

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
O PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA E INFORMÁTICA INDUSTRIAL

ALETEIA BRANTE MORI

**ANÁLISE DA ERIPTOSE E CONCENTRAÇÃO
EXTRACELULAR DO POTÁSSIO NAS HEMÁCIAS
IRRADIADAS COM DIFERENTES TAXAS DE DOSE**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2019

ALETEIA BRANTE MORI

**ANÁLISE DA ERIPTOSE E CONCENTRAÇÃO
EXTRACELULAR DO POTÁSSIO NAS HEMÁCIAS
IRRADIADAS COM DIFERENTES TAXAS DE DOSE**

Dissertação apresentada O Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do Grau de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho
Conceição

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Jaqueline Kappke
Zambianchi

CURITIBA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Mori, Aleteia Brante

Análise da eriptose e concentração extracelular do potássio nas hemácias irradiadas com diferentes taxas de dose [recurso eletrônico] / Aleteia Brante Mori.-- 2019.

1 arquivo eletrônico (87 f.) : PDF ; 19,5 MB

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 22 abr. 2019)

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2019

Bibliografia: f. 68-72

1. Engenharia elétrica - Dissertações. 2. Radiologia médica. 3. Sangue - Doenças - Diagnóstico. 4. Irradiação. 5. Sangue - Doenças - Diagnóstico. 6. Radiologia médica - Simulação. 7. Eritrócitos - Doenças - Diagnóstico. 8. Radiação - Uso terapêutico. 9. Raios gama. 10. Potássio. I. Conceição, André Luiz Coelho. II. Kappke, Jaqueline. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba.

Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 821

A Dissertação de Mestrado intitulada “**Análise da Eriptose e Concentração Extracelular do Potássio nas Hemácias Irradiadas com Diferentes Taxas de Dose.**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Aleteia Brante Mori**, no dia 14 de março de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). André Luiz Coelho Conceição - Presidente – (UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Evamberto Garcia de Goes - (FURG)

Prof(a). Dr(a). Marcelo Antoniassi - (UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Alexandra Cristina Senegaglia – (PUC-PR)

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 14 de março de 2019.

Dedico este trabalho ao meu marido e filhas. Sem vocês eu não teria transformado o sonho em realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por tudo ter ocorrido da forma que foi, colocando as dificuldades, mas ajudando também a superá-las, colocando obstáculos, mas também as pessoas certas para me ajudar a enfrentar todos eles.

Ao meu marido e filhas que me incentivaram desde o começo e me ajudaram a não desistir e sempre seguir em frente, pois não foi fácil para ninguém.

Aos meus amigos que me apoiaram e ajudaram muito na realização deste projeto, em especial à Farmacêutica Bioquímica da Unidade Transfusional do Hospital de Clínicas Guadalupe do Rocio Cardoso, sempre pronta a me ajudar. À Keity Priscile Baroni e Tamires Alexandre que sempre se dispuseram a me ajudar.

Aos Professores Doutores André Luiz Coelho Conceição, Jaqueline Kappke Zambianchi, Pedro Zambianchi Júnior, Marcelo Antoniassi e Angélica Maria Tortola Ribeiro que sempre estiveram ao meu lado, me dando suporte e orientando para a realização deste trabalho.

Ao Doutor José Carlos Gasparin Pereira, por ter cedido o uso do equipamento e equipe profissional para a realização da irradiação das minhas amostras, no Instituto de Oncologia e Radioterapia de Curitiba.

Ao físico Ricardo Goulart da Silva da Radion pela colaboração no planejamento e realização da irradiação das amostras de hemácias.

À Dra. Ana Paula Galerani, do Hospital de Clínicas, pela ajuda e orientação para achar as pessoas certas na realização deste projeto.

À Doutora Alessandra Ferreira Koslowski, do Laboratório de Análises Clínicas de Curitiba-LANAC, pelas medidas realizadas nas amostras.

À Doutora Alexandra Cristina Senegaglia e Doutora Lidiane Maria Boldrini Leite, da PUC, que dispenderam seu tempo para realização das medidas nas amostras com citometria de fluxo possibilitando o entendimento dos resultados obtidos.

À Sheila Barreto por me dar uma mão na correção da minha dissertação.

Ao primo Glauber que sempre esteve disposto a me socorrer no uso do Latex.

À empresa TACHIBANA CIA LTDA, pela doação de material, tornando possível a realização dessa pesquisa.

A todos da minha família, em especial aos meus pais e sogros, por fazerem parte da minha vida e terem me ajudado a cuidar das minhas filhas, para que eu pudesse realizar as disciplinas e alcançar este sonho.

Aos meus amigos que sentiram a distância em decorrência da minha dedicação na realização deste projeto.

*"Por isso vos digo: Não andeis ansiosos quanto à vossa vida,
pelo que haveis de comer ou pelo que haveis de beber;
nem quanto ao vosso corpo, pelo que haveis de vestir.
Não é a vida mais do que o mantimento,
e o corpo mais do que o vestuário?
(Bíblia Sagrada, Mateus 6, 25)*

RESUMO

BRANTE MORI, Aleteia. ANÁLISE DA ERIPTOSE E CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DO POTÁSSIO NAS HEMÁCIAS IRRADIADAS COM DIFERENTES TAXAS DE DOSE. 88 f. Dissertação – O Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

A irradiação de sangue pode ser feita através de raios X produzidos por um acelerador linear ou através de um aparelho específico de irradiação de sangue com material radioativo (Ce-137 ou Co-60) em seu interior que, através do decaimento radioativo destes elementos, emitem os raios gama. A irradiação de sangue é um procedimento de extrema importância na prevenção da Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional (DECHT) inativando os linfócitos T. Essa doença é uma síndrome rara e fatal, pois os linfócitos transfundidos de um doador de sangue atacam as células do receptor sendo a irradiação de componentes celulares (hemácias, plaquetas e granulócitos), a única forma de se prevenir a DECHT. Este estudo consistiu em utilizar diferentes taxas de dose na irradiação de sangue utilizando o irradiador específico de sangue Gammacell 1000 e um acelerador linear com energias de fótons de 662 keV e nominal de 6MV, respectivamente. Foram avaliadas como estas diferentes taxas influenciaram as estruturas eritrocitárias, que são responsáveis pelo transporte do oxigênio do nosso organismo. A dose total de 25 Gy foi administrada por ambos métodos de irradiação para se inativar os linfócitos T evitando a doença do enxerto contra hospedeiro transfusional. O objetivo principal deste projeto foi verificar o grau de eriptose e concentração de potássio extracelular das hemácias irradiadas com diferentes taxas de dose, armazenadas durante 35 dias que é o tempo de validade das bolsas de CPDA-1, mas após a irradiação a validade passa a ser de 28 dias devido a danos celulares produzidos por esse procedimento. A metodologia consistiu em utilizar 10 bolsas de concentrados de hemácias de doadores voluntários do Biobanco do Hospital de Clínicas. Cada bolsa de concentrado de hemácias foi fracionada em três outras totalizando 30 bolsas para o estudo. Essas bolsas foram irradiadas em quatro taxas de dose pelo acelerador linear, pelo irradiador específico e controle (sem irradiação). De cada bolsa foram realizadas 5 medidas totalizando 150 amostras. As irradiações foram realizadas com dose total de 25 Gy no plano médio das bolsas em diferentes taxas de dose no acelerador linear para avaliar os danos causados à célula como eriptose (morte das hemácias) e as concentrações de potássio extracelular obtidas. Como resultado foi verificado que com o aumento da taxa de dose os danos celulares foram maiores, foram obtidas respostas muito próximas comparando a taxa de dose do Gammacell com o acelerador linear. Ocorreu aumento do nível de potássio após a utilização da irradiação nas amostras em estudo como era esperado, sendo que com o aumento da taxa utilizada aumenta a quantidade de potássio extracelular e a eriptose.

Palavras-chave: Irradiação de sangue. Doença do enxerto contra hospedeiro. Radiação gama. Eriptose.

ABSTRACT

BRANTE MORI, Aleteia. ANALYSIS OF ERYPTOSIS AND EXTRACELLULAR POTASSIUM CONCENTRATION IN IRRADIATED RED BLOOD CELLS WITH DIFFERENT DOSE RATES. 88 f. Dissertação – O Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

The blood irradiation can be performed with X-rays produced by an accelerator, or by a specific equipment for irradiating blood with radioactive material (Ce-137 or Co-60) in its interior that, through the radioactive decay of these elements, emits gamma rays. Blood irradiation is a very important procedure in the prevention of Transfusional Host Graft Disease (DECHT) by inactivating T lymphocytes. This disease is a rare and fatal syndrome because the transfused lymphocytes of a blood donor attack the cells of the receptor. Thus, the irradiation of cellular components (red blood cells, platelets and granulocytes) is the only way to prevent DECHT. This study consisted of using different dose rates in blood irradiation using the Gammacell 1000 blood specific irradiator, combined with a linear accelerator of 662 keV of photon energy, and 6MV of nominal energy. We evaluated how these different rates influenced the erythrocyte structures, which are responsible for the oxygen transport in our organism. The total dose of 25 Gy was administered by both irradiation methods in order to inactivate the lymphocytes by the graft versus transfusional host disease. The main goal of this project was to verify the eryptosis and the concentration of extracellular potassium of the red blood cells in the irradiated blood samples with different dose rates. The samples were stored during the validity period of the CPDA-1 bags, which is of 35 days, but after irradiation this period decreases to 28 days due to the cellular damage produced by this procedure. The methodology consisted in using 10 bags of red blood cells from voluntary donors from the Biobank of Hospital de Clínicas. Each bag of red blood cells was fractionated in three other bags with smaller volumes, totalizing 30 bags for the study. These samples were irradiated with four dose rates by the linear accelerator, by the specific irradiator and without radiation (control samples). From each bag, 5 measurements were carried out totalizing 150 samples. The irradiations were performed with a total dose of 25 Gy in the median plane of the bags, and at different dose rates using the linear accelerator to evaluate cell damage, such as eryptosis (erythrocyte death) and extracellular potassium concentration. As a result, it was verified that the cellular damage increases with the dose rate, and very close results were obtained comparing the Gammacell dose rate with the linear accelerator. Moreover, the extracellular potassium concentration increased after the use of the irradiation in the study samples, as expected. In addition, the quantity of extracellular potassium and eryptosis also increased with the dose rate.

