas implicações quanto a deformabilidade das hemácias após radiação, frente a modificações de pressão que ocorrem no meio circulante.

Uma outra atraente abordagem relativa a radiação ionizante e seus efeitos sobre proteínas de membranas, e que não foi convenientemente estudada, consiste no estabelecimento de uma sonda imunológica capaz identificar hemácias irradiadas no meio circulante pela produção de anticorpos dirigidos contra epítomos específicos de superfície de membranas induzidos pela radiação.

Nesse trabalho nos propusemos a estudar os efeitos das radiações ionizantes sobre proteínas de superfície de hemácias irradiadas, enfocando esses dois aspectos ainda não contemplados pela literatura especializada.

## 2 - OBJETIVOS

### Geral

Em nossos estudos, pretendemos avaliar os efeitos de doses progressivas de radiação ionizante de Cobalto-60 sobre hemácias humanas, procurando alterações em sua estrutura, fisiologia e propriedades antigênicas.

### Específicos

- a. Avaliar as alterações de volume e concentração de hemoglobina em hemácias submetidas a radiação ionizante, entre 25 e 1600 Gy.
- b. Avaliar a resistência da membrana a choque hiposmótico e a deformabilidade de hemácias humanas submetidas a radiação ionizante.
- c. Avaliar modificações introduzidas em proteínas de membrana de hemácias humanas, submetidas a diferentes doses de radiação ionizante, avaliando os tipos de radicais livres promotores de eventuais modificações, pelo uso de captadores específicos.
- d. Avaliar modificações nas propriedades antigênicas em proteínas de membranas de hemácias irradiadas, tanto em sua forma íntegra ou dissociada.
- e. Identificar e quantificar alterações antigênicas em hemácias irradiadas, por métodos de hemaglutinação, imunofluorescência e citometria de fluxo.

## **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 - Materiais**

#### **3.1.1 - Fontes de irradiação**

Foram utilizados dois tipos de fontes de irradiação, com determinação prévia da sua capacidade de exposição e eventuais interferências do meio, com o apoio da Profa.Dra. Barbara Ryzki(IPEN/CNEN-SP). Utilizou-se a fonte de irradiação uniforme GammaCell 220(Atomic Energy of Canada) com uma taxa de dose de 380 Gy/hora, e a fonte panorâmica(Yoshizawa Kiko Co.Ltd.), com taxa de dose 280 Gy/hora, sob rotação constante.

#### **3.1.2 - Sangue**

O sangue humano utilizado para preparação das hemácias, foi obtido de duas formas: Sangue fresco de dois doadores voluntários, saudáveis, cooperantes durante o todo o período; e sangue estocado de bolsas de sangue A+ em solução conservante CPDA-1(Knight *et al*, 1993), fornecidas pela Fundação HemoCentro de São Paulo, com pelo menos 02 semanas de estocagem, testado para ausência dos patógenos habituais transmitidos pelo sangue.

#### **3.1.3 - Animais**

Todos os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, mantidos e manipulados de acordo com as normas preconizadas para pesquisa(NIH), sendo sempre utilizado o número mínimo recomendado pela variação provável do experimento, calculada pelo programa Epi-Info 4.0 (Centers of Disease Control, Atlanta, GA, USA).

#### **3.1.4 - Reagentes**

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade pró-análise, obtidos de fontes comerciais idôneas, sendo as soluções preparadas com água estéril de alta qualidade, obtida em sistema Milli Q(Millipore). Quando necessário, a procedência de um determinado reagente será explicitada no texto.



### **3.1.5 – Meios de cultura de célula**

Os meios de cultura, de congelamento, reagentes de dissociação, fatores de crescimento e antibióticos utilizados na manutenção de mielomas, fusão, manutenção de hibridomas e armazenamento de células a  $-190^{\circ}\text{C}$ , foram fornecidos por SIGMA(St.Louis, USA) e estocados de acordo com as especificações do fabricante.

## **3.2 – Métodos**

### **3.2.1 - Purificação e irradiação de hemácias humanas.**

Hemácias humanas A+ mantidas em solução conservante CPDA-1 e a  $4^{\circ}\text{C}$  foram lavadas em 10 volumes de salina tamponada com fosfato (PBS= NaCl 0,15 M tampão fosfato de Na 0,02 pH 7,2) estéril, por centrifugação a 1000 g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante e a camada superior do precipitado, de cor mais clara e com maior conteúdo de leucócitos(creme leucocitário). O processo foi repetido até que o esfregaço corado pela solução de Giemsa mostrasse a ausência de elementos nucleados. Hemácias assim purificadas foram diluídas em PBS formando uma suspensão a 10% concentrada. Alíquotas de 1ml dessa suspensão foram acondicionadas em tubos plásticos estéreis e expostas à radiação gama em fonte de  $^{60}\text{Co}$ . Quando irradiadas em fonte panorâmica, as amostras, mantidas em refrigeração, foram posicionadas em dispositivo giratório, "Speed controller"-modelo 4555-3 Cole-Parmer Chicago Illinois a uma velocidade de 8 RPM, para manter a uniformidade da radiação. A atividade da fonte era de 2371, 046 MBq. a taxa de dose era de 0.315 KGy/h a 25 cm da fonte. A exposição foi efetivada sem barreira, com doses de 10, 15, 25, 40, 100, 400, 800 e 1600Gy.

As irradiações de hemácias, também foram processadas em irradiador tipo Gamma Cell (Atomic Energy of Canadá), com doses de 400, 800, e 1600 Gy. Adequações de geometria e tempo de exposição foram feitas para atender as características técnicas de construção e atividade de cada equipamento. Nenhuma distorção dos resultados foi registrada, para as mesmas doses, pelos nossos sistemas de aferição, quando se utilizou um ou outro irradiador.

### 3.2.2 - Estudos citométricos

Os estudos citométricos de hemácias foram feitos em sangue total ou hemácias livres de plasma e suspensas em PBS. Para isto, o sangue estocado teve suas hemácias purificadas por centrifugação a 1000g por 10 minutos, livres da camada superior das hemácias, do creme leucocitário e do plasma, sendo suspensas em salina tamponada com fostato de sódio(PBS) e recentrifugadas. A partir desta suspensão de hemácias lavadas ou de sangue total irradiado, as hemácias foram analisados em um sistema automático Technicon H3-RTX(Miles, USA), por análise de aproximadamente 50000 células isoladas, com determinação do volume por impedância e da hemoglobina por microcolorimetria. O sistema fornece os seguintes parâmetros analisados:

- a. Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dl)
- b. Hemoglobina total por célula ( em pg)
- c. Volume celular(em femtolitros)
- d. Distribuição relativa das células em relação ao seu volume e sua concentração de hemoglobina
- e. Porcentagem de células hipocrômicas(HB< 20 pg/célula)

### 3.2.3 - Estudos de hemólise isosmótica e de resistência globular ao choque osmótico

A fragilidade osmótica das hemácias foi feita através de uma técnica simplificada da reação usualmente feita em tubos(Wu,S.G.1998). Assim, em uma microplaca de 96 poços contendo, em cada poço, 10  $\mu$ l de uma suspensão de 20% de hemácias em PBS, foram distribuídos 200 $\mu$ l de soluções proporcionalmente decrescentes de PBS(1 – 0,05), . Após agitação e incubação por 30 minutos, para sedimentação das hemácias íntegras, 100  $\mu$ l do sobrenadante era retirado e colocado em placa idêntica com fundo óptico. A densidade óptica a 540 nm foi determinada em um leitor de microplacas. A D.O.540 nm do poço com 1x PBS e a do poço com 0,05x PBS foram considerados respectivamente 0 e 100% de hemólise. A curva de sensibilidade foi determinada por análise de modelos não lineares sigmoidal com comparação de curvas em pacote estatístico GrapPad Prism versão 2.0, obtendo-se a proporção

média de PBS que determinava hemólise 50%, com respectivo intervalo de confiança de 95% de sua medida.

### **3.2.4 - Estudos da deformabilidade celular ao estresse rotacional.**

O índice de alongação de hemácias não irradiadas e irradiadas em diferentes doses foi avaliado sob diferentes pressões rotacionais ou estresses de cisalhamento ("shear stress") em ektacitômetro –Laser Assited Optical Rotational Cell Analyzer ( Lorca) versão 1.0. As amostras foram preparadas em solução de PBS pH 7.4 com osmolaridade de 300 m osm/kg. A solução continha NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 18.4 mM NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.3 mM. e 300g de polyvinylpyrrolidone(PVP) diluídas em 6 litros de PBS e mantidas em refrigeração em alíquotas de 5ml até o momento do uso. A viscosidade e temperatura da solução foram de 37<sup>0</sup> C e 31± 2 mPa\*s, respectivamente. Amostras de 2 µl de sangue não irradiado, irradiado em diferentes doses, fresco ou estocado foram avaliadas quanto aos seus índices de alongação em diferentes níveis de "shear stress". Foram considerados dois níveis de estresses, um considerado baixo de 0,3 Pa e outro mais elevado de 3,0 Pa, respectivamente 10 e 100x o stress específico de repouso. A deformabilidade da hemácia foi expressa em seu índice de alongação nos dois níveis acima especificados, com respectivo intervalo de confiança de 95%.

### **3.2.5 - Purificação de "ghosts"**

O isolamento de frações contendo membranas de hemácias ou "ghosts" foi realizado através de hemólise hipotônica das hemácias lavadas seguida de centrifugação diferencial a 4<sup>0</sup> C, de acordo com o descrito por Dodge et.al.(1963). Uma suspensão de hemácias a 50%, previamente lavada em PBS e livre de células nucleadas foi diluída em 20 vol de água estéril. Após agitação, a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos para a retirada de células íntegras e de restos celulares maiores. O sobrenadante foi recentrifugado a 15000g por 30 minutos, sendo desprezado o líquido superior e mantido o precipitado frouxo esbranquiçado. Estes "ghosts" foram suspensos em PBS durante 12 horas a 4<sup>0</sup> C, para resselagem e novamente submetidos ao processo de choque osmótico. Todo o processo de centrifugações foi repetido, até que o precipitado de *ghost* apresentasse o mínimo de hemoglobina, exibindo cor branca

amarelada. O precipitado foi então diluído em PBS e sua proteína determinada pelo método descrito por Bradford(1976). As amostras foram alíquotadas e estocadas a-70° C até o momento de uso. Em algumas preparações, foram adicionados inibidores de proteases(fenilmetilsulfonilfluoreto 0,1 mM e benzamidina 1 mM) em todas as soluções utilizadas.

### 3.2.6 – Irradiação de “ghosts”

Proteínas de *ghost* de hemácias, isoladas como acima descrito, foram acondicionadas em tubos plásticos estéreis, em alíquotas de 1 ml, nas mesmas condições experimentais descritas para as hemácias. Inicialmente, as proteínas foram irradiadas no irradiador Gamma Cell nas doses de 400, 800 e 1600 Gy, na taxa de dose descrita, mas com sua saída de operação para recarga, as demais amostras foram irradiadas no irradiador panorâmico, na mesma condição descrita acima para as hemácias integras.

### 3.2.7 – Irradiação na presença de captorees específicos (scavengers) para classes de radicais livres induzidos pela radiação.

Proteínas de *ghosts* de hemácias, após estocagem, foram suspensas antes da irradiação, em soluções contendo diversos captorees específicos para classes de radicais livres induzidos pela radiação, para determinação de classe de radicais envolvidos no efeito encontrado. Para tanto, foram utilizados os seguintes captorees, isolados ou em associação, sempre na concentração de 10 mM final:

<b>Captor</b>	<b>Tipo de radical</b>
<b>Butanol(ref)</b>	<b>Hidroxila ( OH<sup>•</sup> )</b>
<b>Nitrato de sódio(ref)</b>	<b>Electron aquoso ( e<sup>-</sup> )</b>
<b>Ac.ascórbico(ref)</b>	<b>Ambos</b>

Após a suspensão, as frações foram irradiadas na presença de captorees, a uma dose padronizada de 800 Gy, na fonte panorâmica nas condições acima descritas. Para cada fração testada, o controle não irradiado foi mantido em iguais condições ambientais.

### 3.2.8 - Análise de Proteínas(SDS-PAGE)

A análise de peso molecular das proteínas de *ghost* não irradiada e irradiadas com diferentes doses de radiação foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli(1970). O sistema descontínuo utilizado apresentou na parte de resolução uma concentração de 7,5% de poliacrilamida, sendo que, na área de empilhamento, a concentração utilizada era de 4%, sendo mantida constante a relação entre polímero e agentes de ligação. A amostra proteica continha 20 $\mu$ g de proteína total em 15  $\mu$ l a 20 $\mu$ l de tampão de amostra contendo 4 M de uréia, para solubilizar mais eficientemente proteínas de membranas, e 5% de  $\beta$ -mercapto-etanol, para ruptura de eventuais pontes dissulfídricas. As amostras, previamente aquecidas por 5 minutos a 100°C, foram aplicadas e a eletroforese feita em tensão da fonte constante de 150 V, em sistema Bio-Rad Mini Protean II. Após a chegada da frente de solvente ao fim do gel, a corrida era interrompida e as proteínas separadas fixadas e identificadas por dois tipo diferentes de coloração. Inicialmente, o gel fixado era corado com Coomassie Brilliant Blue G 250, evidenciando as bandas proteicas em azul(Wilson,1983). Caso a definição das bandas fosse insuficiente ou a marcação de bandas minoritárias pouco visível, o gel era corado pela precipitação de prata coloidal (Merril 1984). Após a coloração, o gel foi fotografado em sistema digital(UltraLum UV-Vis Transilluminator, Carso, CA, USA), sendo após isso processada sua secagem entre duas folhas de celofane especial, após prévia exposição em solução de 10% de metanol e 1% de glicerol em água, mantido em estufa a 37°C. Padrões adequados de alto peso molecular foram utilizados em poços demarcados. Após a secagem do gel, imagens digitalizadas foram obtidas em mapeador computadorizado ou digitalizador de imagem, sendo reproduzidas em papel.