Keywords: Blood irradiation. Graft versus host disease. Gamma radiation. Eryptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Hemácias normais	21
Figura 2	– Exemplo de leucócitos	23
Figura 3	– Preparação dos Hemocomponentes	25
Figura 4	– Sangue total centrifugado	26
Figura 5	– Extrator automático de plasma	26
Figura 6	– Concentrado de hemácias	27
Figura 7	– Centrifugação da bolsa de sangue total	43
Figura 8	– Processo de extração do plasma	44
Figura 9	– Bolsas de transferência neonatal	44
Figura 10	– Fracionamento de bolsas de concentrado de hemácias	45
Figura 11	– Distribuição do volume igual nas bolsas	45
Figura 12	– Fita de controle de irradiação de 25 Gy	46
Figura 13	– Planejamento na tomografia computadorizada	47
Figura 14	– Irradiação no acelerador linear	48
Figura 15	– Curva de dose acelerador linear	48
Figura 16	– Curva de dose ampliada no acelerador linear	49
Figura 17	– Irradiação com Gammacell 1000	49
Figura 18	– Esquema de funcionamento aparelho Gammacell 1000	50
Figura 19	– Mapa de isodose do aparelho Gammacell 1000	51
Figura 20	– Esquema resumido ISE indireto	53
Figura 21	– Esquema resumido da citometria	53
Figura 22	– Gráfico da concentração relativa de potássio extracelular	58
Figura 23	– Gráfico da concentração relativa de potássio extracelular por taxa de irradiação	60
Figura 24	– Gráfico da porcentagem relativa média de eriptose em relação aos dias ..	63
Figura 25	– Gráfico da porcentagem relativa da eriptose por taxa de irradiação	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	TEMPO DE VALIDADE DA BOLSA DE SANGUE	25
Tabela 2	–	CRONOGRAMA DO PROJETO	42
Tabela 3	–	VALORES ABSOLUTOS DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR	57
Tabela 4	–	CONCENTRAÇÃO RELATIVA DE POTÁSSIO EXTRACELULAR ..	58
Tabela 5	–	VALORES ABSOLUTOS EM PORCENTAGEM DE ERIPTOSE	62
Tabela 6	–	PORCENTAGEM RELATIVA MÉDIA DE ERIPTOSE	63

LISTA DE SIGLAS

ACD	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Dextrose
AL	Acelerador Linear
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Concentrado de Granulócitos
CH	Concentrado de Hemácias
CP	Concentrado de Plaquetas
CP2D	Citrato, Fosfato e Dextrose-Dextrose
CPD	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Fosfato de Sódio, Dextrose
CPDA-1	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Fosfato de Sódio, Dextrose e Adenina
DECHT	Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
LANAC	Laboratório de Análises Clínicas de Curitiba
LET	Transferência Linear de Energia do inglês - Linear Energy Transfer
PL	Plasma
RADION	Instituto de Oncologia e Radioterapia de Curitiba
RBE	Efetividade Biológica Relativa
RT	Reação Transfusional
ST	Sangue Total
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPR	Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

γ	Irradiação gama
λ	Constante de desintegração
Cs	Césio
Ci	Curie
D	Dose absorvida
dm	volume de massa
dE_{ab}	Energia média depositada pela radiação
Gy	Gray
H _T	Dose equivalente
K	Energia cinética liberada por unidade de massa
N	Número de núcleos radioativos remanescentes após um tempo t
Sv	Sievert
w _R	Fator de ponderação da radiação
Z	Número atômico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	O SANGUE	20
3.1.1	Hemácias	20
3.1.1.1	Membrana Eritrocitária	21
3.1.2	Leucócitos	22
3.2	MEDICINA TRANSFUSIONAL	23
3.3	PREPARAÇÃO DO SANGUE	24
3.3.1	Sangue Total	25
3.3.2	Concentrado de Hemácias	26
3.4	REAÇÕES TRANSFUSIONAIS - RT	27
3.4.1	Reações Agudas Não Imunológicas	28
3.4.1.1	Alterações Metabólicas	28
3.4.2	Reações Tardia Imunológica	28
3.4.2.1	Doença do Enxerto contra Hospedeiro Transfusional - DECHT	28
3.5	POTÁSSIO EXTRACELULAR	30
3.6	IRRADIAÇÃO DE SANGUE	30
3.7	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA	31
3.8	ESPALHAMENTO COERENTE	31
3.9	EFEITO FOTOELÉTRICO	31
3.10	EFEITO COMPTON	32
3.11	PRODUÇÃO DE PARES	33
3.12	REAÇÕES FOTONUCLEARES	33
3.13	PRODUÇÃO DE RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA IONIZANTE	33
3.13.1	Raios X	33
3.13.2	Radioisótopos	34
3.13.3	Desintegração	34
3.13.4	Decaimento gama	35
3.14	GRANDEZAS FÍSICAS	35
3.14.1	Exposição	36
3.14.2	Dose absorvida	36
3.14.3	Dose equivalente	36
3.14.4	Kerma	37
3.15	RADIOBIOLOGIA	37
3.15.1	Danos Celulares	37
3.15.2	Morte Celular	38
3.15.3	Efeitos Biológicos	38
3.15.4	Radiosensibilidade nos Tecidos	39

3.15.5	Transferência Linear de Energia	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	CENÁRIO E PARTICIPANTES DA PESQUISA	41
4.2	ASPECTOS ÉTICOS	42
4.3	COLETA DE DADOS	42
4.3.1	Preparação e Fracionamento das Bolsas de Concentrados de Hemácias	43
4.4	FRACIONAMENTO DAS BOLSAS DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS ..	44
4.4.1	Irradiação dos Concentrados de Hemácias	46
4.4.1.1	Irradiação dos Concentrados de Hemácias no Acelerador Linear	47
4.4.2	Irradiação com o Gammacell 1000	49
4.5	ANÁLISE DAS BOLSAS DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS	51
4.6	POTÁSSIO EXTRACELULAR POR MÉTODO ISE INDIRETO	52
4.7	ENSAIO DA ERIPTOSE	53
4.8	METODOLOGIA ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EM RELAÇÃO AOS DIAS	57
5.2	CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EM RELAÇÃO ÀS TAXAS APLICADAS	60
5.3	GAMMACELL 1000 X ACELERADOR LINEAR EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR	61
5.4	ERIPTOSE EM RELAÇÃO AOS DIAS	62
5.5	ERIPTOSE EM RELAÇÃO ÀS TAXAS APLICADAS	65
5.6	GAMMACELL 1000 X ACELERADOR LINEAR COM RELAÇÃO À ERIPTOSE	67
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	Apêndice A – PROCEDIMENTO PARA REALIZAÇÃO DA CITOMETRIA DAS HEMÁCIAS	74
	Apêndice B – TCLE	75
	Apêndice C – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES DO COMPLEXO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR - EBSEH	80
	Apêndice D – CÁLCULO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO DO IRRADIADOR DE SANGUE GAMMACELL 1000	81
	Apêndice E – TABELA DE VALORES ABSOLUTOS DA ERIPTOSE E CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR	82
	Apêndice F – MÉTODO ISE INDIRETO PARA POTÁSSIO	83
	Anexo A – PARECER ACEITO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DO PARANÁ	87

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, com a evolução da medicina diagnóstica, terapêutica e transfusional, o uso dos raios X trouxe incontáveis vantagens possibilitando o diagnóstico de fraturas e doenças através das imagens radiológicas, tratamentos de radioterapia para pacientes com câncer e seu uso como meio profilático na transfusão de sangue. A prática de transfusão sanguínea tem aumentado, de forma a atender os pacientes que sofrem de traumas, seja pelo aumento da violência ou acidentes de trânsito, ou para manutenção da vida como no caso de doenças em que são necessárias várias transfusões, como a anemia falciforme e a talassemia, por exemplo (OLIVEIRA et al., 2013). Por isso, a importância de se fornecer um sangue seguro e de qualidade à essas pessoas, seguindo normas rigorosas descritas pelo Ministério da Saúde (SOARES et al., 1998).

A medicina transfusional encontrou nas fontes radioativas (emissão gama) e nos aceleradores lineares (raios X) uma forma de prevenção extremamente efetiva contra a DECHT que é uma Reação Transfusional (RT) tardia, grave e rara, mas extremamente fatal, ou seja, a doença pode se desenvolver uma a duas semanas após a transfusão, é grave pois provoca disfunção hepática, diarreia e aplasia da medula óssea (ASAI et al., 2000). A mortalidade é muito alta entre 90% a 100% dos casos (LANDI; OLIVEIRA, 1999). Em 1965, a DECHT foi reconhecida nos seres humanos após a transfusão de sangue fresco em crianças imunodeficientes, pacientes com câncer, pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, crianças que receberam transfusão intra-útero e em pacientes considerados imunocompetentes, sendo as manifestações dessa RT: febre, erupção cutânea, doença hepática, diarreia e pancitopenia (LANDI; OLIVEIRA, 1999; ASAI et al., 2000; PODGORSK, 2005; BASHIR et al., 2011; CHAPMAN et al., 1996).

A irradiação do sangue causa alguns danos biológicos, afetando o ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. Ao sofrer a ação direta da radiação ionizante é possível causar dois tipos de danos: mutações genéticas e quebras da molécula. As quebras no DNA prejudicam o processo de duplicação e impedem que as células se reproduzam (NOUAILHETAS et al., 2008). No sangue, a célula que mais sofre o efeito da irradiação é a célula nucleada chamada linfócito. As hemácias podem sofrer hemólise, liberação de potássio do meio intracelular para o plasma, deformabilidade e diminuição da sua viabilidade (REVERBERI et al., 2007; ERKAL et al., 2009; PINTO, 2008; BARRBOSA, 2008).

A irradiação de sangue é a única forma segura e eficaz de se prevenir o surgimento

da DECHT no sangue a ser transfundido, pois inativa o linfócito do doador, evitando sua proliferação no paciente transfundido (LANDI; OLIVEIRA, 1999). No Brasil, segundo relatórios da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR), 2015), desde 2007 até os dias atuais, não constam ocorrências da DECHT. No Reino Unido, de acordo com o Annual SHOT Report de 2011, nenhum caso dessa RT foi registrado no período de 2001 a 2011 (BOLTON-MAGGS, 2012). No Japão, país considerado de alta prevalência para essa RT, nenhum caso ocorreu desde 2000, segundo dados de 2008, publicados pela Safety Vigilance Division (Japanese Red Cross Society, 2013). O controle para esta RT foi atribuída ao início da irradiação de hemocomponentes entre 1998 e 1999, e assim, com esses relatórios, fica demonstrado a importância da irradiação de sangue (OLIVO et al., 2015).

Para irradiação de sangue são utilizados irradiadores constituídos de fontes de ^{137}Cs ou de ^{60}Co , com atividade variando entre 600 a 2400 Ci (Curie). Os irradiadores podem apresentar um sistema constituído por um recipiente chamado canister ou caçapa, um rotor e blindagem com abertura e fechamento de forma segura aos operadores. Para este sistema, é necessário a presença de um físico médico e supervisor de radioproteção no setor, para que se tenha um controle dosimétrico da irradiação. O aparelho deve estar calibrado para fornecer 25 Gy (Gray) no plano médio da bolsa a ser irradiada, dose necessária para inativar os linfócitos do sangue (Brasil, 2016). Na falta do irradiador específico de sangue sugere-se o uso de um Acelerador Linear (AL) por ser um sistema de menor custo (Brasil, 2016; DODD; VETTER, 2009).

Como existem diversos modelos de AL, com diferentes energias e diversas taxas de dose possíveis a serem aplicadas na irradiação de sangue, é interessante estudar os possíveis danos ocorridos nas células, com o uso de diferentes taxas de dose, e avaliar a melhor forma de se garantir um sangue com melhor qualidade, possibilitando assim, uma maior sobrevida aos pacientes transfundidos, pois, a irradiação de sangue aumenta os danos às células, sendo umas mais radiosensíveis do que outras (HALL; GIACCIA, 2002) .

O equipamento Gammacell 1000 (aparelho de irradiação de sangue), utilizado neste trabalho, está em funcionamento desde 1986, ele é constituído de uma fonte de ^{137}Cs , 1158 Curies, sendo a taxa de dose de 448 cGy/min. O tempo de 6,3 minutos foi calculado, pelo físico médico responsável, para a irradiação das hemácias afim de fornecer 25 Gy no plano médio da bolsa. O Instituto de Oncologia e Radioterapia de Curitiba (RADION) possui um Acelerador Linear da marca Elektra Sinergy Full 7.7 Multileaf

Agility, com duas diferentes energias nominais de fótons de Raios X (6,0 MV e 10,0MV). O campo de radiação máximo no AL é de 40,0 cm X 40,0 cm e distância de isocentro de 1 m.

Este trabalho visa utilizar diferentes taxas de dose na irradiação de hemácias para se verificar a eritose e concentração de potássio extracelular nas amostras de sangue. A irradiação de sangue inativa os linfócitos, mas é pouco sabido a respeito do quanto a irradiação afeta as outras estruturas celulares com o uso de diferentes taxas de dose. Portanto, é importante saber a qualidade do sangue que está sendo oferecido para transfusão, pois proverá uma melhor sobrevida ao paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a resposta das hemácias ao serem submetidas à diferentes taxas de dose de irradiação, porém com a mesma dose total de 25 Gy.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo deste trabalho foi atingido de forma gradativa ao se concluir cada um dos objetivos específicos abaixo:

- irradiação das bolsas de concentrados de hemácias (CH) (135cGy/min, 456 cGy/min e 545 cGy/min) no Acelerador Linear e 448 cGy/min no Gammacell 1000, com dose total de 25Gy;
- determinação da concentração de potássio extracelular para cada taxa de dose utilizada, no dia da irradiação e a cada 7 dias até o 28º dia;
- análises de eriptose (morte das hemácias) através da citometria de fluxo, no dia da irradiação e a cada 7 dias até o 28º dia;
- correlação estatística entre as informações sobre concentração extracelular de potássio, eriptose das hemácias durante o período e as taxas de dose.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A irradiação de sangue, atualmente, é a única forma de se prevenir a Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional, pois esse procedimento inativa o linfócito que desencadeia essa doença. A DECHT é uma reação transfusional rara, mas extremamente fatal, com mortalidade entre 90% a 100% dos casos (LANDI; OLIVEIRA, 1999). A irradiação não danifica apenas o linfócito, mas também outras células sanguíneas são afetadas, e a proporção desse dano vai depender da maneira como essa irradiação vai ser realizada, ou seja, vai depender da dose, taxa de dose, fracionamento, tipo de célula irradiada (HALL; GIACCIA, 2002; AMÂNCIO, 1998). Dessa forma, é importante utilizar parâmetros de irradiação que a danifique menos as estruturas celulares do sangue, para que possa ser oferecido um sangue de melhor qualidade, oferecendo ao paciente uma melhor sobrevida (MENDONÇA et al., 2013).

3.1 O SANGUE

O sangue é formado por glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos) imersos em um líquido chamado de plasma. O plasma é formado por água, sais minerais, vitaminas, proteínas, glicídios e lipídios. O volume sanguíneo no homem varia de 3600 a 5800 mL e na mulher varia de 2900 a 4400 mL (VERRASTRO et al., 2005).

3.1.1 Hemácias

As hemácias são células que não apresentam núcleo, são constituídas de membrana plasmática e citoplasma. Os eritrócitos sofrem maturação através de um processo denominado eritropoiese, na medula óssea, perdendo organelos, ribossomas e o núcleo que é responsável por todas as funções celulares (SKUTELSKY, 1970). O tempo de vida no organismo é de 120 dias e tem como principal função o transporte de oxigênio e o gás carbônico no organismo. A hemoglobina, que dá a pigmentação vermelha ao sangue, constitui 95% das proteínas das hemácias, e é a responsável por essas funções. A quantidade de hemácias variam, em homens, de 4,5 a 6,5 milhões por μL , e de 3,9 a 5,6 milhões por μL em mulheres (ZAGO et al., 2013).

A hemácia tem a forma de um disco bicôncavo, quando vista por sua lateral, e

uma forma circular regular, quando vista numa lâmina de frente, como mostra a figura 1 (ZAGO et al., 2013).

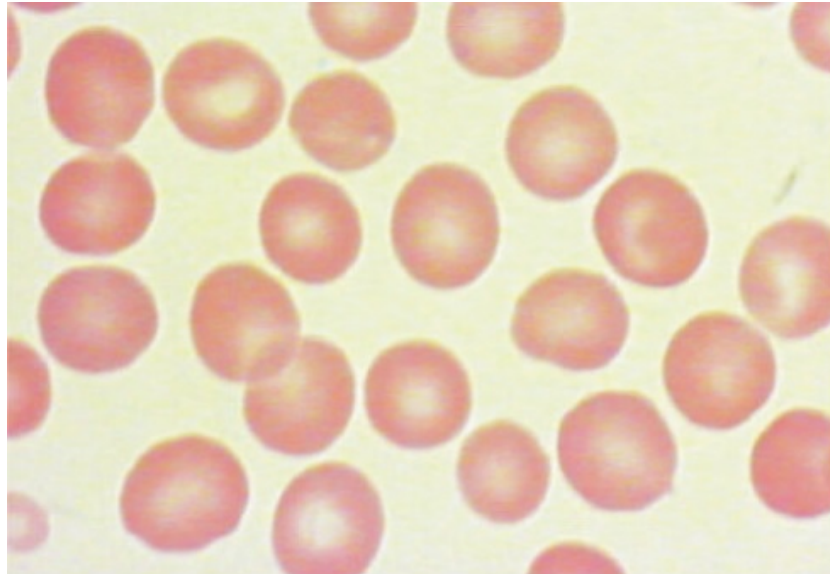


Figura 1 – Hemácias normais - Possuem o formato de um disco bicôncavo.

Fonte: (ZAGO et al., 2013).

As hemácias por serem células anucleadas e não estarem em constante reprodução, como os leucócitos, acabam sendo mais radorresistentes (ERKAL et al., 2009). A irradiação torna seu tempo de vida mais curto e ocorre a hemólise, liberação do potássio extracelular, deformabilidade além de diminuição da viabilidade (REVERBERI et al., 2007).

3.1.1.1 Membrana Eritrocitária

A membrana plasmática engloba e define os limites eritrocitários, mantém as diferenças essenciais do meio intra e extracelular. A composição da membrana de uma hemácia é de 39,5% de proteínas, 35,1 % de lipídeos e 5,8% de carboidratos e é formada por uma bicamada lipídica, responsável pela estrutura fluida e serve como barreira impermeável às moléculas hidrossolúveis. A membrana atua no transporte de moléculas específicas e também ligando estruturas que conectam o citoesqueleto, tanto à matriz celular quanto às células adjacentes, servindo como receptores para detectar e e realizar a transdução do sinal (OLIVEIRA et al., 2013).

A estrutura bilaminar da membrana é chamada de fosfolipídio. As proteínas da membrana são aquelas que se estendem da superfície externa e atravessam toda a

membrana até a parte interna do eritrócito. Na parte abaixo da camada bilipídica existem as chamadas proteínas periféricas, formando o cito-esqueleto eritrocitário. A composição química normal, a disposição das estruturas e interações moleculares são importantes para a sobrevivência da hemácia no período de 120 dias, e possui importante papel na capacidade da deformação e permeabilidade da célula (HARMENING, 2006).

A membrana do eritrócito é permeável a água e aos ânions e impermeável aos cátions, com meia-vida de troca de sódio (Na^+) e potássio (K^+) de 30 horas. O eritrócito mantém seu volume através do controle das concentrações de dentro da célula de sódio e potássio. Essa regulação é feita através de bombas de cátions que transportam o sódio para fora e o potássio para dentro da célula. Essas propriedades de permeabilidade celular servem para evitar a morte celular e controlar o volume eritrocitário. Sendo que qualquer anormalidade ocorrida na membrana pode levar a diminuição da sobrevivência dos glóbulos vermelhos do sangue (HARMENING, 2006).

A medida que o tempo de armazenamento das hemácias aumenta, sua viabilidade diminui. Isto ocorre devido a "lesão de armazenamento" devido a alguns fatores como: aumento de pH, aumento de ácido láctico, diminuição do consumo de glicose, redução nos níveis de ATP, entre outros. Sendo que a viabilidade se deve ao nível de ATP do eritrócito e das condições de integridade da membrana (QU; TRIULZI, 2015).

A eriptose é uma das formas de se medir as alterações na membrana (fosfatidilserina) que leva a avaliar o grau de morte celular, ou seja, a porcentagem de células mortas ou a processo de morte celular.

Os conservadores utilizados nas bolsas de sangue (ACD e o CPD) são utilizados para manter a viabilidade das células sanguíneas, mas em agosto de 1978, foi aprovado pela Food and Drug Administration, a adição da Adenina no composto formando o CPDA-1, que aumentou os níveis de ATP, dessa forma a viabilidade das hemácias aumentaram, podendo ser armazenadas por 35 dias (HARMENING, 2006).

3.1.2 Leucócitos

Os glóbulos brancos realizam a defesa do organismo e estruturam o sistema imunológico, são formados pelos: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Os neutrófilos são capazes de englobar partículas estranhas de dimensões pequenas como as bactérias, por exemplo. Os monócitos tem dimensões maiores e por isso tendem a combater partículas vivas ou inertes maiores. Os eosinófilos e basófilos atuam mais nas

reações alérgicas e imunológicas.

Os primeiros compostos de linfócitos, plasmócitos e os monócitos, possuem núcleo único e uniforme. Os últimos, por possuírem grânulos no citoplasma, são conhecidos como granulócitos e incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e possuem um núcleo multiforme e segmentado. Um dos leucócitos levados em consideração na irradiação de sangue é o linfócito T, sendo responsável pela Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional (DECHT). Os linfócitos são células pequenas em torno de 6 a 15 μm , tem formatos regulares e arredondados, conforme mostra a figura 2. Existem pelo menos três tipos de linfócitos: os linfócitos T, que correspondem de 65 a 80 %, linfócitos B e linfócitos NK (ZAGO et al., 2013).