### **3.2.9 - Produção de anticorpos**

As propriedades antigênicas de proteínas de *ghost* modificadas por radiação ionizante foram avaliadas através da produção de anticorpos policlonais em coelhos e camundongos, além da tentativa de produção de anticorpos monoclonais específicos.

#### **3.2.9.1 - Policlonais**

Coelhos jovens, Albinos New Zeland foram imunizados com proteínas de *ghost* expostas à radiação, de acordo com o protocolo descrito a seguir. Na primeira sensibilização, 0,5 mg do antígeno foi suspenso em 1ml de PBS e emulsificado com 1ml de adjuvante completo de Freund. Após sonicação, 1,5 ml do antígeno (333 $\mu$ g) foi inoculado em três diferentes pontos do dorso do animal. Seguiram-se mais duas injeções semelhantes em intervalos regulares de 15 dias, exceto que o adjuvante utilizado era o incompleto de Freund e a partir da Quarta não mais se utilizava adjuvante. Dada a título de reforço "Booster", uma nova dose era feita dois dias antes da avaliação da produção de anticorpos.

Camundongos albinos BALB/c machos pesando entre 23 e 28 gramas foram sensibilizados em três ocasiões com antígeno de proteína de *ghost* de hemácias humanas irradiadas. O protocolo de imunizações foi semelhante ao utilizado em coelhos, com uma primeira dose com adjuvante completo de Freund, a segunda com adjuvante incompleto e terceira sem adjuvante, mas com uma menor quantidade de proteína, nunca maior que 50  $\mu$ g/dose. As sensibilizações ocorreram em intervalos regulares de 15 dias. Em todas as ocasiões, 150  $\mu$ l(300  $\mu$ g) do antígeno foi utilizado para cada 2 ml da preparação e 0,2 ml do composto antigênico foi inoculado em cada animal, por via intraperitoneal. Uma quarta sensibilização "Booster" foi efetivada com antígeno diluído em PBS nas mesmas concentrações já descritas, com inoculação intraperitoneal.

### 3.2.9.2 - Monoclonais

Anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície de hemácias irradiadas foram procurados. Neste sentido, células de mieloma de camundongo(P3X63AgU.1) foram cultivadas em meio DMEM com 4,5% de glicose e suplementado 10% de soro fetal, 8 azaguanina, L-glutamina e gentamicina. Após intensa proliferação celular armazenamos em nitrogênio líquido 8 tubos plásticos de 1ml contendo  $4 \times 10^5$  células em cada tubo.

Células de baço de camundongos BALB/c sensibilizados contra proteínas de *ghost* foram obtidas em condições estéreis. Após lise dos eritrócitos com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , essas células foram fundidas com células de mieloma na proporção de 10 células de baço para uma de mieloma e na presença de Polietileno Glicol – PEG. As células fundidas foram depositadas em placas de cultura de 96 poços, com

100  $\mu$ l da suspensão de cultura de hibridoma por poço, contendo OPI-HT. Após a fusão, as células foram incubadas em estufa a 37<sup>o</sup> C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

Decorridas 24 horas, foi adicionado 100  $\mu$ l do meio seletivo OPI-H<sub>2</sub>T e as culturas foram novamente incubadas nas condições descritas.

A seleção dos hibridomas foi feita sete dias após a fusão. Os hibridomas selecionados foram transferidos para placas de cultura de oito poços e em seguida cultivados em garrafas em meio sintético DMEM com 4,5% de glicose e suplementado com 15% de soro fetal bovino, glutamina, gentamicina 100 x OPI e 100 x HT.

A detecção de anticorpos foi feita por ELISA. Os hibridomas foram colocados em meio de congelamento composto de 5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino, alíquotados em tubos plásticos de 1ml e postos em "freezer" -70<sup>o</sup> C por 12 horas. Em seguida, os hibridomas foram estocados em nitrogênio líquido.

### **3.2.10 - Detecção de especificidade de anticorpos policlonais produzidos contra "ghosts" de hemácias irradiadas**

#### **3.2.10.1 - ELISA**

O ensaio de ELISA foi conduzido de acordo o método proposto por (Kemeny & Challacombe, S.J. 1988) para ensaio de captura, utilizando microplacas de alta ligação a proteínas. Para sensibilização das placas, utilizamos proteínas de ghosts de hemácias irradiadas ou nativas, suspensas em tampão carbonato de sódio 0,05M pH 9,5, na concentração de 10  $\mu$ g/ml de proteína determinada pelo método de Bradford. Esta solução denatura as membranas e expõe as proteínas de maneira uniforme, livres de bicamada lipídica. As placas foram sensibilizadas com 100  $\mu$ l de cada solução por 18 hs a 4<sup>o</sup> C, seguidas de três lavagens com PBS contendo 0,2% de Tween 20 (PBST) por 5 minutos. As placas sensibilizadas tiveram seus sítios de ligação eventualmente livres, bloqueados por incubação com leite desnatado a 5% em PBST por 2 horas imediatamente antes do uso. Todas as demais soluções e lavagens foram feitas em leite desnatado a 1% em PBST, exceto o revelador da atividade enzimática. Soros de camundongos previamente imunizados com ghosts de hemácias normais ou hemácias

irradiadas com 1600 Gy, conforme descrito, foram diluídas a 1/100 e aplicadas aos poços. Após 3 lavagens, anticorpo anti-imunoglobulina de camundongos conjugado a peroxidase, preparado no laboratório e com título de 1/1000, foi adicionado por 1 hora a 37° C aos poços, com controles adequados. A revelação da presença de anticorpos anti-proteínas de *ghost* de hemácias foi feita pela adição de solução de citrato de sódio 0,05 M pH 5,8, contendo o-fenilenodiamina 0,4 mg/ml e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%. A cor dos poços após incubação por 1 hora e interrupção da reação pela adição de 1 volume de ácido sulfúrico 10%, foi determinada espectrofotometricamente a 492 nm em um leitor automático de microplacas.

### 3.2.10.2 - Western blot

Uma abordagem mais específica na identificação de anticorpos anti-proteínas de *ghost* irradiado foi conduzida pela técnica do Western- Blot. Proteínas isoladas por eletroforese como descrito, foram transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose em sistema convencional tipo Trans-Blot SD Semi – Dry Transfer Cell (BIO RAD). Tiras recortadas após pré coloração com Ponceau S foram bloqueadas com leite desnatado a 2% em PBST por 18 hs. Estas tiras foram ensaiadas com diluições de soros de camundongos imunizados com as diferentes preparações. Após lavagem cuidadosa com PBST, anticorpos ligados foram revelados pela incubação com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase produzido no laboratório, por 2 hs a temperatura ambiente e com agitação oscilante contínua. Após lavagem cuidadosa em PBST, o conjugado ligado foi revelado com tampão fostato de sódio contendo Diaminobenzidina (DAB) 1 mg/ml e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%. O protocolo seguiu basicamente os procedimentos propostos por Hudson & Hay, 1985. Após secagem, as tiras reagidas foram digitalizadas eletronicamente em Scanner HP4p e estocadas.

### 3.2.10.3 - Hemaglutinação

Hemácias humanas A+ normais ou irradiadas com 800 Gy foram fixadas em 20 volumes de PBS contendo 4% de formaldeído, assim permanecendo por 18 horas a 4° C, com agitação ocasional. A suspensão foi centrifugada e resuspensa em PBS contendo 1% de formaldeído. A suspensão de uso, contendo



1% de hemácias A+ fixadas e lavadas em PBS, foi preparada no momento do uso. Diluições seriadas do soro teste, além de soro padrão foram preparadas em placas plásticas de fundo em V, com um volume final de 100  $\mu$ l, sendo adicionadas 25  $\mu$ l da suspensão a 1% de hemácias lavadas irradiadas ou não. Após agitação, a placa foi deixada em repouso por uma hora para sedimentação das hemácias. A reação foi considerada positiva nos poços onde a ligação antígeno-anticorpo formou um manto no fundo, sendo a reação negativa caracterizada pela formação de um ponto central, formado pela sedimentação das hemácias, nos poços onde não ocorreu ligação antígeno-anticorpo

#### **3.2.10.4 - Reação de Imunofluorescência Indireta. IFI**

A busca da presença de anticorpos no soro de coelho sensibilizado com proteínas de *ghost* irradiado de hemácias também foi efetivada por imunofluorescência indireta. Nesses ensaios, hemácias humanas A+ normais ou irradiadas com 800 Gy foram colocadas na superfície de lâminas de imunofluorescência e após secagem foram estocadas sob refrigeração a  $-20^{\circ}$  C até o momento do uso. Em seguida, foi adicionado soro de camundongos sensibilizados com *ghost* irradiado de hemácias, em diferentes concentrações, tendo como controles soro de camundongos não sensibilizados de hemácias posteriormente adicionado sobre as hemácias, previamente aderidas à lâmina. Após incubação, as lâminas foram cobertas com conjugado anti-imunoglobulina de coelho ligado a fluoresceína, produzido no Laboratório de Protozoologia do IMTSP ou comercial(Sigma Co. St.Louis, USA). Após lavagem e montagem na presença de Azul de Evans, para coloração de fundo, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência, com filtros adequados a fluoresceína, sendo considerados positivos os poços onde mais de 25% das hemácias apresentavam uma clara fluorescência de membrana.

#### **3.2.10.5 - Citometria de fluxo**

As reações de imunofluorescência permitem a visualização das ligações antígeno anticorpo, entretanto, a mensuração do fenômeno observado é um critério pessoal do observador, sendo, portanto, um ensaio semiquantitativo, de difícil interpretação matemática. Portanto, para obtermos uma confirmação quantitativa confiável do fenômeno já identificado com soro de coelhos,

procedemos uma avaliação da presença de anticorpos anti-ghost irradiado em camundongos BALB/c direcionados contra proteínas de superfície de hemácias humanas irradiadas, utilizando a citometria de fluxo. As hemácias humanas utilizadas foram irradiadas com doses de 25 e 100 Gy com respectivos controles de hemácias não irradiadas. O soro utilizado foi de animais sensibilizados com *ghosts* irradiados conforme descrito anteriormente, utilizado em diluições progressivas (25, 100 e 200 vezes). Soro total de animal não sensibilizado foi utilizado como controle. A ligação do anticorpos sobre a superfície de hemácias foi revelada pela incubação com anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com fluoresceína. Todas as reações foram conduzidas em suspensão de hemácias, sendo procedida a lavagem por centrifugação em microcentrífuga.

Em cada fase, pelo menos 5 lavagens foram efetuadas entre cada reação e entre a leitura final. Os experimentos foram conduzidos em citômetro Becton Dickson Lysys II versão 2.0, em canais de fluoresceína. No primeiro bloco de experimento, soro total não irradiado foi confrontado com hemácias não irradiadas, irradiadas com 25Gy e com 100Gy. No segundo bloco, soro irradiado diluído 25 vezes foi confrontado com hemácias não irradiadas, irradiadas com 25 Gy e com 100 Gy. No terceiro e quarto blocos o soro foi diluído 100 e 200 vezes respectivamente e confrontados com hemácias não irradiadas, irradiadas com 25Gy e 100Gy. A fluorescência de cada célula foi mensurada, considerando 10.000 células por reação. Parâmetros estatísticos, tais como média, mediana e desvio-padrão foram fornecidos, bem como o histograma de cada reação. Para verificação da especificidade da reação, soro positivo foi previamente absorvido com vasto excesso de suspensão de hemácias irradiadas ou não antes do experimento final.