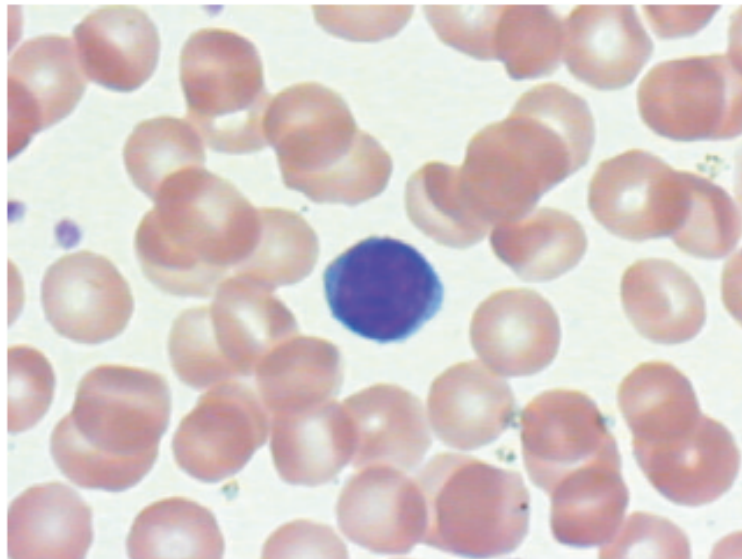


Figura 2 – Exemplo de leucócitos - Possuem formatos regulares e arredondados.
Fonte: (ZAGO et al., 2013).

3.2 MEDICINA TRANSFUSIONAL

A medicina transfusional atual utiliza um componente sanguíneo específico indicado para tratar uma deficiência apresentada pelo paciente, não mais o sangue total, podendo ser: concentrado de hemácias (CH), concentrado de plaquetas (CP), concentrado de granulócitos (CG) e o plasma (PL). Esta prática é possível desde 1960, devido ao uso de anticoagulantes como CPDA-1, a base de citrato de sódio (SAKUMA et al., 2011). Esses componentes sanguíneos são conhecidos como hemocomponentes e são obtidos através da centrifugação de uma unidade de Sangue Total (ST). A separação dos hemocomponentes

é obtida pelas diferenças de densidades e tamanhos das células sanguíneas. O tempo de validade para preservação do sangue total e dos concentrados de hemácias está relacionada com o tipo da solução anticoagulante e preservadora utilizada. O uso da solução de Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Fosfato de Sódio, Dextrose e Adenina (CPDA-1) permite uma conservação sanguínea por um período de até 35 dias. Enquanto que, a utilização do Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Dextrose (ACD), ou Ácido Cítrico, Citrato de Sódio, Fosfato de Sódio, Dextrose (CPD) ou Citrato, Fosfato e Dextrose-Dextrose (CP2D) permite tal conservação por até 21 dias. Caso sejam utilizados aditivos nas soluções, tais como SAG Manitol, a estabilidade do CH ficará maior se estendendo para 42 dias (SAKUMA et al., 2011).

Em escala industrial temos os hemoderivados, que são obtidos por processos físico-químicos através do fracionamento do plasma, tais como: albumina humana, imunoglobulina, fator VIII e fator IX (VERRASTRO et al., 2005).

3.3 PREPARAÇÃO DO SANGUE

O sangue é dividido em hemocomponentes e hemoderivados. Hemocomponente é o produto obtido da centrifugação do sangue total. A separação dos componentes sanguíneos ocorre devido a diferença de densidades e tamanho das células, sendo eles: os concentrados de hemácias, concentrados de plaquetas, crioprecipitado e o plasma fresco congelado. Hemoderivado é o produto do fracionamento do plasma através de processos físico-químicos sendo produzidos industrialmente, são eles: albumina humana, imunoglobulina endovenosa sérica, fator VIII liofilizado e fator IX liofilizado (SAKUMA et al., 2011).

Para se obter cada componente sanguíneo é realizado um procedimento específico, os concentrados de hemácias são obtidos pela remoção de parte do plasma através da centrifugação do sangue total, após este processo eles devem ser armazenados a uma temperatura de 2°C a 6°C e sua validade varia de 21 a 42 dias dependendo da solução conservadora utilizada. Este hemocomponente pode receber diferentes tratamentos dependendo da necessidade do paciente e servem para tratar ou prevenir a falta de liberação de oxigênio aos tecidos, como no caso de pacientes com hemorragias agudas ou anemia. Alguns casos necessitam que o sangue a ser transfundido seja irradiado, para se evitar a DECHT (Brasil. Ministério da Saúde, 2010).

3.3.1 Sangue Total

O sangue total é coletado de um doador de sangue em bolsas plásticas e estéreis contendo uma solução de preservadora anticoagulante. As soluções utilizadas são: CPDA-1, ACD, CPD, CP2D e solução aditiva SAG-Manitol (Soro fisiológico, Adenina, Glicose e Manitol). A tabela 1 mostra a data de validade da bolsa de sangue conforme solução utilizada e a figura 3 demonstra como é o processo de preparação dos hemocomponentes e hemoderivados do sangue.

Tabela 1 – TEMPO DE VALIDADE DA BOLSA DE SANGUE

Solução	Tempo de validade
CPDA-1	35 dias
CPD	21 dias
CP2D	21 dias
SAG-M	42 dias

Fonte: (Brasil. Ministério da Saúde, 2010).

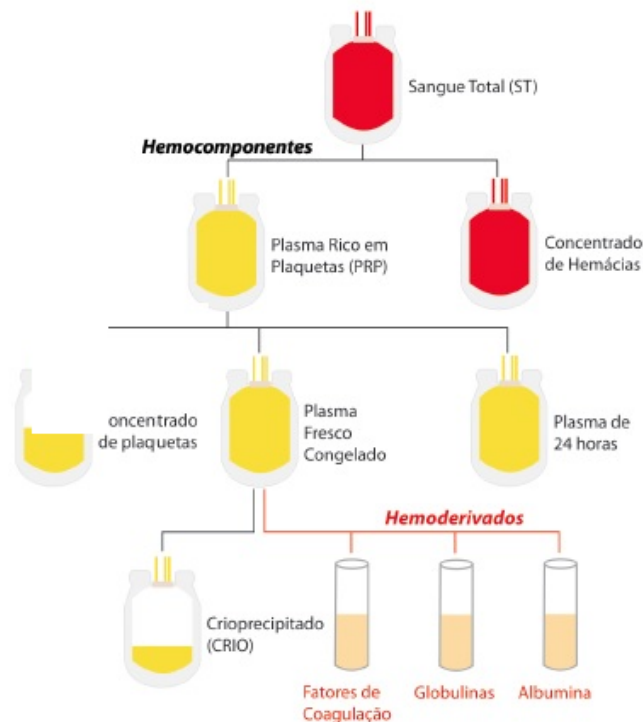


Figura 3 – Preparação dos Hemocomponentes - Esquema descritivo de como é o processo de preparação dos hemocomponentes e hemoderivados do sangue.

Fonte: (SAKUMA et al., 2011).

3.3.2 Concentrado de Hemácias

Para se obter o CH, é necessária a centrifugação da bolsa de ST para separá-la em camadas distintas: as hemácias e o plasma rico em plaquetas. As hemácias se depositam no fundo, plaquetas e leucócitos no meio e o plasma rico em plaquetas fica na parte superior da bolsa (Brasil. Ministério da Saúde, 2010), conforme mostrado na figura 4.

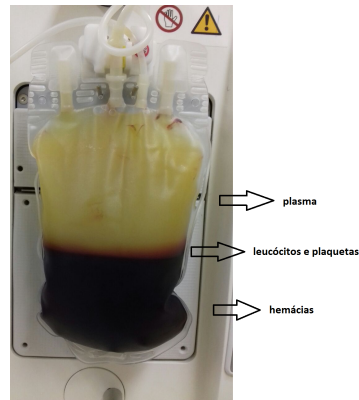


Figura 4 – Sangue total centrifugado - O CH fica no fundo da bolsa e o PL na parte superior.

Fonte: A autora.

O concentrado de hemácias é produzido através da remoção de parte desse plasma através do extrator de plasma automático, conforme mostra a figura 5.



Figura 5 – Extrator automático de plasma - Plasma rico em plaquetas é removido da bolsa.

Fonte: A autora.

Dessa forma o CH permanece na bolsa original e o plasma rico em plaquetas é removido para uma bolsa satélite, conforme figura 6.

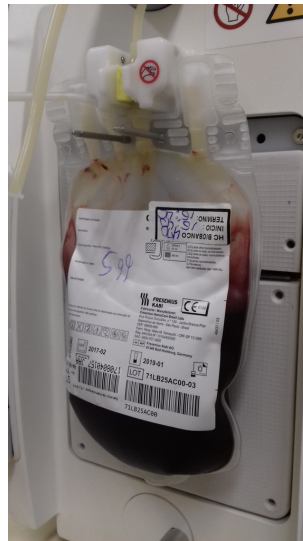


Figura 6 – Concentrado de hemácias - As hemácias permanecem na bolsa original.
Fonte: A autora.

A bolsa de CH deve ser armazenada em geladeira, na temperatura entre 4°C a 6°C, e a data de validade varia conforme a solução anticoagulante preservadora utilizada (Brasil, 2016).

A transfusão de CH serve para o tratamento ou prevenção da falta de oxigenação dos tecidos. Alguns casos de anemia e hemorragias agudas são exemplos de casos que necessitam dessa transfusão (Brasil. Ministério da Saúde, 2010).

3.4 REAÇÕES TRANSFUSIONAIS - RT

Uma reação transfusional é definida como tudo aquilo que ocorre de forma indesejável, durante ou após, uma transfusão de sangue ou de seus componentes. As reações são divididas em reações agudas não imunológicas (sobrecarga circulatória, reações hemolíticas, alterações metabólicas e contaminação bacteriana), reações agudas imunológicas (reação hemolítica aguda, reação febril não hemolítica, edema pulmonar não cardiogênico, reação alérgica e anafilática), reações tardias não imunológicas (doenças transmissíveis por vírus, doenças transmissíveis por espiroquetas, doenças transmissíveis por protozoários) e reações tardias imunológicas (reação hemolítica tardia, púrpura pós-transfusional, reação do enxerto contra hospedeiro transfusional) (VERRASTRO et al., 2005).

3.4.1 Reações Agudas Não Imunológicas

3.4.1.1 Alterações Metabólicas

As principais alterações que ocorrem no sangue armazenado referem-se ao potássio e ao citrato. Deve-se precaver pacientes com problemas nefrológicos e hipercalêmicos. Pois, com o armazenamento das bolsas, estes metabólicos tendem a aumentar a concentração de potássio, sendo que a irradiação tende a aumentar ainda mais estes níveis. Com relação ao citrato que atua como anticoagulante deve-se cuidar com pacientes que recebem transfusões maciças (acima de 100 mL de sangue total/min) podendo provocar tremores musculares, náuseas, vômitos e alterações cardíacas (VERRASTRO et al., 2005).

3.4.2 Reações Tardia Imunológica

3.4.2.1 Doença do Enxerto contra Hospedeiro Transfusional - DECHT

Para se entender sobre a DECHT, primeiramente, precisamos entender um pouco sobre o sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA), que é um sistema de histocompatibilidade em nosso organismo. Os loci genéticos envolvidos na rejeição de órgãos e tecidos estranhos são conhecidos como o principal complexo de histocompatibilidade (MHC), moléculas de superfície celular altamente polimórficas são codificadas pelo MHC. O MHC humano é chamado de sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano) porque esses antígenos foram inicialmente identificados e caracterizados usando aloanticorpos contra leucócitos (TERASAKI, 1990). O papel biológico primário das moléculas de HLA está na regulação da resposta imune, ajudando o sistema imunológico a distinguir as proteínas do próprio corpo das proteínas produzidas corpos estranhos, como vírus e bactérias (BJORKMAN et al., 1987). Zinkernagel e Dougherty demonstraram em 1974 que os linfócitos T devem ter as mesmas moléculas do MHC que a célula apresentadora de antígenos para induzir a resposta imune (ZINKERNAGEL et al., 1974). A compatibilidade do HLA entre doador e receptor e, especificamente, a homozigose de um doador para um haplótipo HLA no qual o receptor é heterozigoto é uma provável explicação para os casos de DECH transfusional nos casos envolvendo doadores aparentados (SHIVDASANI et al., 1993; VOGELSANG, 1990; ANDERSON; WEINSTEIN, 1990; PERKINS, 1992). Por isso, recomenda-se irradiar componentes sanguíneos de doadores aparentados ou HLA compatíveis

antes das transfusões (SHIVDASANI et al., 1993; VOGELSANG, 1990; ANDERSON; WEINSTEIN, 1990; PERKINS, 1992).

De acordo com (LANDI; OLIVEIRA, 1999; Brasil, 2016), para se evitar essa reação transfusional deve-se irradiar o sangue nas seguintes indicações:

- transfusão entre familiares, pois o sistema HLA pode não reconhecer o linfócito como estranho e desenvolver a DECHT;
- pacientes de transplante de medula óssea;
- transplante de órgãos sólidos;
- pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS);
- portadores da doença de Hodgkin (câncer do sistema linfático);
- doenças neoplásicas;
- transfusões intra-útero;
- cirurgia cardíaca, entre outros.

A doença do enxerto contra hospedeiro transfusional foi reconhecida em 1965 em humanos, após transfusão de sangue em crianças (AZEVEDO, 2010). Essa doença pode se desenvolver em transplantes de medula óssea, transplantes de órgãos sólidos que contenham muito tecido linfoide e em transfusões de hemocomponentes. Tem como sintomas característicos: febre, erupções na pele, vômitos, diarreia, perda de apetite e disfunção hepática. O diagnóstico da DECH é obtido pelo quadro clínico associado ao exame de biópsia da pele. O tratamento mais empregado é o uso de corticoesteroides em altas doses, mas não é totalmente eficaz. A resposta ao tratamento é muito baixo e a mortalidade alta (LANDI; OLIVEIRA, 1999; VASSELAI, 2008; BASHIR et al., 2011; AZEVEDO, 2010).

Quando a doença é desenvolvida pela transfusão é chamada Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional e nesse caso ocorre a hipoplasia ou aplasia da medula óssea seguido da ocorrência da diminuição dos elementos do sangue (pancitopenia) causando baixa resposta à tratamentos e alta mortalidade (90 a 100%) (LANDI; OLIVEIRA, 1999; CHAPMAN et al., 1996).

Portanto, a única forma segura de se prevenir a doença é através da irradiação dos hemocomponentes, por raios X ou raios gama, afim de inativar os linfócitos T, pois a

radiação danifica o DNA desses linfócitos, que são extremamente radiosensíveis, evitando assim que eles se reproduzam e repliquem no organismo do receptor do sangue (LANDI; OLIVEIRA, 1999; VASSELAI, 2008; BASHIR et al., 2011; AZEVEDO, 2010).

3.5 POTÁSSIO EXTRACELULAR

O potássio é um importante regulador dos fluidos corporais e está presente na atuação dos impulsos nervosos e contrações musculares. Os níveis de potássio são importantes, pois influenciam na pressão de nosso organismo (PINTO, 2008). Cerca de 95% do potássio existente no corpo humano se encontra no meio intracelular, e o mecanismo que regula a quantidade de sódio fora das células e a de potássio para dentro é chamada bomba de sódio/potássio. Um dos fatores que podem reduzir os níveis do potássio plasmático é a hipotermia causando a alcalose metabólica, assim como a utilização de diuréticos causa grande eliminação de líquidos e de eletrólitos, principalmente o potássio. A concentração elevada de potássio, acima de 6 mEq/l, pode produzir bradicardia ou bloqueio atrioventricular e dificultar a saída de perfusão. Estas alterações da frequência cardíaca são tratadas pelo emprego do marca-passo externo temporário. A hiperpotassemia (hipercalemia) pode produzir bradicardia e/ou bloqueio átrio-ventricular. A hipocalemia ou baixa de potássio no organismo pode predispor ao desenvolvimento de arritmias atriais e ventriculares e deve ser tratada. Por isso a importância da concentração de potássio em nosso organismo estar sempre equilibrada (SOUZA; ELIAS, 2006; WINTER et al., 2015).

3.6 IRRADIAÇÃO DE SANGUE

O artigo 114 da Portaria n.158 de 4 de fevereiro de 2016 (Brasil, 2016) que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos cita que a irradiação de sangue deve ser realizada através de irradiador específico de sangue, podendo ser utilizado acelerador linear. A dose estipulada é de 25 Gy (2500 cGy) no plano médio da bolsa. A dose recebida na bolsa irradiada não deve ser menor que 15 Gy nem maior que 50 Gy, em qualquer ponto da bolsa. Com essa dose, inativa-se o linfócito prevenindo assim a DECHT. Toda bolsa após ter passado pelo processo de irradiação deve ser validada e rotulada como irradiada. Devido a lesão de membrana o sangue deve ser produzido (CH, CP, PL) até 14 dias após coleta e armazenado até no máximo 28 dias após procedimento de irradiação. Caso exista necessidade justificada para utilização do sangue com mais de

14 dias de produção, deve ser utilizado dentro de 48 horas. Para o uso de transfusões intrauterinas e para neonatos nas transfusões maciças deve ser utilizado bolsas até 24 horas da irradiação e 5 dias da coleta. Os concentrados de plaquetas e granulócitos mantêm suas datas de validade após a irradiação (Brasil, 2016).

3.7 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

Radiação ionizante é qualquer radiação que pode remover elétrons de átomos e moléculas.

Os raios X são radiações eletromagnéticas que se originam de desexcitações do núcleo do átomo (raios X característicos) ou através da desaceleração das partículas carregadas (efeito Bremsstrahlung). Raios gama ocorrem quando a radiação se origina da desexcitação nuclear ou fótons de aniquilação quando originados na aniquilação de partícula e anti-partícula (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

A probabilidade para que aconteça, ou não, uma interação da radiação que inclui o raio X e a radiação gama com a matéria depende da energia do fóton e do número atômico Z do meio atenuador (PODGORSAK, 2005). Nas baixas energias é mais provável ocorrer os efeitos coerentes e fotoelétricos (BERG et al., 2016).

3.8 ESPALHAMENTO COERENTE

Espalhamento coerente é a absorção ou re emissão da radiação pelo átomo e a direção de espalhamento é diferente (YOSHIMURA, 2009). Geralmente, o ângulo médio de espalhamento diminui à medida que a energia dos raios X aumenta. Esta interação ocorre principalmente com raios X de baixa energia, como as utilizadas em mamografia (de 15 a 30 keV). Na imagiologia médica, no tecido mole, o espalhamento de Rayleigh, ou coerente, é responsável por menos de 5% das interações de raios X acima de 70 keV e, no máximo, representa apenas 10% das interações a 30 keV (BERG et al., 2016).

3.9 EFEITO FOTOELÉTRICO

No efeito fotoelétrico, um fóton é totalmente absorvido por um átomo e no seu lugar, um fotoelétron rápido é ejetado do átomo. A interação não pode ocorrer com elétrons livres, uma vez que um elétron livre não pode absorver um fóton sem o momento

não seja conservado (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).

O efeito fotoelétrico é predominante em baixas energias e para elementos químicos de números atômicos (Z) elevados. A probabilidade de ocorrência aumenta com Z^4 e decresce com o aumento da energia (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).

A interação cria um íon excitado no material absorvedor com uma vacância em uma de suas camadas, que em geral, é rapidamente preenchida com a captura de um elétron livre do meio e/ou por rearranjo de outros elétrons do átomo. Dessa forma, podem ser produzidos um ou mais fótons de raios X característicos. Na maioria dos casos, os fótons de raios X são reabsorvidos pelo meio (KNOLL, 2000).

A probabilidade de produzir um fotoelétron quando atinge um átomo é fortemente dependente de número atômico (Z) e da energia dos fótons. É mais provável ocorrer com elétrons de camadas internas, com elétrons fortemente ligados ao núcleo ou quando a energia do fóton incidente é superior à energia de ligação eletrônica (YOSHIMURA, 2009).

3.10 EFEITO COMPTON

O efeito Compton representa a interação entre um fóton com um elétron orbital essencialmente "livre e estacionário". A energia do fóton incidente é muito maior que a energia de ligação do elétron orbital. O fóton perde parte de sua energia para o elétron (Compton) e é espalhado através de um ângulo de dispersão (PODGORSAK, 2005).

Este efeito é predominante de raios X e gama na faixa de energia diagnóstica acima de 26 keV em tecidos moles e para além das energias de diagnóstico para aproximadamente 30 MeV. É mais provável de ocorrer entre fótons e elétrons externos (da camada de valência), o elétron é ejetado do átomo e o fóton espalhado perde energia, como o momento e a energia das interações devem ser conservados a energia do fóton incidente (E_0) é igual a soma da energia do fóton espalhado (E_{SC}) e da energia cinética do elétron ejetado (E_{e^-}) (YOSHIMURA, 2009).

3.11 PRODUÇÃO DE PARES

A produção de par elétron-pósitron é uma das formas predominantes de absorção da radiação eletromagnética de alta energia. Este efeito ocorre quando fótons de energia (superior a 1,022 MeV) passam perto de núcleos de número atômico elevado, interagindo com o forte campo elétrico nuclear. Nesta interação, a radiação desaparece e dá origem a um par elétron-pósitron. As duas partículas transferem a sua energia cinética para o meio material, sendo que o pósitron volta a se combinar com um elétron do meio e dá origem a 2 fótons, cada um com energia de 511 keV (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).

3.12 REAÇÕES FOTONUCLEARES

Reações fotonucleares ocorrem quando o núcleo absorve o fóton com energia maior que a energia de ligação de nucleons, liberando um próton ou um nêutron com energia cinética suficiente para ser ejetado do núcleo e formar outro elemento nuclear (YOSHIMURA, 2009).

A probabilidade de ocorrência de reações fotonucleares é da ordem de magnitude menor que as probabilidades combinadas do efeito Fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. O limiar para uma reação fotonuclear particular depende da reação e do núcleo. A energia para esse processo é da ordem de 10 MeV ou superior para a maioria dos núcleos, exceto para os núcleos atômicos do deutério (^2H) e do berílio (^9Be), nos quais o limiar é da ordem de 2 MeV (PODGORSAK, 2005).