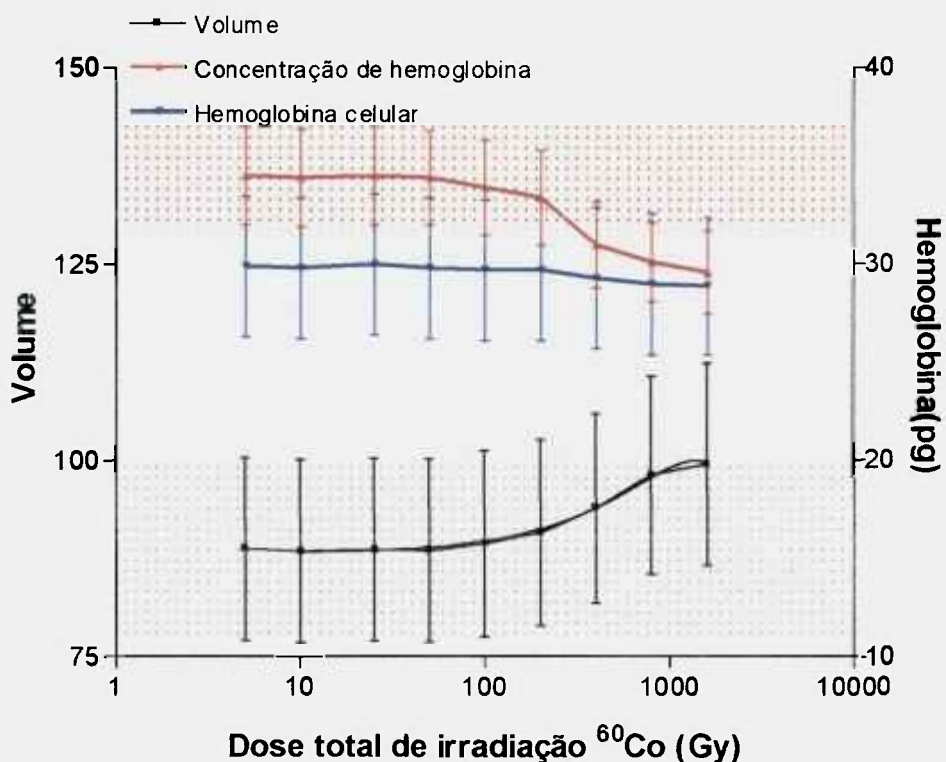
## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – Irradiação de hemácias

Em nossos ensaios, um dos principais achados, mas de difícil demonstração, foi a radioresistência das hemácias, quando mantidas em ambiente isosmótico. Assim, não houve alterações morfológicas significativas das hemácias humanas, estocadas ou frescas, quando submetidas à irradiação de até 1600 Gy, observadas à microscopia de fase ou coradas por Giemsa. Como este processo apresentava baixa capacidade de resolução e para a determinação de alterações mais sutis, utilizamos abordagens mais sofisticadas que demonstraremos a seguir.

### 4.2 - Estudos citométricos

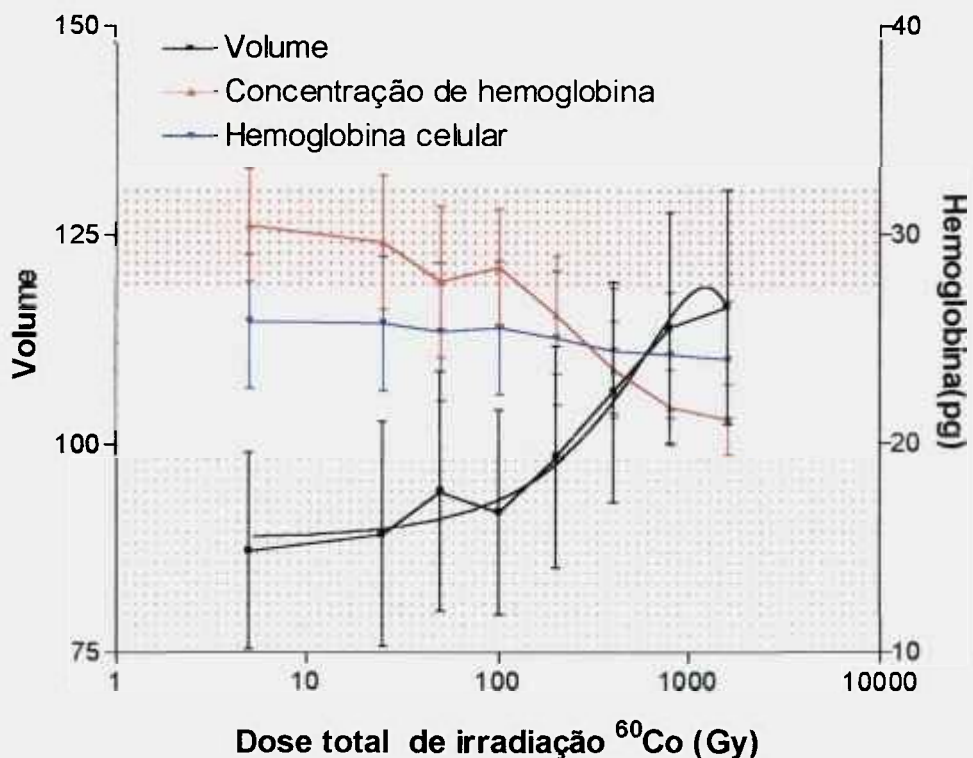
Para estes estudos, analisamos inicialmente hemácias frescas submetidas a radiação por  $^{60}\text{Co}$  em citometro automático, conforme descrito em métodos, sendo seus valores mostrados na Figura 1.



**Figura 1.** Valores de citometria celular de hemácias frescas irradiadas com diferentes doses de  $^{60}\text{Co}$ . Faixas representam a dispersão dos valores obtidos de hemácias não irradiadas mantidas em mesmas condições, para volume e concentração celular de hemoglobina. As barras representam o desvio padrão de cada medida, para 50000 células. A linha estimada da regressão não linear do volume pela dose de radiação também é mostrada como linha contínua

O sangue recém-coletado e submetido a radiação ionizante apresentou crescente hipocromia, em função do incremento da dose de radiação. Um aumento de volume das hemácias, ou macrocitose, foi observado, de forma proporcional ao aumento da hipocromia. Estes fenômenos tornaram-se evidentes somente para doses iguais ou superiores a 800Gy. Lise celular não foi observada durante o experimento. O incremento do volume obedeceu a um modelo polinomial de segunda ordem(  $y= 88,19 + 0,0174*X - 6.116 \times 10^{-6} * X^2$ ) com  $r^2 = 0,9942$  e  $p < 0,0001$ , o que estabelece uma relação direta entre o aumento do volume a dose de radiação aplicada.

Os dados citométricos de hemácias estocadas por pelo menos 2 semanas em CPD-1 são mostrados na Figura 2.

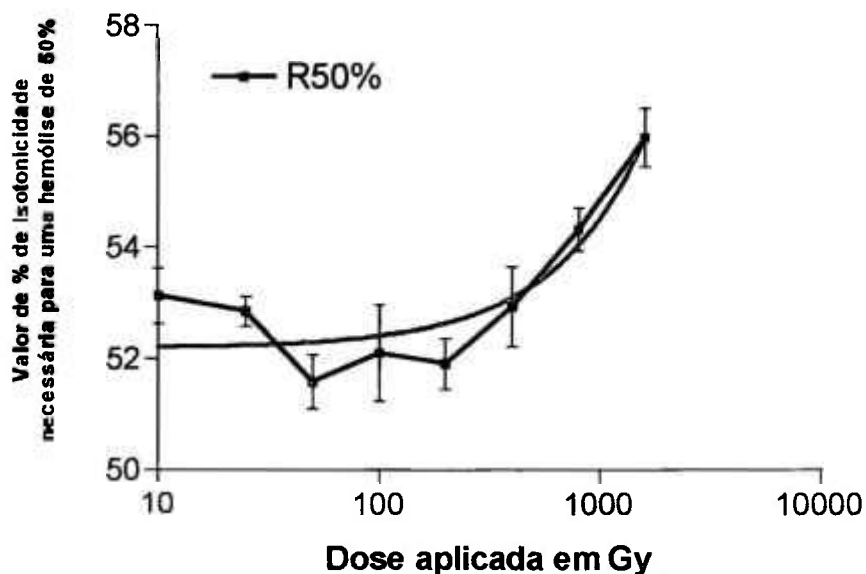


**Figura 2.** Valores de citometria celular de hemácias estocadas em CPD-1 por pelo menos 2 semanas e irradiadas com diferentes doses de  $^{60}\text{Co}$ . Faixas representam a dispersão dos valores obtidos de hemácias não irradiadas mantidas em mesmas condições, para volume e concentração celular de hemoglobina. As barras representam o desvio padrão de cada medida, para 50000 células. A linha estimada da regressão não linear do volume pela dose de radiação também é mostrada como linha contínua

Como pode ser observado na Figura 2, o comportamento do sangue estocado foi semelhante porém de maior amplitude que o observado com hemácias frescas. Assim, a armazenagem do sangue favoreceu a intensificação dos fenômenos de macrocitose e hipocromia, sem no entanto promover a lise celular. O aumento do volume celular obedeceu um modelo polinomial de segunda ordem, de maneira equivalente, obedecendo a equação  $Y = 88,72 + 0,04855 \cdot X - 1,96 \times 10^{-5} \cdot X^2$ , com  $r^2$  de 0,9798 e  $p < 0,001$ . Nota-se um aumento das constantes dependentes da radiação, para valores cerca de 3 vezes maior, mostrando a maior sensibilidade das hemácias armazenadas ao efeito da radiação ionizante. Em sangue armazenado, o efeito de incremento de volume só é claramente identificado em dose acima de 400Gy. Um dado não mostrado foi o incremento da concentração iônica de potássio no meio extracelular, proporcional à dose de radiação aplicada.

### 4.3 - Fragilidade osmótica

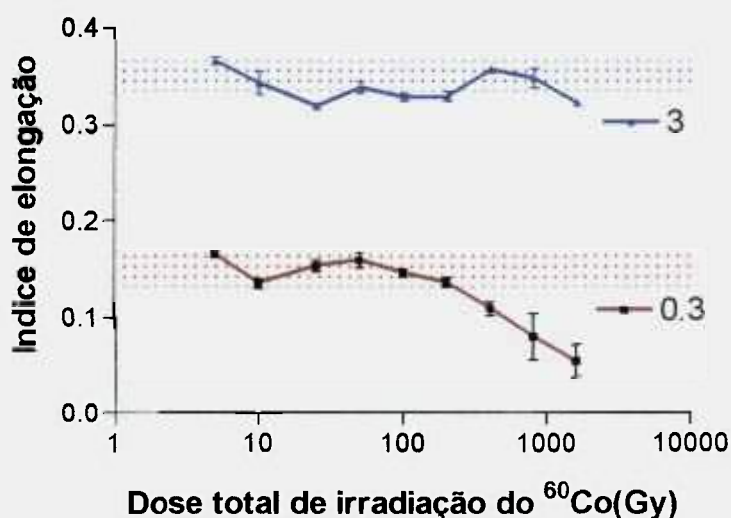
Diante da aparente ausência de hemólise isosmótica induzida pela radiação, estudamos a resistência a choque osmótico das hemácias armazenadas, através de micrométodo descrito em Métodos. Os dados estimados da proporção de PBS que promovia 50% de hemólise em hemácias armazenadas e submetidas a diferentes doses de radiação pode ser vista na Figura 3.



**Figura 3:** Fragilidade osmótica de hemácias armazenadas submetidas a diferentes doses de radiação ionizante do  $^{60}\text{Co}$ . As barras representam o intervalo de confiança da medida da concentração de PBS onde ocorre 50% de lise. A linha vermelha é a correlação exponencial obtida.

Como pode ser observado, a fragilidade osmótica aumentou proporcionalmente a dose aplicada, significativa somente em doses acima de 800 Gy. O modelo de análise não linear mostrou uma correlação exponencial entre a dose de radiação e a fragilidade osmótica, seguindo a equação  $Y = 52,15^{0,0004407 \cdot X}$ , com  $r^2$  de 0,8302 e  $p=0,011$

Os eventos acima mostraram que haviam alterações significativas nas hemácias irradiadas, não evidenciáveis em hemólise isoosmótica. No sentido de verificar o comportamento destas hemácias em condições hemodinâmicas, procedemos a análise de seu comportamento em stress rotacional, conforme descrito em métodos. Diante da complexidade dos resultados, que envolvem curvas de índices de alongação em diferentes condições de stress rotacional, aliadas ao grau variado de exposição à radiação, tornaria a análise muito complexa pelo que optamos pela apresentação dos índices de alongação em dois níveis de stress, um apenas 10 vezes o stress estático e outro de 100 vezes o stress estático, que pode ser visto na Figura 4.



**Figura 4.** Análise da deformabilidade de hemácias armazenadas submetidas a diferentes doses de radiação ionizante de  $^{60}\text{Co}$ . Os níveis de deformabilidade são expressos em índice de alongação, basicamente uma relação de raios menor e menor de cada hemácia analisada. As barras representam o desvio padrão de medida de pelo menos 50 hemácias em cada nível de stress. As áreas pontilhadas representam a faixa de intervalo de confiança encontrada em hemácias não irradiadas.