3.13 PRODUÇÃO DE RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA IONIZANTE

3.13.1 Raios X

Foi o físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen quem detectou pela primeira vez os raios X, estudando o fenômeno da luminescência produzida por raios catódicos num tubo de Crookes. Através de várias experiências, ele conseguiu uma foto que revelou a estrutura óssea interna da mão humana, sendo então a primeira radiografia da história em 8 de novembro de 1895 (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Somente em 1912, Max Von Laue, estabeleceu que o raios X é uma onda eletromagnética de comprimento de onda muito menor que o da luz. Em 1920, descobriu-

se que os raios gama e raios X são de igual natureza física, isto é, os dois são ondas eletromagnéticas de frequência maior que a radiação ultravioleta e se diferem apenas na origem: os raios X originam-se fora do núcleo dos átomos, enquanto os raios gama originam-se no núcleo e da aniquilação de partículas (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

A produção de raios X ocorre quando elétrons produzidos pelo aquecimento do filamento (catodo) são acelerados, devido a diferença de potencial elétrico existente entre um catodo e o anodo, e atingem o alvo metálico (anodo)(OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Os raios X são radiações eletromagnéticas de alta energia originadas de transições eletrônicas de níveis e subníveis mais internos no átomo, podendo ser de dois tipos: por captura ou expulsão de elétrons da camada interna pelo radionuclídeo, gerando um orbital vazio e quando é preenchido por um elétron de uma camada mais externa gera uma diferença de energia entre os orbitais que é emitida na forma de raios X ou por freamento (LIMA et al., 2009).

Os raios X de freamento são produzidos por interações de partículas carregadas (preferencialmente elétrons) com o campo elétrico de núcleos ou com a eletrosfera de átomos de elevado número atômico. Com a interação, ocorre redução da energia cinética e mudança da trajetória, e a diferença de energia produzida é emitida na forma de raios X (LIMA et al., 2009).

3.13.2 Radioisótopos

Radioisótopos são isótopos radioativos que apresentam um núcleo atômico instável e se transforma num isótopo estável quando emite energia podendo ser: alfa, beta ou gama. A maioria dos radioisótopos utilizados na medicina atual são produzidos em reatores de fissão ou aceleradores ciclotrons. O radioisótopo utilizado neste trabalho foi o Césio 137, que tem uma meia vida física de 30 anos. Ter uma meia vida de 30 anos significa que passado 30 anos o número de radionuclídeos será metade, e passado mais 30 anos será de um quarto do que existia originalmente (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

3.13.3 Desintegração

Em 1900, foi identificado um novo tipo de radiação por Paul Villard e em três anos depois, Rutherford a nomeou como radiação gama, que não sofre deflexão com o campo magnético. Rutherford estabeleceu também que a radiação gama é da mesma natureza que os raios X (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

A equação (1) mostra o decaimento radioativo:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (1)$$

sendo N o número de núcleos radioativos remanescentes após um tempo t , N_0 o número de núcleos radioativos, na amostra em um tempo $t = 0$ e λ a constante de desintegração.

A equação (2) do tempo de meia vida, é o tempo necessário para que a atividade e o número de núcleos radioativos caiam para metade do seu valor inicial:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\lambda}. \quad (2)$$

3.13.4 Decaimento gama

O decaimento gama ocorre quando há emissão de um fóton (gama) pelo núcleo excitado após decaimento alfa ou beta. Sua energia será a diferença entre os dois níveis de energia nuclear. A reação típica do decaimento gama é mostrada na equação (3):



sendo \star o núcleo no seu estado excitado.

O decaimento do Ce^{137} pode ser via β_2^- para o estado do ${}_{56}\text{Ba}^{137}$ fundamental, mas também pode decair por via β_1^- para o estado de ${}_{56}\text{Ba}^{137m}$ excitado para depois decair com emissão de um raio gama para o estado fundamental (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

3.14 GRANDEZAS FÍSICAS

Com o surgimento das radiações ionizantes apareceram os métodos de produção, caracterização e medição da radiação, bem como de definição de grandezas que expressassem a sua interação com o tecido humano com o objetivo de estabelecer a correlação dos valores de tais grandezas, entre si e com os riscos de detrimento. Muitas grandezas diferentes possuem a mesma unidade. Por exemplo, a Dose Absorvida e o Kerma são medidos em gray (Gy), a Dose Equivalente, Dose Efetiva são avaliadas em sievert (Sv). Isto se deve ao fato das diferenças entre elas serem constituídas por fatores de conversão adimensionais, envolverem estimativas de exposições externas e internas ou avaliarem frações de energia absorvidas ou transferidas (D'ERRICO, 2006).

As principais grandezas a serem abordadas são: exposição, dose absorvida, dose

equivalente e kerma.

3.14.1 Exposição

Exposição é simbolizada por X e é definida apenas para fótons (raios X ou gama) interagindo no ar. É a medida da capacidade dos fótons ionizarem o ar. É dada pela equação (4):

$$X = \frac{dQ}{dm}, \quad (4)$$

onde dQ é o valor absoluto da carga total de íons de mesmo sinal produzidos no ar e dm é o volume de ar, ou seja, exposição é a carga elétrica liberada em um volume específico de ar dividido pela massa desse ar. Originalmente a unidade utilizada era o Roentgen, substituída atualmente no Sistema Internacional pelo C/Kg. Sendo 1 Roentgen é igual a $\frac{0,000258C}{k}$ (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

3.14.2 Dose absorvida

A dose absorvida está relacionada com a energia da radiação absorvida e por isso reflete nos danos biológicos. É definida pela equação (5):

$$D = \frac{dE_{ab}}{dm}, \quad (5)$$

onde D é a dose absorvida, dE_{ab} é a energia média depositada pela radiação e dm é o volume de massa. Originalmente a unidade utilizada era o rad, sendo $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ J/kg}$. Atualmente o rad foi substituído pelo Gray (Gy) no Sistema Internacional sendo $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J/kg}$ (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

3.14.3 Dose equivalente

A dose equivalente no tecido ou no órgão (H_T) é definida para qualquer tipo de radiação utilizada no tecido ou órgão.

É obtida através da dose absorvida média no tecido ou órgão exposto à radiação do tipo R, através da equação (6):

$$H_T = w_R \cdot D_T \cdot R. \quad (6)$$

Na equação w_R é o fator de ponderação da radiação R , que assume valor 1 para

fótons de todas as energias. Essa grandeza serve para limitar a exposição do cristalino, pele, mãos e para o cálculo de dose efetiva. Sua unidade no Sistema Internacional é o Sievert (Sv).

3.14.4 Kerma

O Kerma (Kinetic Energy Released per unit of MAss) é definido como a soma das energias cinéticas iniciais de todas partículas carregadas liberadas por radiação ionizante indireta, ou seja, por fótons e nêutrons dividida pela massa da amostra. É dada pela equação (7):

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}, \quad (7)$$

onde K é Kerma, dE_{tr} é a energia transferida ao meio e dm é o volume de massa. A unidade utilizada é o Gy (Joule/Kg).

Em baixas energias (valores menores que 1 MeV) o valor de Kerma é considerado muito próximo ao da dose absorvida (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

3.15 RADIOBIOLOGIA

A radiosensibilidade pode ser descrita como uma característica inerente, que está associada a um efeito decorrente da exposição à radiação ionizante pelo corpo humano. Através da observação dos efeitos danosos ocorridos nas pessoas expostas à irradiação ionizante, houve a correlação entre exposição à radiação e os efeitos biológicos que ele produz. Verificou-se que esses danos biológicos produzidos dependiam muito da quantidade, forma e tempo de exposição (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

A resposta no corpo humano ou células do corpo humano à radiação recebida vai depender se essa radiação foi recebida de forma única ou fracionada, ou periódica. Para uma certa quantidade de radiação, os efeitos biológicos serão mais danosos se for recebida de forma única ao invés de fracionada (HALL; GIACCIA, 2002).

3.15.1 Danos Celulares

O processo de ionização ao alterar os átomos, pode alterar a estrutura molecular. Se a energia de excitação for maior que a energia de ligação entre os átomos, pode ocorrer quebra das ligações químicas e conseqüentes mudanças moleculares. Se as moléculas

alteradas compõem uma célula, esta pode sofrer as consequências de suas alterações, direta ou indiretamente, com a produção de radicais livres, íons e elétrons. Os efeitos da radiação dependem da dose, taxa de dose, do fracionamento, do tipo de radiação, do tipo de célula ou tecido. Nem sempre as alterações são nocivas ao organismo humano. Se a substância alterada possui um papel fundamental para o funcionamento da célula, pode resultar na morte da célula. Em muitos órgãos e tecidos o processo de perda e reposição celular é normal. Quando a mudança tem caráter prejudicial, ela significa um dano (SCHONKEN, 1991).

3.15.2 Morte Celular

O DNA é o principal alvo para os efeitos biológicos da radiação, incluindo morte celular, carcinogênese e mutação. Portanto, é considerável verificar que os efeitos biológicos da radiação começa com o grau de ruptura no DNA causada pela radiação recebida.

A apoptose é derivada da palavra grega que significa “cair”, como em pétalas de flores ou folhas das árvores e foi descrita pela primeira vez por Kerr e colegas como um conjunto de mudanças no nível microscópico associado à morte celular (STEVENSON; KERR, 1967). Apoptose, ou morte celular programada, é comum no desenvolvimento embrionário em que alguns tecidos tornam-se obsoletos. Quando a dose de radiação é elevada, alto Gy, muitas células de tecido atingidas podem não suportarem e morrerem, após tentar se dividir. A perda de células em quantidade considerável, pode causar prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão. A severidade do dano caracteriza o denominado efeito determinístico. As células mais radiosensíveis são as integrantes do ovário, dos testículos, da medula óssea e do cristalino (SCHONKEN, 1991).

3.15.3 Efeitos Biológicos

As alterações químicas provocadas pela radiação podem afetar uma célula de várias maneiras, resultando em: morte prematura, impedimento ou retardo de divisão celular ou modificação permanente. Quando a quantidade de efeitos biológicos é pequena, o organismo pode se recuperar. Por exemplo, numa exposição à radiação X ou gama, pode ocorrer uma redução de leucócitos, hemácias e plaquetas e, após algumas semanas, a contagem destes elementos no sangue voltam ao normal (SCHONKEN, 1991).

Para o raio X ou gama a taxa de dose é um dos principais fatores que determina o

grau de dano biológico da dose recebida. Se a taxa de dose é baixa e com tempo longo de exposição, o efeito biológico da dose fornecida geralmente é reduzido (HALL; GIACCIA, 2002). O efeito clássico da taxa de dose, que é muito importante em radioterapia, resulta do reparo do dano sub letal que ocorre durante a longa exposição a radiação (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

3.15.4 Radiosensibilidade nos Tecidos

A influência da qualidade de radiação nos sistemas biológicos pode ser quantificada utilizando a Efetividade Biológica Relativa (RBE). A RBE é definida pela relação adimensional (8):

$$\text{RBE}(A) = \frac{\text{Dose}(\text{ref})}{\text{Dose}(\text{radA})}, \quad (8)$$

onde Dose(ref) é a dose da radiação de referência necessária para produzir um específico nível de resposta e Dose(radA) é a dose da radiação A necessária para produzir igual resposta.

Para superar possíveis indeterminações, utiliza-se a razão entre as inclinações das partes que podem ser consideradas lineares, das curvas de Dose x Efeito, para as radiações em estudo A e de referência. Esta razão poderá representar o valor máximo de RBE, ou seja, a RBEM.

A rigor, a RBE para uma determinada radiação não é somente dependente do LET, mas também da dose, da taxa de dose, do fracionamento da dose e até da idade da pessoa exposta. Seus valores dependem: da natureza e condição do material biológico, do estado fisiológico, temperatura, concentração de oxigênio, condições de nutrição e estágio do ciclo celular.

Os linfócitos são células muito radiosensíveis (LLOYD et al., 2001) e as hemácias podem sofrer hemólise, liberação do potássio extracelular, deformabilidade além de diminuição da viabilidade (REVERBERI et al., 2007). Em relação ao potássio, ocorre alteração na atividade de Na, K-ATPase, uma enzima presente na membrana plasmática responsável pelo balanço de potássio. Ocorre uma abertura dos canais de potássio por efeitos oxidativos da irradiação gama e por causa desses efeitos a validade do CH é reduzida para 28 dias após a irradiação, menos que os 35 dias de validade normal do CH padrão (OLIVO et al., 2015).

3.15.5 Transferência Linear de Energia

O conceito de transferência linear de energia (LET), provém da simplificação do Poder de Freamento de Colisão Linear, como sendo a perda média de energia, por colisão, de uma partícula carregada por unidade de comprimento. O poder de freamento (stopping power) expressa o efeito do meio material na partícula, enquanto que o LET expressa o efeito da partícula no meio, normalmente o tecido humano (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).

As radiações eletromagnéticas, como os raios X e gama, são radiações de baixo LET, ou seja, de baixa transferência linear de energia. LET é a quantidade de energia depositada ou transferida por unidade de comprimento do trajeto percorrido em um material absorvedor, é expresso por keV por micron de unidade de densidade (HALL; GIACCIA, 2002).

A taxa à qual a LET baixa (raios X ou gama) é administrada, afeta o grau de lesão biológica para diversos parâmetros biológicos, incluindo aberrações cromossômicas, falha reprodutiva e morte. Geralmente, altas taxas de dose produzem maior lesão biológica do que baixas taxas feito de taxa de dose (HALL; GIACCIA, 2002).

4 METODOLOGIA

4.1 CENÁRIO E PARTICIPANTES DA PESQUISA

Este trabalho foi realizado no Banco de Sangue e Radioterapia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no setor de Radioterapia da clínica RADION, na cidade de Curitiba, sendo utilizados concentrados de hemácias de 10 doadores voluntários de sangue do Biobanco do Hospital de Clínicas.

Os doadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o termo consta no Apêndice B, concordando em participar dessa pesquisa. Todos doadores estavam dentro das especificações do Ministério da Saúde para doar sangue e permitiram que o sangue doado, que não fosse utilizado para o experimento, como concentrado de plaquetas e o plasma, fossem utilizados na transfusão de pacientes.

Está instalado no HC, desde 1986, o irradiador específico de sangue modelo Gammacell 1000, dotado de fonte de Césio-137. No Apêndice C, consta o termo de autorização para divulgação de informações do HC. O físico médico responsável pelo setor, realizou as medidas e cálculos necessários ao trabalho e demonstrou através de relatórios, que constam no Apêndice D, que o equipamento estava operando com taxa de dose de 448 cGy/min, sendo necessário 6,3 minutos de exposição do material a ser irradiado, para se obter 25 Gy de dose de irradiação no plano médio da bolsa.

A irradiação com acelerador linear foi realizado na clínica Radion, em Curitiba, usando o modelo Elektra Sinergy Full 7.7 Multileaf Agility, com energia de fótons nominal de Raios X de 6,0 MV. A geometria utilizada na realização do experimento foi campo de irradiação 13,0 cm X 12,0 cm, com distância de isocentro de um metro.

No HC foram realizadas: a coleta de sangue total de voluntários através do Biobanco, a preparação dos concentrados de hemácias, o fracionamento das bolsas em capela de fluxo laminar vertical para totalizar as 30 bolsas necessárias para o trabalho, identificação e pesagem de cada bolsa fracionada, a realização da irradiação de 5 bolsas de CH com o Gammacell 1000, utilizando tempo de 6,3 minutos para atingir 25 Gy na taxa de 448 cGy/min.

No Instituto Radion foi realizado o planejamento da irradiação com um tomógrafo do modelo Siemens Emotion e irradiação de 5 bolsas de CH com taxa de 135 cGy/min, 5 bolsas de CH com taxa de 456 cGy/min e 5 bolsas de CH com taxa de 545 cGy/min na

dose de 25 Gy.

Depois de terminadas as irradiações, as amostras de sangue foram encaminhadas ao Núcleo de Tecnologia Celular, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para análise de eriptose através da citometria de fluxo e ao Laboratório de Análises Clínicas de Curitiba (LANAC) para análise de concentração de potássio extracelular através do ISE indereto (Eletrodo ÍON Seletivo).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas, sendo o número do parecer 2.595.160 aceito em 12 de abril de 2018. O parecer aceito pelo comitê de ética consta no anexo A.

4.3 COLETA DE DADOS

A tabela 2 mostra o cronograma utilizado no trabalho.

Tabela 2 – CRONOGRAMA DO PROJETO - Sendo G1 o primeiro grupo e G2 o segundo grupo de cinco voluntários.

DATA	GRUPOS	LOCAL IRRADIAÇÃO	ANÁLISES ERIPTOSE E POTÁSSIO	TOTAL AMOSTRAS ANALISADAS PUC	TOTAL AMOSTRAS ANALISADAS LANAC
SEMANA 1 (27 ABRIL)	G1	RADION E HC	DIA 1 G1	15	15
SEMANA 2 (4 MAIO)	G1 e G2	RADION	DIA 7 G1 DIA 1 G2	45	45
SEMANA 3 (11 MAIO)	G1 e G2	X	DIA 14 G1 DIA 7 G2	75	75
SEMANA 4 (18 MAIO)	G1 e G2	X	DIA 21 G1 DIA 14 G2	105	105
SEMANA 5 (25 MAIO)	G1 e G2	X	DIA 28 G1 DIA 21 G2	135	135
SEMANA 6 (1 JUNHO)	G2	X	CONCLUÍDO G1 DIA 28 G2	150	150

Fonte: A autora.

Após a aprovação do projeto pelo comitê de ética do HC, verificou-se que o estoque de sangue do Biobanco estava baixo e por esse motivo a coleta foi dividida em dois grupos (G1 e G2). No dia 26/04/2018, foram coletados os ST de cinco doadores voluntários (G1) e no dia 03/05/2018, dos outros cinco (G2). Após as coletas eram realizadas as preparações e fracionamento dos concentrado de hemácias no banco de sangue do HC

para totalizar 30 bolsas para o estudo. As irradiações foram realizadas no dia seguinte à coleta e as análises seguiram as datas conforme consta no cronograma.

4.3.1 Preparação e Fracionamento das Bolsas de Concentrados de Hemácias

Após a doação do sangue total, as bolsas ficaram em repouso por duas horas à temperatura de 20°C a 24°C. Passado este período, elas foram colocadas na centrífuga, conforme mostrado na figura 7 (A), sendo 7 (B) como foram distribuídas dentro do aparelho e 7 (C) a centrífuga utilizada. Após a centrifugação, a bolsa de sangue total ficou separada em camadas: os concentrados de hemácias no fundo da bolsa por serem mais pesadas, no meio a camada leucoplaquetária e em cima o plasma.

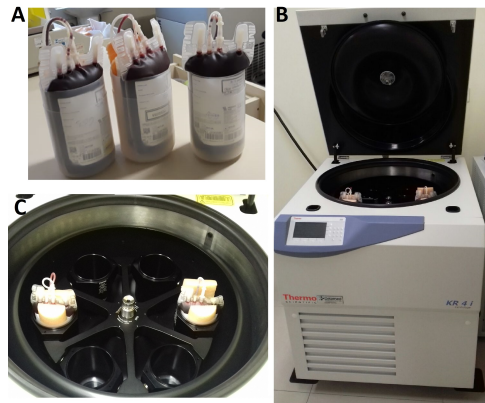


Figura 7 – Centrifugação da bolsa de sangue total - A figura (A) mostra as bolsas de ST no recipiente da centrífuga, sendo (B) a centrífuga e (C) disposição das bolsas.

Fonte: A autora.

As bolsas de sangue foram colocadas, em seguida, no extrator automático conforme figura 8 (A), em 8 (B) é demonstrado a extração do plasma para a bolsa satélite, separando o concentrado de hemácias do plasma rico em plaquetas conforme mostra a figura 8 (C), dessa forma o concentrado de hemácias permanece na bolsa original e o plasma rico em plaquetas vai para uma bolsa satélite para posterior centrifugação para se obter o plasma e o concentrado de plaquetas. Dessa forma, obtemos as bolsas de concentrados de hemácias para o estudo.

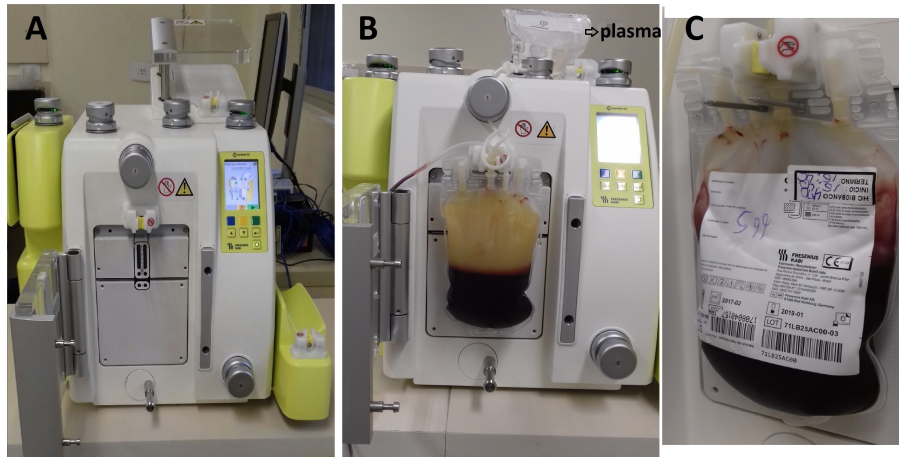


Figura 8 – Processo de extração do plasma - As bolsas de sangue foram colocadas no extrator automático conforme figura (A), em (B) é demonstrado a extração do plasma para a bolsa satélite, separando o concentrado de hemácias do plasma rico em plaquetas e na figura (C), mostra o concentrado de hemácias que permanece na bolsa original.

Fonte: A autora.