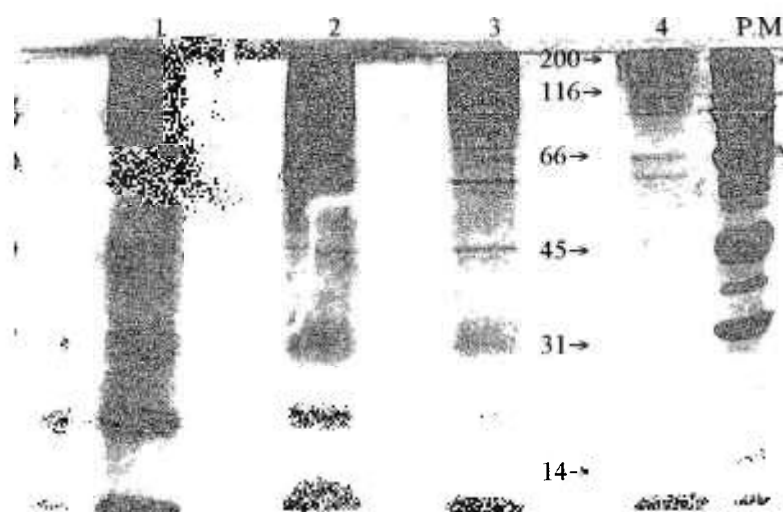
Como pode ser claramente observado, as hemácias irradiadas apresentam o mesmo tipo de deformabilidade que as hemácias normais em níveis elevados



de stress (3 Pa). No entanto, a irradiação acima de 400 Gy promove uma diminuição proporcional nesta deformabilidade em níveis mais baixos de stress (0,3 Pa), com um modelo exponencial seguindo a equação  $Y = 0,1540 - 0,0007326^X$ , com  $r^2$  de 0,9401 e  $p < 0,05$ . Isto implica em uma menor flexibilidade do citoesqueleto ou da membrana da hemácia irradiada com doses superiores a 400 Gy, embora sem afetar sua resistência a stress superiores.

#### 4.4 - Purificação e irradiação de ghosts.

Para analisar os efeitos da radiação ionizante sobre o citoesqueleto e a membrana da hemácia, procedemos a purificação de membranas isoladas de hemácias armazenadas, para posterior irradiação. O processo foi feito como descrito em Métodos e tendo em vista os resultados anteriores, procedemos a irradiação com doses de 400, 800 e 1600 Gy, isoladamente de forma a amplificar o efeito e permitir sua identificação mais clara. Para tanto, utilizamos inicialmente a mera irradiação dos preparados em solução aquosa, na presença de oxigênio e procedemos a separação das proteínas em gel descontínuo de poliacrilamida na presença de SDS, cuja cópia digitalizada pode ser vista na Figura 5.



**Figura 5:** Perfil eletroforético de proteínas de ghosts de hemácias armazenadas submetidos a diferentes doses de radiação ionizante do  $^{60}\text{Co}$ . 1- Ghosts não irradiados. 2- Ghosts irradiados com 400 Gy. 3- Ghosts irradiados com 800 Gy. 4- Ghosts irradiados com 1600 Gy. Os numeros entre as faixas 3 e 4 mostrams os valores de PM de proteínas padrões alocadas na faixa 5.

Como podemos observar, houve um decréscimo na intensidade das proteínas de menor peso molecular, dependente da dose de radiação empregada,

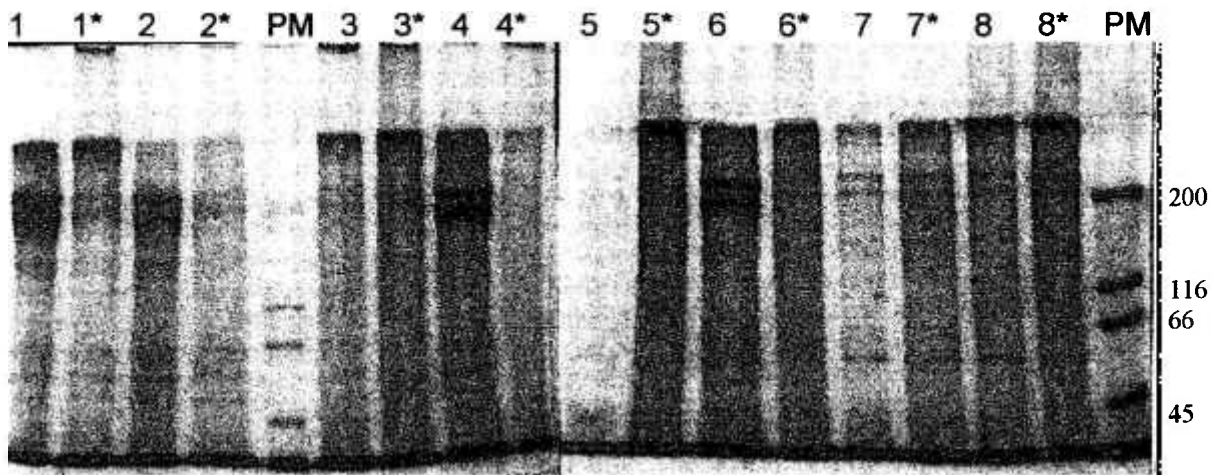
além do aparecimento de uma faixa de agregados, de difícil visualização na parte superior do gel. O fato também ocorreu com as bandas de espectrina, na parte superior do gel

A faixa de banda 3 mostrou um decréscimo significativo também, mas havia problemas de proteólise parcial no gel, sendo visível a diminuição de um de seus produtos específicos ao nível de 65 kDa. Não houve degradação não específica de proteínas em peptídeos pequenos, pelo não aumento de rastro na parte inferior do gel. Estes fatos sugerem que a irradiação de *ghosts* promoveu, numa forma dose dependente, a agregação de proteínas em produtos de alto peso molecular.

Influência de captores de radicais livres sobre os efeitos da radiação ionizante em proteínas de *ghosts* de hemácias irradiados.

Para identificar qual o radical livre induzido pela radiação envolvido na agregação de proteínas, procedemos a eletroforese das proteínas na presença de captores de radicais livres em gel de acrilamida na concentração de 7,5%, visando identificar as proteínas de maior peso molecular. Na faixa 1, pudemos comprovar os efeitos da radiação anteriormente demonstrado, com realce para a diminuição da intensidade das bandas de espectrina. Na análise do perfil eletroforético na presença de vasto excesso de captores, ficou demonstrado que a presença do captor butanol foi capaz de prevenir a formação de agregados, ao contrário do captor nitrato, sugerindo o envolvimento do radical  $\text{OH}^\bullet$  na formação dos agregados. O captor ascórbico também inibiu eficientemente esta formação, com manutenção das bandas de espectrina, sugerindo que apenas o  $\text{e}^-$  não estava influenciando nesta reação.





**Figura 6:** Composição eletrônica da eletroforese de proteínas irradiadas e não irradiadas em presença de captadores de radicais livres. O asterisco representa a amostra irradiada. Amostra 1: controle. Amostra 2: +Butanol. Amostra 3: + Nitrato. Amostra 4: +Ascorbato. Amostra 5: +Butanol e Ascorbato. Amostra 6: Butanol e Nitrato. Amostra 7 + Ascorbato e Nitrato. Amostra 8: Associação de todos.

#### 4.5 - Produção de anticorpos anti-ghosts de hemácias irradiados

Os achados anteriores mostraram alterações nas proteínas do ghost de hemácias após irradiação e para a identificação desta alterações, optamos pela utilização de sondas imunológicas, ou seja, anticorpos específicos, visando uma análise mais fina desta modificações.

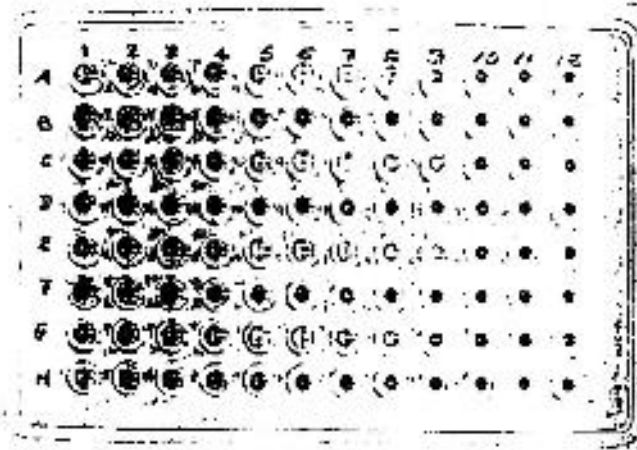
##### 4.5.1 - Imunização de coelhos e camundongos

Coelhos e camundongos foram imunizados com *ghosts* de hemácias irradiados, como descrito em Métodos, visando a produção de anticorpos mais específicos, evitando-se a produção de anticorpos contra elementos citoplasmáticos, principalmente hemoglobina, majoritários em preparações de hemácias íntegras.

##### 4.5.2 - Detecção de anticorpos por hemaglutinação de hemácias irradiadas

Após a produção dos anticorpos, sua detecção era fundamental e foram utilizadas diversas abordagens para este fim. A primeira delas consistiu na reação de hemaglutinação de hemácias irradiadas ou não conforme descrito em

Métodos. Neste ensaio, utilizamos sangue de coelhos imunizados e o resultado pode ser visto na Figura 7.



**Figura 7.** Composição eletrônica de microplaca da reação de hemaglutinação onde se observa resposta positiva entre soro imune de coelho e a superfície de hemácias humanas irradiadas ou não. Linha A: Hemácias irradiadas com 1600 Gy. Linha C Hemácias irradiadas com 800 Gy. Linha E – Hemácias irradiadas com 400 Gy. Linha G Hemácias irradiadas com 200 Gy. Linhas B,D,F e H. Hemácias humanas não irradiadas. Soro de coelho foi diluído em base 2 até coluna 11. Coluna 12 PBS.

Como pode ser observado, o soro do coelho imunizado foi capaz de aglutinar preferencialmente as hemácias irradiadas, com um título máximo de 128 em hemácias irradiadas com 1600 e 800 Gy, caindo para 64 em hemácias com dose menores de radiação. Para hemácias normais, o título encontrado foi de 8, mostrando inespecificidade da reação.

#### **4.5.3 - Detecção de anticorpos anti-ghosts de hemácias irradiadas por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Como os coelho tiveram baixa resposta na produção de anticorpos específicos, apesar de múltiplas imunizações, com inespecificidade da reação, optamos pela produção de anticorpos em camundongos, com detecção imunoenzimática dos anticorpos, tendo em vista o pequeno volume de soro obtido dos animais. A imunização foi feita como descrito em Métodos, assim como a reação imunoenzimática. Os resultados obtidos em um camundongo típico podem ser vistos no Quadro 1.

Nela pode ser constatado que os camundongos foram eficientes na produção de anticorpos contra *ghosts* de hemácias, principalmente os imunizados

com *ghosts* de hemácias irradiadas, que produziram anticorpos em maior quantidade que os imunizados com *ghosts* não irradiados. Entretanto, a sensibilização da placa com *ghosts* irradiados produziu uma menor quantidade de epitopos expostos, identificáveis na reação. Não houve possibilidade de identificação de maior quantidade de anticorpos específicos.

**Quadro 1.** Ensaio imunoenzimático típico de um soro de camundongos imunizados com *ghosts* de hemácias irradiados ou não, diluídos 100 vezes. Os valores de anticorpos são expresso em DO final da reação.

		Extrato de <i>ghosts</i> utilizados para sensibilizar a placa	
		Hemácias nativas	Hemácias irradiadas com 1600Gy
Camundongos Imunizados	<i>Ghosts</i> de hemácias nativas	0,617/0,679	0.487/0.307
	<i>Ghosts</i> de hemácias irradiadas com 1600 Gy	1.028/1.036	0,787/0.805
Com	Não imunizados	0,006/0,072	0,030/0,074

#### 4.5.4 Detecção de anticorpos em hemácias íntegras, por imunofluorescência indireta

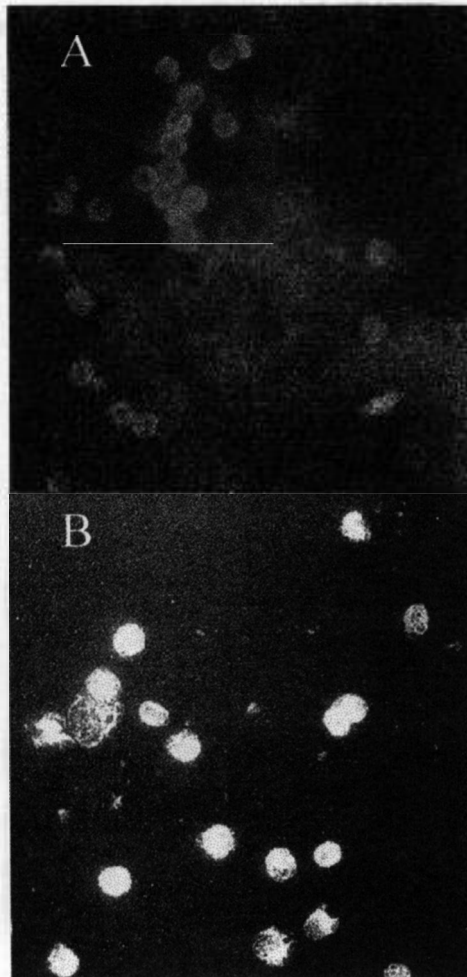
Buscando um maior refinamento e confirmação dos resultados obtidos, confrontamos hemácias íntegras irradiadas e não irradiadas com soro de camundongos imunizados com *ghosts* de hemácias irradiados, por uma técnica de detecção que fosse mais sensível que a hemaglutinação, utilizando a imunofluorescência indireta como descrito em Métodos. A reprografia computadorizada das microfotografias obtidas desta preparação pode ser vista na Figura 8.

Como pode ser observado, havia uma clara fluorescência positiva das hemácias irradiadas com 800 Gy nesta preparação, ao contrário do que ocorria com hemácias não irradiadas, mantidas em igual condição. A reação perdia especificidade se a concentração de anticorpos fosse aumentada pela menor

diluição do soro, mas em diluições de até 1/160, o ensaio foi reprodutivo em várias preparações e várias imunizações de camundongos. Ocasionalmente, hemácias isoladas apresentavam fluorescência menos intensa, sugerindo uma variação da quantidade de epitopos induzidos pela radiação em células isoladas. Ainda assim, o título encontrado em hemácias nativas mostrava apenas uma predominância dos anticorpos produzidos contra epitopos induzidos pela radiação.

imunizados com r

camundongo. Os resulta



**Figura 8:** Reação de Imunofluorescência Indireta entre soro de camundongo imunizado com hemácias irradiadas, na diluição 1/160, em hemácias humanas armazenadas normais ou irradiadas com radiação gama na dose de 800Gy. A- hemácias não irradiadas, B- hemácias irradiadas. X630

camundongo imunizado com gama não irradiado. B- soro de camundongo irradiado com gama e A- soro de

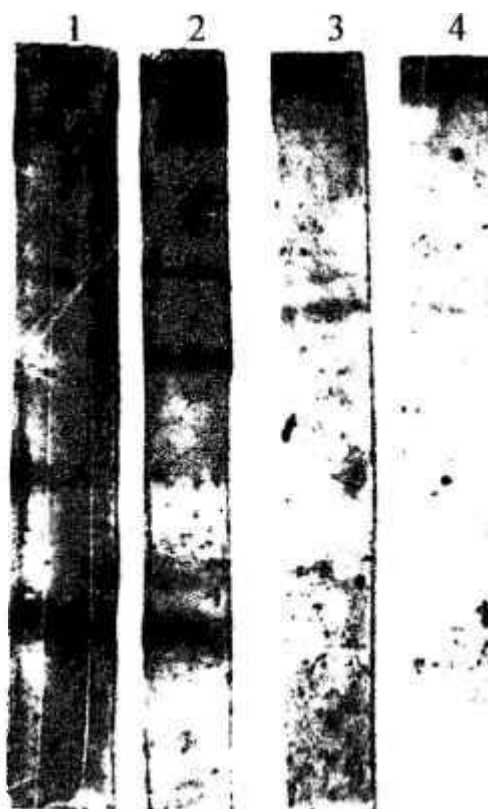
camundongo irradiado com gama

A avaliação dos resultados demonstrou que o soro de camundongo imunizado

com gama, irradiado ou não, reconheceu bandas de proteínas de peso de

#### 4.5.5 - Identificação de anticorpos em proteínas separadas em SDS-PAGE(Western-Blot)

Para aprimorarmos a utilização de anticorpos policlonais, buscamos uma melhor caracterização, identificando antígenos pela técnica de transferência eletroforética (Western-Blot) conforme descrito em Métodos, utilizando proteínas de *ghosts* irradiados e não irradiados, transferidas eletroforicamente para membranas de nitrocelulose, seguida de reação com soros de camundongos imunizados com *ghosts* irradiados e reveladas com conjugado anti-IgG de camundongo. Os resultados podem ser vistos na Figura 9



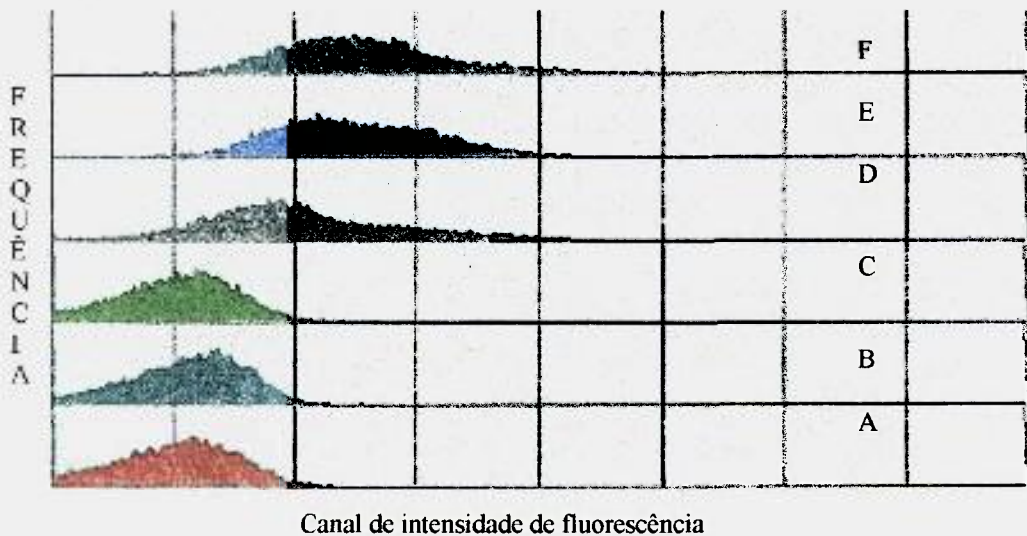
**Figura 9:** Cópia digitalizada de reação de anticorpos de camundongos imunizados com *ghost* de hemácias irradiados contra proteínas de *ghost* de hemácias irradiados transferidas pós-eletroforese. Faixa 1: Soro de camundongo imunizado com *ghost* irradiados, 2- Soro de camundongo imunizado com *ghost* não irradiado. 3. Soro de camundongo controle e 4 Soro de camundongo contra fita não transferida.

A avaliação dos resultados demonstrou que o soro de animais imunizados com *ghost*, irradiado ou não, reconheceu bandas de proteínas de *ghost* de

hemácias irradiadas. Não foi possível identificar bandas específicas produzidas pelo antígeno irradiado, sendo predominante a reação com proteínas de alto peso molecular.

#### 4.6 . Citometria de fluxo

Em face dos bons resultados obtidos com as reações utilizando hemácias integras e a dificuldade de clarificar os ensaios com antígenos solubilizados ou separados, procuramos aprimorar aquelas técnicas pela citometria de fluxo, como descrito em Métodos, considerando o poder de discriminação quantitativa oferecida por esse tipo de ensaio. O conjugado utilizado permitia identificar quantitativamente a presença de anticorpos ligados à superfície das várias preparações, sendo mostrado os histogramas de distribuição de fluorescência na Figura 10,



**Figura 10:** Distribuição da fluorescência específica de 10000 hemácias irradiadas ou não, desafiadas com anticorpo anti-proteínas de superfície de hemácias humanas produzidos em camundongos (SHI). A- Hemácias não irradiadas com soro normal de camundongo (SNC). B- Hemácias irradiadas com 25Gy e SNC. C- Hemácias irradiadas com 100Gy e SNC. D- Hemácias não irradiadas e SHI. E- Hemácias irradiadas com 25Gy e SHI e F- Hemácias irradiadas com 100 Gy e SHI.

A distribuição relativa de hemácias não mostrou diferenças significativas quando ensaiadas com soro normal de camundongo, mantendo um padrão de fluorescência de canais de menor intensidade. Já a distribuição das diferentes hemácias, quando reagidas com soro imune mostrou uma maior frequência nos canais de maior intensidade, sendo que esta distribuição tendeu a ser mais

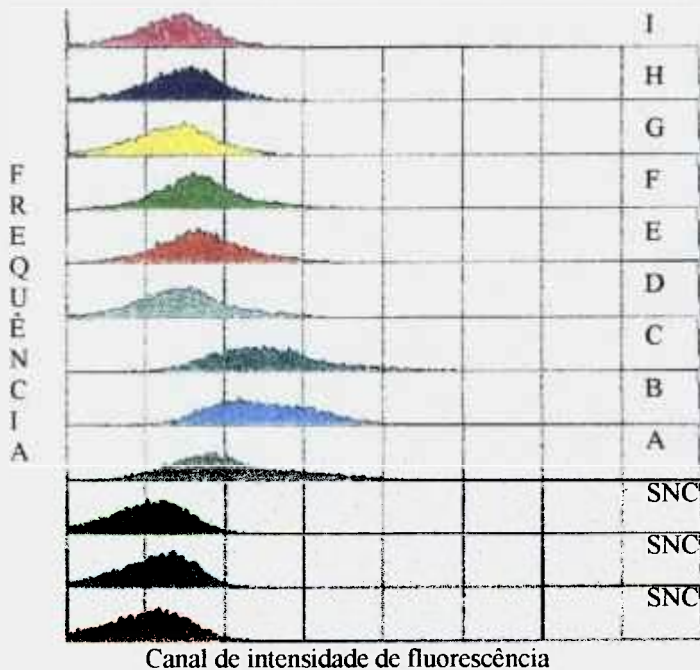
elevada quando se elevaram as doses de irradiação. Os dados quantitativos desta reação podem ser vistos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média dos canais de fluorescência em relação à frequência de hemácias positivas nas várias reações analisadas.

Amostra	Média dos canais de fluorescência $\pm$ Desvio Padrão
A –soro normal X hemácias não irradiadas	127,80 $\pm$ 76,86
B –soro normal X hemácias irradiadas – 25Gy	142,80 $\pm$ 76,48
C.-soro normal X hemácias irradiadas.-.100 Gy	134,65 $\pm$ 80,01
D –soro imune 1/25 X hemácias não irradiadas	266,17 $\pm$ 110,88
E.-soro imune 1/25 X hemácias irradiadas – 25 Gy	320,34 $\pm$ 92,26
F-soro imune 1/25 X hemácias irradiadas – 100 Gy	328,96 $\pm$ 101,69

Para otimizar a relação antígeno anticorpo a reação foi feita com diferentes concentrações de soro, como mostra a Figura 11. Embora tenhamos diluído progressivamente esta sonda, a fluorescência das hemácias irradiadas permaneceu superior à das hemácias controles em todas as diluições. As diluições progressivas levaram a uma redução do sinal de fluorescência, compatível com a redução da oferta de anticorpos.



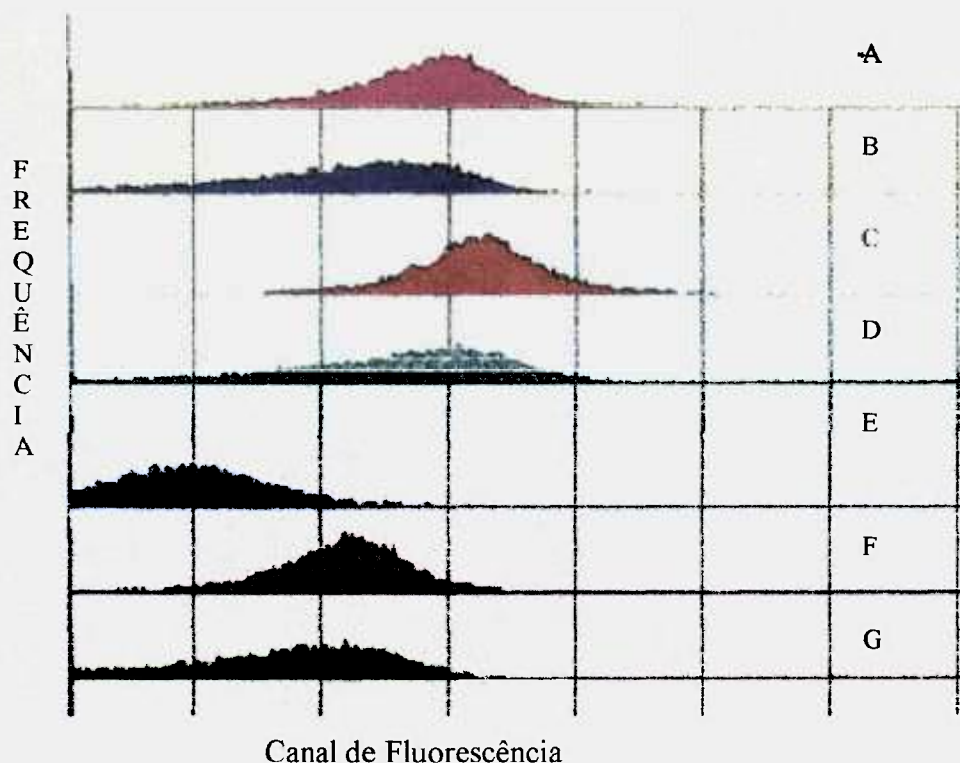


**Figura 11:** Distribuição de fluorescência de 10.000 hemácias para cada evento, desafiadas contra anticorpos anti proteínas de superfície de hemácias irradiadas .A,D,G hemácias não irradiadas B'E H .Hemácias irradiadas com 25 Gy C,F, I Hemácias irradiadas com 100Gy.A,B,C Soro 1:25. D,E,F Soro 1:100. G,H,I Soro 1:200. Os dados destas hemácias com soro normal de camundongo também são mostrados.

#### 4.6.1 - Ensaio de citometria de fluxo com absorção prévia do anticorpo.

Para definir mais seletivamente a presença de epítopos específicos, procedemos a absorção do soro de camundongo imunizado com ghosts de hemácias irradiados com hemácias humanas A+ de mesma procedência, sendo analisado este soro adsorvido contra hemácias com dois níveis de irradiação. Dados quantitativos são mostrados na Tabela 3. Como pode ser observado, a absorção por hemácias normais não afeta a sensibilidade do anticorpo produzido, mostrando a especificidade da reação contra hemácias irradiadas.





**Figura 12:** Distribuição de citometria de fluxo de anticorpos presentes em soro de camundongos imunizados com ghost de hemácias armazenadas irradiados, após absorção com hemácias humanas de mesmo doador.

**Tabela 3.** Efeito da absorção prévia por hemácias humanas normais sobre a fluorescência em citometria de fluxo de soro de camundongo imunizado com ghosts de hemácias irradiados, em diferentes preparações

Tipo de preparação	Média Geométrica $\pm$ Desvio Padrão
A - soro adsorvido X hemácias irradiadas – 800 Gy	351,57 $\pm$ 110,91
B - soro adsorvido X hemácias irradiadas – 100 Gy	252,65 $\pm$ 139,76
C - soro imune X hemácias irradiadas – 800 Gy	417,76 $\pm$ 91,98
D - soro imune X hemácias irradiadas – 100 Gy	307,43 $\pm$ 147,61
E - soro normal X hemácias não irradiadas.	133,72 $\pm$ 104,89
F - soro normal X hemácias irradiadas – 800 Gy	274,61 $\pm$ 106,82
G- soro normal X hemácias irradiadas – 100 Gy	206,65 $\pm$ 129,73

## 5 – DISCUSSÃO

Em nossos estudos, conseguimos demonstrar alterações citométricas de hemácias, induzidas pela irradiação por  $^{60}\text{Co}$ , em um modelo dose dependente, com preservação da integridade celular. As alterações encontradas foram um aumento do volume celular, com manutenção da quantidade de hemoglobina intracelular, principal proteína citoplasmática da hemácia, até em doses elevadas de irradiação, acima de 800 Gy. Existem relatos ocasionais do aumento do volume celular em hemácias irradiadas, citados na literatura disponível, mas nossos dados são certamente mais amplos e abrangentes do que os encontrados na literatura disponível, principalmente se observamos a variação da dose de radiação aplicada. A preservação da hemoglobina celular e o aumento de volume podem ser explicados pela perda da capacidade de manter o balanço salino adequado no interior da hemácia após a irradiação, principalmente sódio e potássio. Nossos dados são semelhantes aos descritos por outros autores, (Kover & Schoffeniels, 1965; Arseniev *et al* 1994), que encontraram uma diminuição do potássio em hemácias irradiadas, associado a um efluxo do potássio intracelular, dependente tanto da dose de radiação como do tempo de estocagem. Outros fatores relevantes para este efluxo parecem ser a temperatura de conservação, com melhora do balanço salino se as hemácias são incubadas a 37° C após a irradiação, e a quantidade de oxigênio dissolvido no sangue, que, se elevada, aumenta o efluxo deste íon (Anderson & Mintz, 1994) Estes dados corroboram nossos achados de potássio extracelular elevado evidente em sangue estocado. O tipo de solução preservante parece interferir neste processo, sendo que a solução por nós utilizada para preservação do sangue, CPDA-1, promove maior liberação de potássio celular que soluções de preservação mais complexas (Jeter *et al*, 1991). Todos estes autores utilizaram menos que 50 Gy de irradiação, ao contrário de nossos níveis mais elevados de radiação. As alterações encontradas nessas doses mais elevadas foram semelhantes as descritas e exacerbadas pela prévia conservação do sangue. Assim acreditamos que o aumento do volume das hemácias irradiadas em doses mais elevadas foi causada por alteração no equilíbrio iônico citoplasmático das hemácias, sem ruptura de sua membrana, pela ausência de liberação de hemoglobina. Estas alterações poderiam estar

relacionadas a modificações em proteínas de transporte de íons, mas a sua recuperação pela incubação a 37° C (Brugnara & Churchill, 1992) ou reposição de ATP e 2,3 DPG (Samuel *et al*, 1997) fala contra este fenômeno. Isto corrobora o uso da radiação ionizante na preservação de sangue ou outras finalidades, já que sistemas que visam a preservação das hemácias por fotoxidação geram novos radicais nesta membrana, identificáveis quimicamente e causando agressão definitiva à fisiologia da membrana (Kochevar, 1990).

Outro dado importante nosso foi a observação da resistência ao choque osmótico praticamente inalterada em hemácias irradiadas até 400 Gy. Este fato mostra que, apesar do aumento do volume da hemácia, esta não se apresenta com maior fragilidade, em nossos experimentos. Somente em doses muito elevadas, esta resistência é alterada. Os dados da literatura são contraditórios quanto a este efeito da radiação havendo autores que relatam ausência de anormalidade da concentração plasmática de hemoglobina e enzimas intracelulares em sangue irradiado (Hillyer *et al*, 1991) enquanto outros referem que ocorre uma hemólise pequena mas significativa após irradiação, principalmente quando um maior tempo de armazenagem é previsto (Davey *et al*, 1992), inclusive com liberação para o plasma de níveis maiores de hemoglobina e potássio, com risco para o receptor. Apesar destes achados, corroborado por outros autores, recomendando que o tempo de armazenamento de hemácias fosse reduzido, em dose de até 30 Gy, a maioria dos autores concorda em um tempo de conservação de até 28 dias, bastante compatível com uma disposição adequada do produto irradiado. (Mintz & Anderson, 1993; Davey, 1995).

As causas da hemólise aumentada em hemácias irradiadas com altas doses de radiação e desafiadas com choque osmótico devem estar relacionadas a alterações da membrana celular. Foi demonstrado que ocorre uma peroxidação de lípidios mesmo em doses relativamente seguras de radiação (Anand *et al*, 1997), que pode resultar em lesões oxidativas em proteínas da membrana da hemácia, exceto glicoproteínas (Sullivan & Stern, 1984), principalmente em células neonatais ou com deficiência de ferro (Katz *et al*, 1996). Estas lesões foram demonstradas mais claramente em "ghosts" isolados de hemácias, mostrando significativamente agregação de espectrina, a membrana do esqueleto celular da hemácia. Aliado a estes estudos, estudos ultraestruturais de hemácias irradiadas mostraram que ocorriam alterações significativas da superfície de hemácias,

decorrentes de alterações conformacionais das proteínas, com diminuição da viscosidade interna(Gwozdziński, 1991).

Em nossos estudos de deformabilidade a estresse rotacional das hemácias irradiadas, foi possível demonstrar uma modificação extremamente interessante desta propriedade, decorrente da radiação, por um elegante sistema de ectacitometria. Assim, hemácias irradiadas com doses acima de 400 Gy apresentavam uma maior resistência a deformabilidade induzida por estresse de menor intensidade, quando comparada a hemácias nativas, embora com igual deformidade em estresse mais elevado. Isto poderia significar uma maior rigidez do citoesqueleto celular, gerando hemácias com maior dificuldade de adaptação ao fluxo capilar, onde menores pressões estão ocorrendo e maiores deformabilidades são exigidas, mas capazes de resistir ao turbilhão cardíaco.

Este fato vem em oposição a trabalhos semelhantes, utilizando hemácias hipóxicas e que encontraram uma maior resistência a deformabilidade em maior estresse, sem alteração significativa em baixo estresse(Kaniewski *et al*, 1994), além de trabalhos em hemácias de pacientes com malária falciparum severa, que apresentam uma resistência a deformação alta em estresse intermediários e elevados(Dondorp *et al*, 1997). Nossos achados mostram que a irradiação promoveu um efeito de estabilizar o citoesqueleto mas sem retirar sua flexibilidade, apenas sendo necessária a aplicação de maiores forças para obter a mesma deformabilidade. As alterações de deformabilidade de hemácias irradiadas tinham sido apenas esporadicamente citadas na literatura(Karle & Hansen, 1971). Este problema só poderia ser avaliado em modelos *in vivo*, verificando a circulação e a sobrevivência das hemácias. Nas doses habituais utilizadas para sangue, de até 50 Gy, existem relatos de que a sobrevivência aguda da hemácia irradiada é semelhante a da hemácia normal(Suda *et al*, 1993), por estudos utilizando  $^{51}\text{Cr}$ , concordante com nossos resultados, mas sem estudos em hemácias submetidas a maiores doses de radiação e que apresentam menor deformabilidade a baixo stress. Este conhecimento é fundamental pois o eventual bloqueio de capilares poderia mostrar efeitos adversos ao uso de doses maiores de radiação sobre as hemácias ou sangue, como demonstrado em agregados químicos de hemácias em mesentério de ratos(Durussel *et al*, 1998).

Para melhor compreendermos o processo com um menor número de proteínas, passamos a estudar o citoesqueleto isolado da hemácia, através da

irradiação de ghosts purificados. Este tipo de abordagem já havia sido estudado por grupos anteriores, mas o nosso objetivo era caracterizar o tipo de alteração encontrada para propormos um tipo de sondagem imunológica que permitisse sua identificação, mas com técnica de menor complexidade e em células individuais. Assim, nossos estudos de irradiação de ghosts de hemácias mostraram degradação de algumas proteínas de superfície da hemácia, através de SDS-PAGE. Entre estas destaca-se a banda 3 ou capnóforina, que apresentou degradação específica em nossos ensaios, por proteólise dependente de proteases contaminantes, livres ou agregadas a membrana eritrocítica (Bartosz *et al*, 1992) ou ainda pela própria radiação, fenômeno já descrito por outros autores (Rybczynska *et al*, 1996).

Independente destes fatores intervenientes, foi possível demonstrar que a irradiação promovia, nas doses empregada, uma agregação dose dependente das proteínas da membrana da hemácias, diminuindo progressivamente a proporção de proteínas isoladas de baixo peso molecular, acompanhado do aumento de um rastro de agregados proteicos de alto e variado peso molecular, compostos principalmente por espectrina (Todo *et al*, 1982, Schuurhuis *et al* 1984). Alguns autores sugeriram que as modificações ocorridas eram dependentes da interação entre os lipídios da membrana e suas proteínas integrais (Cantafora *et al*, 1988). Estes achados são coincidentes com outros estudos sobre a irradiação de proteínas que mostram que a principal consequência do processo é a agregação de moléculas (Nascimento *et al*, 1996), o que promove certamente o aparecimento de novos epítomos conformacionais. A radiação promove sua ação diretamente ou pela ação indireta de radicais livres reativos formados a partir de moléculas simples, como a água. A definição do principal radical envolvido mostrou em nossos resultados que a principal espécie reativa era o  $\text{OH}^\bullet$  através de estudos usando captorees específicos. Existe uma grande diversidade de captorees para este radicais, tendo sido demonstrado que raios X, uma radiação ionizante também induz este radical como principal reativo na indução de agregação de espectrina em modelos semelhantes (Soszynski & Schuessler, 1991).

Assim, parece racional imaginar que sobre a superfície das hemácias irradiadas e integras surgiram novos epítomos, tanto pela oxidação como por mudanças conformacionais em proteínas, com pouca alteração de sua fisiologia.

Este fenômeno é interessante pois identificação destas alterações em hemácias isoladas poderiam ter múltiplas aplicações, já que freqüentemente a exposição à radiação não é de fácil mensuração (Greenstock & Trivedi, 1994) ou é feita em áreas delimitadas do corpo, através de radioterapia (Dubray *et al*, 1997).

Como pode ser observado em resultados, a produção de anticorpos policlonais contra proteínas de *ghosts* de hemácias foi bem sucedida em coelhos e camundongos, com anticorpos produzidos em maior quantidade contra proteínas irradiadas. Este fato não é estranho, pois em outros modelos, utilizando diferentes proteínas irradiadas, a resposta imune parece ser mais eficiente quando antígenos irradiados são utilizados na imunização (Pinho *et al*, 1995). Esta maior eficiência foi atribuída a uma captação preferencial das proteínas irradiadas por macrófagos, via receptores específicos para proteínas oxidadas (Cardi *et al*, 1998). Infelizmente a produção de anticorpos é dirigida tanto quanto aos epítomos modificados pela radiação como aos epítomos existentes na proteína nativa, este sempre em muito maior número, como pode ser observado em nossos ensaios de especificidade dos anticorpos por "western-blot". Assim, em ensaios onde as proteínas foram separadas de sua estrutura, como no ELISA ou no "western-blot", este tipo de reação esperado foi encontrada, com igual identificação dos antígenos isolados, sendo esperada apenas uma maior identificação dos rastros de alto peso molecular, que apresentaram-se realmente mais evidentes neste tipo de preparação. Esta comprovação era esperada, já que esta agregação mantém a maior parte dos epítomos existentes, conforme já relatado na literatura (Nascimento *et al*, 1996). A sondagem de hemácias irradiadas por anticorpos específicos produzidos contra antígenos de membrana de hemácias não tem relato precedente na literatura pesquisada.

Nossos resultados com antígenos preservados espacialmente, como na hemaglutinação indireta, mostraram que a fração dos anticorpos induzidos por *ghosts* irradiados que reagia contra hemácias irradiadas era preferentemente detectada por este método, mostrando que algumas alterações mais significativas encontravam-se na superfície da membrana da hemácia irradiada. Apesar de promissora, esta técnica apresentava algumas limitações quantitativas, além de necessitar de uma massa muito maior de anticorpos específicos para detecção da reação. Estes problemas e o fato de que havia uma diferença de apenas alguns títulos entre a reação de hemácias nativas e irradiadas, mostrando a necessidade

de testes de maior eficiência. O primeiro teste testado foi a imunofluorescência indireta, que utiliza menores volumes de reagentes e anticorpos e que se mostrou igualmente eficiente na detecção de anticorpos específicos contra hemácias irradiadas. Ao observarmos cuidadosamente a preparação, notamos que a grande maioria das hemácias irradiadas é fluorescente, na concentração de anticorpos utilizada, mostrando que realmente ocorre uma mudança conformacional ou na estrutura dos antígenos de superfície das hemácias, induzidas pela radiação ionizante, detectável mais eficientemente em doses mais elevadas. Estas modificações parecem estar na dependência de modificações que ocorreram em várias proteínas de superfície, já que a preparação de Western-Blot mostrou uma marcação generalizada das proteínas da hemácia. Por estas reações apresentarem a variação de observação do operador, além de uma menor eficiência quantitativa e pela dificuldade de identificação de produtos irradiados de maior antigenicidade no Western-Blot, a única alternativa que restava para a solução deste problema, seria a produção de anticorpos monoclonais específicos. Infelizmente, não fomos bem sucedidos nas fusões que executamos, apesar de um grande número de clones produtores de IgG terem sido produzidos, mas nenhum deles apresentava a reatividade esperada.

Assim, após quase dois anos de tentativas, optamos pela otimização da reação de imunofluorescência, através da utilização de citometria de fluxo (van der Engh, 1993). Esta técnica permite que a detecção seja feita de forma quantitativa e na população completa das hemácias submetidas a radiação.

Nossos ensaios mostraram claramente a reprodução dos dados obtidos pela imunofluorescência indireta, mostrando no entanto uma distribuição gaussiana dos achados de fluorescência quantitativa, com distribuição evidente das hemácias irradiadas em níveis superiores aos de hemácias normais. Além disso, foi evidente um efeito dose-resposta na sua distribuição, quando observamos a média numérica dos valores de fluorescência encontrados. Isto porém foi acompanhado de uma grande fluorescência de hemácias nativas submetidas ao mesmo soro, que não foi possível de ser separado pelo aumento da diluição dos anticorpos. Não tentamos estabelecer um limite para a fluorescência de hemácias normais, visando determinar a porcentagem das células irradiadas com maior fluorescência.



Nos ensaios de absorção do anticorpo marcador com hemácias normais, notamos que a fluorescência específica foi mantida, mas houve um ligeiro decréscimo da média em ambas as doses utilizadas, mostrando que alguns anticorpos que reagem com epítopos nativos foram retirados, mas que havia a manutenção da maioria dos anticorpos específicos encontrados. Novamente, não quisemos analisar a frequência de células positivas acima de um limiar de reatividade de células normais, embora seja evidente a maior proporção de células em canais superiores em um efeito dose dependente da radiação empregada.

Todos estes ensaios, utilizando hemácias integras, mostram que a radiação induziu alterações na superfície de hemácias capazes de reconhecimento por anticorpos induzidos por "ghosts" irradiados. Alguém poderia questionar que estes epítopos estão exatamente sobre a superfície das hemácias ou imediatamente abaixo de sua superfície, sendo detectáveis por anticorpos dirigidos contra proteínas do citoesqueleto, sendo demonstráveis por falhas ou maior permissibilidade da membrana da hemácia irradiada.

No entanto, uma de nossos resultados mais significativos foi a ausência de liberação da hemoglobina das hemácias após irradiação. Ao se imaginar que o canal de passagem do anticorpo permitiria a passagem de uma proteína de 180 kDa como a IgG e não uma proteína de 68 kDa como a hemoglobina, afasta esta possibilidade. Assim, o processo de irradiação deve induzir alterações conformacionais sobre a superfície das hemácias. Fala a favor desta hipótese, o fato de que o interior da hemácia é rico em captadores de radicais livres, devido a necessidades do próprio sistema de transporte de oxigênio, como a catalase e o 2-DPG. Já a superfície externa da hemácia estaria exposta mais facilmente a estes radicais livres, de rapidíssima vida média, sendo a primeira fronteira para os radicais produzidos no meio externo.

Independentemente desta explicação, o fato de serem encontradas alterações significativa no esqueleto de espectrina também pode explicar aparecimento de novos epítopos, pela geração de neo-antígenos devido a estabilização ou alterações da fluidez de proteínas de membrana na bicamada lipídica. Este fato foi hipoteticamente proposto para o aparecimento de neo-antígenos em hemácias parasitadas por plasmódios, protozoários que seriam capazes de modificar a membrana da hemácia através de rearranjo de proteínas



da superfície da hemácia, pela modificação de seus domínios intracelulares por proteólise ou outras modificações.

Nossos estudos mostraram que, apesar destas alterações, as hemácias suportam irradiações de até 400 Gy, sem modificações significativas de sua fisiologia, que ocorre em doses mais elevadas. O uso de captore de radicais livres diminuiu o impacto da radiação sobre as hemácias, sendo provável que, através de estudos mais detalhados, a inclusão de alguns deles na solução preservante pode levar a uma maior resistência aos efeitos da radiação. Isto deve ser feito com cuidado, pois da mesma forma que os captore impedem o dano à hemácia poderiam também inibir o efeito desejado da radiação, tanto pela maior sobrevivência de células linfóides indutora de reação enxerto-vs-hospedeiro, como pela sobrevivência de alguns patógenos que seriam eliminados pela radiação, nas doses preconizadas. Em alguns modelos semelhantes, utilizando a irradiação de concentrados de plaquetas irradiados, a dose de radiação é inversamente proporcional a sobrevivência de patógenos bacterianos, mas assumiu-se uma completa esterilidade em dose de até 150 Gy (Huston *et al*, 1998), abaixo do nosso nível proposto de 200 Gy. Isto poderia eliminaria problemas decorrentes da contaminação do sangue pelo tipo de manipulação empregada, aumentado pelo uso de sistemas complexos de filtração e concentração. Outro problema que poderia ser simplificado seria a esterilização parcial do sangue para patógenos bacterianos e eucariotos, como protozoários, que teriam sua capacidade reprodutiva abolida nestas doses de radiação. Infelizmente, os patógenos de menor tamanho como os vírus não seriam afetados por doses de radiação desta monta, restando partículas virais eficientes para sua transmissão após a radiação.

A demonstração de que a identificação de epítomos modificados pela radiação ionizante por anticorpos específicos em hemácias irradiadas têm outro tipo de abordagem e uso. A dosimetria biológica dos efeitos da radiação, em paciente submetidos a radioterapia ou em acidentes nucleares, é feita em sistemas de detecção demorados, com necessidade de cultivo de células, além de corpo técnico de alta especialização em citogenética. Novas abordagens tem sido propostas, como a apoptose radioinduzida ou a procura de feito clastogênico menos complexo, como a técnicas de micronúcleos. Nenhum destes aspectos leva em conta a alteração em proteínas do sangue para a detecção do efeito da radiação. As hemácias tem uma sobrevivência circulante relativamente longa e, caso

a técnica de detecção dos anticorpos fosse otimizada, nossos achados de anticorpos específicos contra hemácias irradiadas abre a perspectiva de desenvolvimento desta abordagem. A otimização poderia ser alcançada por radioimunoensaio em hemácias integras ou através de aprimoramento da técnica de citometria de fluxo, para identificação da porcentagem de hemácias contendo os epítomos modificados.

Óbviamente, o melhor resultado nesta abordagem dependeria do aprimoramento da produção dos anticorpos aqui demonstrados, como pela produção de anticorpos monoclonais ou sua purificação a partir de anticorpos policlonais, por técnicas de afinidade e absorção. Esta determinação dosimétrica tem maior importância no controle de radioterapia, pois a dose aplicada neste caso é regional, com variações na decorrência do fluxo sanguíneo do órgão irradiado, extrapolando-se a dose total com modelo matemáticos que tentam determinar o impacto no hospedeiro daquela radiação aplicada.

O uso de testes para determinação da fração de hemácias irradiadas poderia permitir um melhor planejamento do processo, com óbvias conseqüências para os pacientes.

## 6 - CONCLUSÕES

### Geral

Nossos dados comprovam que as hemácias humanas podem ser irradiadas com doses superiores às aquelas usualmente utilizadas, com possível efeito sobre patógenos contaminantes, sem perda da viabilidade do material para uso em transfusões. Desde que aprimorada, a detecção de epítomos modificados pela radiação pode oferecer uma nova ferramenta dosimétrica.

### Específicos

- a. As hemácias humanas, submetidas a radiação ionizante, apresentam alterações significativas de volume celular, causada pela entrada de líquidos e saída de potássio, de forma dose-dependente, significativa em doses superiores a 400 Gy.
- b. Sem perda de integridade isoosmótica, as hemácias, submetidas a radiação ionizante, apresentam maior fragilidade a desafio hipoosmótico, quando irradiadas em doses superiores a 400 Gy.
- c. Embora sem perda de sua capacidade de deformação em estresses elevados, as hemácias submetidas a radiação apresentam uma menor deformabilidade dose-dependente em estresses de menos intensidade.
- d. Proteínas de membranas de hemácias irradiadas apresentam alterações identificáveis por SDS-PAGE, com agregação de moléculas de espectrina e diminuição de bandas proteicas de peso molecular menor.
- e. Os efeitos causados pela radiação ionizante sobre proteínas de membranas de hemácias humanas são devidos principalmente a ação do radical  $\text{OH}^*$ , demonstrado por estudos utilizando captadores específicos.
- f. As modificações introduzidas pela radiação ionizante em proteínas de superfícies de hemácias irradiadas são identificadas por anticorpos produzidos contra estes antígenos em animais.
- g. Estes anticorpos são capazes de identificar hemácias irradiadas a diferentes doses de radiação ionizante, por métodos de hemaglutinação e imunofluorescência.

- h. A quantificação da identificação de hemácias irradiadas, por estes anticorpos, em citometria de fluxo sugere uma possibilidade de uso em abordagem dosimétrica.

## 7 – BIBLIOGRAFIA

- Anand AJ, Dzik WH, Imam A, Sadrzadeh SM (1997) Radiation-induced red cell damage: role of reactive oxygen species. *Transfusion* 37(2):160-165
- Anderson G, Mintz PD (1994) Effect of oxygen and temperature on the potassium efflux of irradiated, stored red blood cells. *Ann Clin Lab Sci* Jul;24(4):339-345
- Arseniev L, Schumann G, Andres J (1994) Kinetics of extracellular potassium concentration in irradiated red blood cells *Infusionsther Transfusionsmed* Oct;21(5):322-324
- Bartosz G, Schon W, Kraft G, Gartner H (1992) Irradiation increases proteolysis in erythrocyte ghosts: a spin label study. *Radiat Environ Biophys*;31(2):117-121
- BekkumVDW (1965) Transfusion or Transplantation. *Isr J Med Sci* 1: 879-82
- Blais RE, Hadjipavlou AG, Shulman G (1996) Efficacy of autotransfusion in spine surgery: comparison of autotransfusion alone and with hemodilution and apheresis. *Spine* 21(23):2795-2800
- Bodmer J, Bodmer WF, Payne R, Terasaki PI, Vredevoe D (1966) Leucocyte antigens in man: a comparison of lymphocytotoxic and agglutination assays for their detection. *Nature* 210(31)38-31.
- Bonnefont-Rousselot D, Gardes-Albert M, Delattre J, Ferradini C (1993) Oxidation of low-density lipoproteins by OH. and OH./O<sub>2</sub><sup>-</sup>. free radicals produced by gamma radiolysis. *Radiat Res* 134(3):271-282
- Bowman J (1997) The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin Perinatol* 21(1):39-44
- Bradford, M. M.(1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brugnara C, Churchill WH (1992) Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion* Mar;32(3):246-252
- Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D (1997) Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips:

- glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion* 37(3):255-258
- Butch S & Tiehen A (1996) eds *Blood Irradiation: A User's Guide* Bethesda, MD: AABB Press Bethesda, 1996.
- Butler, J. ; Land, E. J. ;Swallow, A. J. (1984) Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* vol. 24, n<sup>o</sup>. 3/4 273-282
- Button LN, DeWolf WC, Newburger PE, Jacobson MS, Kevy SV (1981) The effects of irradiation on blood components. *Transfusion* 21(4):419-426
- Cable, A.W. (1966) *Blood Irradiation: A User's Guide* American Association of Blood Banks, Bethesda, Maryland.
- Cantafora A, Ceccarini M, Guidoni L, Ianzini F, Minetti M, Viti V (1987) Effects of gamma-irradiation on the erythrocyte membrane: ESR, NMR and biochemical studies. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*;51(1):59-69
- Cardi BA, Nascimento N, Andrade HF Jr (1998) Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with <sup>60</sup>Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int J Radiat Biol* May;73(5):557-564
- Chamberland, M.; Khabbaz, R.F. (1998) Emerging issues in blood safety, *Infect.Dis. Clin. North Am.*, 12(1) 217-229.
- Davey RJ (1995) Transfusion associated graft versus host disease and the irradiation of blood components. *Immunol Invest* 24:431-434
- Davey RJ, McCoy NC, Yu M, Sullivan JA, Spiegel DM, Leitman SF (1992) The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival *Transfusion*;32(6):525-528
- Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 262:9902-9907.
- Dodge, J. T. Mitchell, C. Hanahan, D J.(1963) The Preparation and Chemical Characteristics of Homoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes *Arch. Biochem. Biophys.* 100-119.
- Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, Kager PA, White NJ, Vreeken J (1997) Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 57(5):507-511

- Draganic DZD, Niketic V, Vujosevic SI (1985) Radiation chemistry of an aqueous solution of glycine: compounds of interest to chemical evolution studies. *J.Mol.Evol* 22:82-90.
- Dubey, J.P.; Jenkins, M.C.; Thayer, D.W.; Kwok, O.C.; Shen, S.K. (1996) Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *J. Parasitol* 82(5): 724-727.
- Dubray B, Pavy JJ, Giraud P, Danhier S, Cosset JM (1997) Predictive tests of response to radiotherapy. Assessment and perspectives in 1997 *Cancer Radiother*;1(5):473-483
- Durussel JJ, Berthault MF, Guiffant G, Dufaux J (1998) Effects of red blood cell hyperaggregation on the rat microcirculation blood flow. *Acta Physiol Scand* May;163(1):25-32
- Edelman R, Hoffman SL, Davis JR, Beier M, Sztejn MB, Losonsky G, Herrington DA, Eddy HA, Hollingdale MR, Gordon DM (1993) Long-term persistence of sterile immunity in a volunteer immunized with X-irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 168(4):1066-1070
- Fagiolo, E.; Pozzetto, A.; Cellini, N.; Valentini, V. (1983). Determination of the radiation dose on blood components to prevent post-transfusional graft-vs-host reaction. *Haematologica* 68(5): 573-580.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* Jun 22;10(13):2606-2617
- Feldeberg, R. S. Carew, J. A. (1981) Water radiolysis products and nucleotide damage in gamma-irradiated DNA. *Int J Radiat Biol Phys Chem Med* 1981. Jul;40(1): 11-47
- Grecz N, Brannon RB, Killgore G (1987) Radiation sterilization of surgical instruments with a consideration of metal shielding on sterilization efficiency. *Am J Infect Control* Jun;15(3):101-106
- Greenstock CL, Trivedi A (1994) Biological and biophysical techniques to assess radiation exposure: a perspective. *Prog Biophys Mol Biol*;61(2):81-130
- Greenwalt TJ (1997) A short history of transfusion medicine. *Transfusion* 37(5):550-563

- Gurtler L (1994) Blood-borne viral infections. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5 Suppl 3:S5-S10
- Gwozdziński K (1991) Ionizing radiation-induced structural modification of human red blood cells. *Radiat Environ Biophys*;30(1):45-52
- Hagen U (1989) Biochemical aspects of radiation biology *Experientia* 45:7-12
- Haimovitz-Friedman; Kan, Chu-Cheng; Ehleiter, D.; Persaud, r.S.; McLoughlin, M.; Fuks, Z. and Kolesnick, R.N. (1994). Ionizing Radiation Acts on Cellular Membranes to Generate Ceramide and Initiate Apoptosis, *J.Exp. Med* v.180, Aug. 525-535
- Halliwell, B & Gutteridge, J. M. C.(1989) – *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Clarendon Press, Oxford
- Helszer, Z.; Jozwiak, Z.; Leyko, W. (1980) Osmotic fragility and lipid peroxidation of irradiated erythrocytes in the presence of radioprotectors. *Experientia* 36(5): 521-524.
- Hillman RS, Helbig S, Howes S, Hayes J, Meyer DM, McArthur JR (1979) The effect of an educational program on transfusion practices in a regional blood program. *Transfusion* 19(2):153-157
- Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM (1991) Evaluation of the red cell storage lesion after irradiation in filtered packed red cell units. *Transfusion* 31(6):497-499
- Hiramoto, R , 1998, Efeitos da radiação ionizante sobre a estrutura, metabolismo e infectividade de um protozoário patogênico. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – São Paulo.
- Hoffbrand AV& Pettit JE (1993) *Essential Haematology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford,
- Hudson, L.& Hay, F.C.(1985) *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Huston BM, Brecher ME, Badarenko N (1998) Lack of efficacy for conventional gamma irradiation of platelets concentrates to abrogate bacterial growth. *Am J Clin Pathol*; 109:743-747.
- IAEA – International Atomic Energy Agency, 1986. *Biological Dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for dose assessment*. Technical Reports Series, nº 260, Vienna.



- Jeter EK, Gadsden RH, Cate J 4th (1991) Effects of irradiation on red cells stored in CPDA-1 and CPD-ADSOL (AS-1). *Ann Clin Lab Sci* May;21(3):177-186
- Kagan V; Witt E; Goldman R; Scita G; Packer, L (1992). Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin. *Free Radic Res Commun* 16(1): 51-54.
- Kaniewski WS, Hakim TS, Freedman JC (1994) Cellular deformability of normoxic and hypoxic mammalian red blood cells. *Biorheology* 31(1):91-101
- Karle H, Hansen NE (1971) Radiation induced changes in red cell filterability. *Scand J Haematol*;8(1):72-74
- Katz D, Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N (1996) Effect of radiation on red cell membrane and intracellular oxidative defense systems. *Free Radic Res* 24(3):199-204
- Kemeny, D.J. & Challacombe, S. J. (1988) ELISA and other solid phase immunoassays: theoretical and practical aspects John Wiley & Sons Ltd. New York..
- Kim AY, Thayer DW (1995) Radiation induced cell lethality of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028: cooperative effect of hydroxyl radical and oxygen. *Radiat Res* 144:36-42
- Kim AY, Thayer DW (1995) Radiation induced cell lethality of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028: cooperative effect of hydroxyl radical and oxygen. *Radiat Res* 144:36-42
- Kochevar IE (1990) UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol* 52(4):795-800
- Kong S, Davison AJ, Bland J (1981) Actions of gamma-radiation on resealed erythrocyte ghosts. A comparison with intact erythrocytes and a study of the effects of oxygen. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 40(1):19-29
- Kover G, Schoffeniels E (1965) Effects of x-irradiation and various substances on the nature of erythrocyte permeability *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*;9(5):461-476)
- Kyagova AA, Zhuravel NN, Malakhov MV, Lysenko EP, Adam W, Saha-Moller CR, Potapenko AYa (1997) Suppression of delayed-type hypersensitivity and

- hemolysis induced by previously photooxidized psoralen: effect of fluence rate and psoralen concentration. *Photochem Photobiol* 65(4):694-700
- Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leitman SF; Holland PV (1985) Irradiation of blood products *Transfusion* 25:293-301
- Mair B, Benson K (1998) Evaluation of changes in hemoglobin levels associated with ABO-incompatible plasma in apheresis platelets. *Transfusion* 38(1):51-55
- Merril, C.R.;Goldman, D & Van Keuren(1984) Gel Protein Stains: Silver Stain *Meth. Enzymol* 104: 441-446
- Mill, A. J.; Wells, J.; Hall, S.C. and Butler, A .(1996), Micronucleous induction in Human lymphocytes: Comparative effects of X Rays, Alpha particles, Beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiation Research*, vol 145, 575-585
- Mohandas, N.; Chasis, J.A. (1993) Red Blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *sem. Hematol.* 30:171-192.
- Muller, W. U & Streffer, C. (1991) Biological indicators for radiation adamage. *Int J Radat Biol* Apr, 59(4): 863-873.
- Nakauchi H, Gachelin C (1993) Les cellules souches *La Recherche* 254:537-541
- Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II (1996) Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon* 34(1):123-131
- Nash, G.B.; Gratzer, W.B. (1993) Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane. *Biorheology* 30: 397-407.
- Osterholm MT, Potter EM(1997) Irradiation Pasteurization of Solid Foods: Taking Food Safety to the Next Level. *Emerging Infectious Diseases* vol 3 N<sup>o</sup> 4 Oct-Dec 1997
- Pelszynski, M.M.; Moroff, G.; Luban, N.L.; Taylor, B.J.; Quinones, R.R. (1994). Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood*, 83(6):1683-1689.

- Persijn GG, Gohen B, Lansbergen Q, D'Amaro J, Selwood N, Wing A, van Rood JJ (1982) Effect of HLA-A and HLA-B matching on survival of grafts and recipients after renal transplantation. *N Engl J Med* 307(15):905-908.
- Pinho JR, Cardi BA, Andrade HF Jr, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, Schenberg AC (1995) Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*;63(3):381-390
- Polesky HF (1996) Improving the safety of transfusion therapy. *Clin. Lab Med* 16:975-988
- Riley PA (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effect of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27-33
- Rybczynska M, Hoffmann SK, Goslar J (1996) Molecular changes in erythrocyte membranes induced by nitroimidazoles and radiation. *Pol J Pharmacol* 48(3):269-280
- Samuel LH, Anderson G, Mintz PD(1997) Rejuvenation of irradiated AS-1 red cells. *Transfusion* 37(1):25-28
- Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Bennett D (1998) Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America. *Emerg Infect Dis.* 4(1): 5-11.
- Schuessler H, Shilling K(1984) Oxygen effect in the radiolysis of proteins Part 2 Bovine serum albumin. *Int.J Radiat Biol.* 45:267-281.
- Schuurhuis GJ, Hommes J, Vos J, Molenaar I, Konings AW (1984) Radiation-induced structural changes in membrane proteins of human erythrocytes and ghosts and the relation to cellular morphology. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*; 45(2):159-177
- Seach LC, Frohlich H; Saint-Marc C, Charlier M.(1996) DNA Breakage upon K-Shell Excitation Of Phosphorus as A Model for Direct Effects in Radiation Biology. *Radiation Research* 145:632-635 .
- Seltzer SM (1993) Calculation of photon mass energy transfer and mass energy absorptions coefficients. *Radiat Res* 136:147-170
- Shulman IA (1994) Parasitic infections and their impact on blood donor selection and testing. *Arch Pathol Lab Med Apr*;118(4):366-370

- Soerensen B(1975). Os Riscos da Transfusão Sanguinea. Servier, São Paulo 1994.
- Soszynski M, Schuessler H (1991) Effect of X-irradiation on erythrocyte membrane proteins. Primary radicals. *Int J Radiat Biol* 60(6):859-875
- Steack TL (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.*62:1-19,
- Steack TL(1972) Cross-Linking the Major Proteins of the Isolated Erythrocyte Membrane *J Mol. Biol.* 66, 295-305
- Stuart, J. & Nash, G.B. (1990). Technological advances in blood rheology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 28:61-93, 1990
- Suda BA, Leitman SF, Davey RJ (1993) Characteristics of red cells irradiated and subsequently frozen for long-term storage. *Transfusion* 33:389-392
- Sullivan SG, Stern A (1984)Membrane protein changes induced by tert-butyl hydroperoxide in red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 74(2):215-220
- Sweeney, J.D.; Holme, S.; Moroff, G., (1994). Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion* 34(9): 779-783.
- Thomas ED; Storb R, Clift RA (1975) Bone- marrow transplantation. *N England J Med.*292. 832-43.
- Todo T, Yonei S, Kato M (1982). Radiation-induced structural changes in human erythrocyte membrane proteins revealed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis *Radiat Res* ;89(2):408-419
- Tyler KL & Fields BN(1996). Pathogenesis of viral infections in ed. Fields BN, Knipes DM, Howleys PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE - *Fields'Virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Raven, Philadelphia, pp173-218.
- Utley JR, Wilde EF, Leyland SA, Morgan MS, Johnson HD (1995) Intraoperative blood transfusion is a major risk factor for coronary artery bypass grafting in women. *Ann Thorac Surg* ;60(3):570-574
- van den Engh (1993) New applications of flow cytometry. *Curr Opin Biotechnol* Feb;4(1):63-68
- Van der Shuis JJ, ten Kate FJ, Vuzevski VD, Kothe FC, Aelbers GM, van Eijk RV (1985) Transfusion syphilis, survival of *Treponema pallidum* in stored donor blood. II. Dose dependence of experimentally determined survival times. *Vox Sang* 49:390-399

- Waki, S.; Yonome, I.; Suzuki, M., (1983). *Plasmodium falciparum*; attenuation by irradiation. *Exp Parasitol.*, 56(3) 339-345.
- Wallace, J.(1997) *Blood Transfusion for Clinicians*. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Wilson, C.M.(1983) Staining of Proteins on Gels: Comparisons of Dyes and Procedures. *Meth. Enzymol* 91: 236-246
- Winkelstein A, Kiss JE (1997) Immunohematologic disorders. *JAMA* 278(22):1982-1992. Müller, WU and Streffer, C, Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Rad. Biol.* vol 59, n° 4, 863-873, 1991.
- Wu, S. G. ;Jeng, F.R. ;Wei S.Y.; Su,C. Z.; Chung, T.C.; Chang W. J. Chang, H. W(1998). Red blood cell osmotic fragility in cronically hemodialyzed patients.*Nephron* 78(1): 28-32