4.4 FRACIONAMENTO DAS BOLSAS DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS

Foram utilizadas bolsas de transferência neonatal, conforme mostra figura 9, para obtenção das 30 bolsas para o estudo.



Figura 9 – Bolsas de transferência neonatal - Bolsas de volume máximo de 100 mL utilizadas para dividir o conteúdo da bolsa de CH.

Fonte: A autora.

O procedimento foi realizado em ambiente estéril, com uso de luvas descartáveis, avental, e com uso do fluxo laminar vertical para se evitar contaminação do material.

O volume obtido no CH do doador foi distribuído em iguais volumes em outras três bolsas, ficando em média 80 mL de CH em cada bolsa de transferência, conforme

mostrado na figura 10. Cada bolsa de CH foi devidamente identificada de forma a conter informação da taxa de dose a ser utilizada e com os códigos numéricos correspondentes ao tubo de coleta.

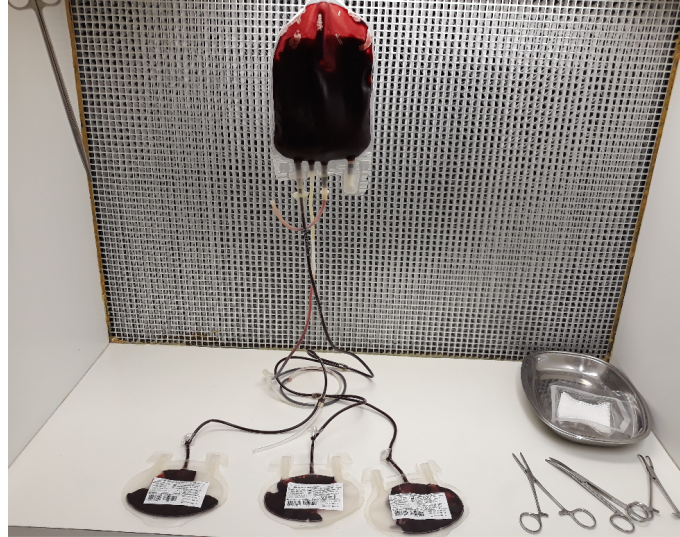


Figura 10 – Fracionamento de bolsas de concentrado de hemácias - Modo como foi realizado o fracionamento em capela de fluxo laminar vertical.

Fonte: A autora.

O fracionamento foi realizado em capela de fluxo laminar vertical, garantindo segurança na manipulação de material biológico, as bolsas foram fracionadas de forma a distribuir o mesmo volume de sangue, obtendo-se assim, as 30 bolsas para estudo, conforme mostra a figura 11.



Figura 11 – Distribuição do volume igual nas bolsas - Balança utilizada para medir e distribuir volume igual às bolsas fracionadas.

Fonte: A autora.

No primeiro dia de irradiação (27/04/2017), as bolsas foram divididas em: cinco controles (não receberam irradiação), outras cinco receberam irradiação no irradiador específico na taxa de 448 cGy/min e outras cinco foram irradiadas no RADION com o acelerador linear na taxa de 135 cGy/min (mínima).

Na semana seguinte, no dia 03/05/2018, foram coletados sangue de mais cinco doadores. E os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram reproduzidos, para se obter as bolsas controles e as bolsas para se irradiar no acelerador linear, nas taxas de 456 cGy/min e 545 cGy/min.

4.4.1 Irradiação dos Concentrados de Hemácias

As irradiações foram realizadas no acelerador linear, com dose de 25 Gy no plano médio das bolsas, em diferentes taxas (135 cGy/min, 456 cGy/min, 545 cGy/min) e no Gammacell 1000 com taxa de dose de 448 cGy/min.

Os valores das taxas de dose utilizados foram escolhidos de acordo com a capacidade do aparelho, ou seja, 135 cGy/min foi a mínima taxa de dose possível aplicável, para a dose de 25 Gy, na energia nominal dos fótons de 6 MV e 545 cGy/min foi a máxima taxa de dose possível, sendo a taxa de 456 cGy/min a taxa de dose intermediária mais próxima do Gammacell 1000, de forma a comparar uma metodologia da outra (raios X e raios gama).

Cada bolsa teve uma fita de controle de irradiação de 25 Gy, conforme mostrado na figura 12, o centro da fita recebe a coloração conforme a dose recebida e todas corresponderam a 25 Gy.



Figura 12 – Fita de controle de irradiação de 25 Gy - A coloração no centro corresponde à dose de 25 Gy após irradiação.

Fonte: A autora.

4.4.1.1 Irradiação dos Concentrados de Hemácias no Acelerador Linear

Para realizar a irradiação no acelerador linear foi fabricada uma caixa de acrílico nas dimensões de 13 cm de comprimento, 12 cm largura e 12 cm de altura com 1 cm de espessura. As bolsas de CH foram armazenadas lado a lado, durante a irradiação, para se obter uma distribuição homogênea de dose.

Para o planejamento dosimétrico foi realizada uma tomografia, mostrado na figura 13, onde figura 13 (A) mostra a realização da tomografia e figura 13 (B) a imagem obtida.

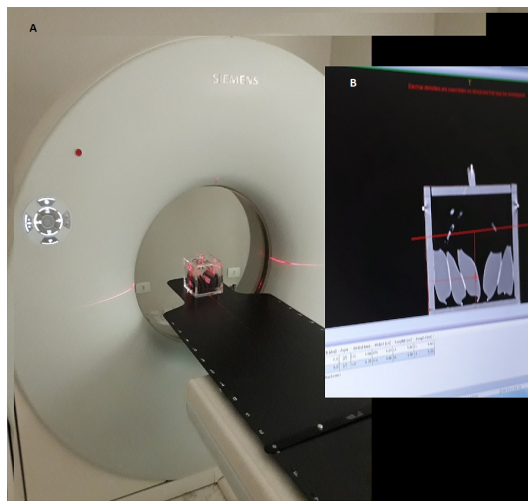


Figura 13 – Planejamento na tomografia computadorizada - Na figura (A) mostra a realização da tomografia para obtenção da imagem e em (B) a imagem obtida.

Fonte: A autora.

O tomógrafo utilizado foi da marca Siemens Emotion e os parâmetros de controle utilizados para obtenção das imagens tomográficas foram: FOV de 200 mm, pitch de 2 mm e slice de 6 mm.

Após as obtenções das imagens foi realizado o planejamento dosimétrico pelo físico médico, e então, os hemocomponentes foram encaminhados para sala de radioterapia para as irradiações das bolsas.

A figura 14 demonstra, através da coloração vermelha em 14 (A) a dose distribuída na caixa, sendo a tonalidade vermelha mais clara referente ao valor de 25 Gy, 14 (B) a disposição das bolsas de concentrados de hemácias na caixa de irradiação e 14 (C) o momento da irradiação em um dos planos, da esquerda para direita, sendo que a irradiação foi realizada em dois planos paralelos e opostos.

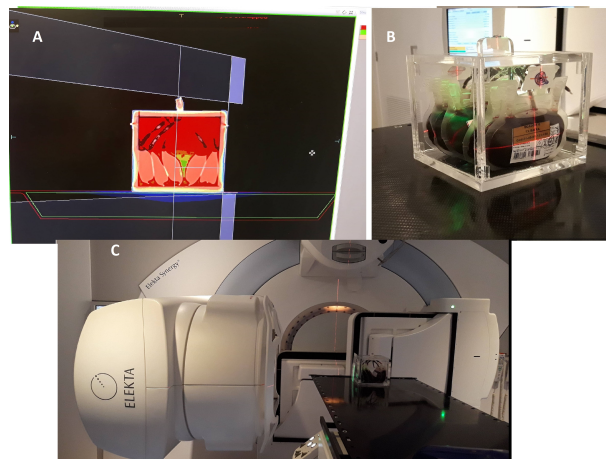


Figura 14 – Irradiação no acelerador linear - Demonstra, através da coloração vermelha em (A) a dose distribuída na caixa, sendo o tom vermelho claro 25 Gy, (B) a disposição das bolsas de concentrados de hemácias na caixa e (C) irradiação em um dos planos, da esquerda para direita.

Fonte: A autora.

A irradiação na taxa de 135 cGy/min durou 10,2 minutos em cada campo totalizando 20,4 minutos, a taxa de 456 cGy/min durou 2,9 minutos em cada campo de irradiação totalizando 5,8 minutos e a taxa de 545 cGy/min durou 2,5 minutos em cada campo totalizando 5 minutos. Na taxa de 448 cGy/min durou 6,3 minutos por bolsa.

No dia 27/05/2018 foram irradiadas cinco bolsas na taxa de 135 cGy/min. No dia 04/05/2018 foram irradiadas cinco bolsas de CH na taxa de 456 cGy/min e cinco bolsas de CH na taxa de 545 cGy/min. As figuras 15 e 16 demonstram que 98% do volume das bolsas receberam a dose de 25 Gy.

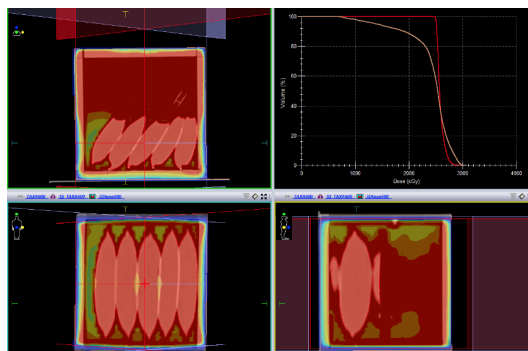


Figura 15 – Curva de dose acelerador linear - Demonstra, através da curva de isodose, que 98% do volume das bolsas receberam a dose de 25 Gy.

Fonte: A autora.

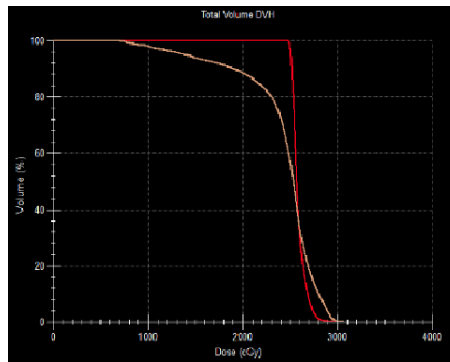


Figura 16 – Curva de dose ampliada no acelerador linear - Demonstra, que 98% do volume das bolsas receberam a dose de 25 Gy.

Fonte: A autora.

4.4.2 Irradiação com o Gammacell 1000

O Gammacell 1000 possui uma fonte de Césio-137 em seu interior e de acordo com o cálculo de sua atividade, realizado pelo físico médico, 6,3 min foi o tempo determinado para as irradiações das bolsas de CH a fim de receberem a dose de 25 Gy. Este cálculo, consta no Apêndice D.

No dia 27/05/2018, foram irradiadas cinco bolsas de CH, uma por vez, por 6,3 min. A figura 17 (A) mostra o Gammacell 1000, em 17 (B) mostra a caçapa onde foram colocados os CH e em 17 (C) mostra como a bolsa ficou armazenada. O recipiente que armazena as bolsas pode ser chamado de caçapa ou canister.

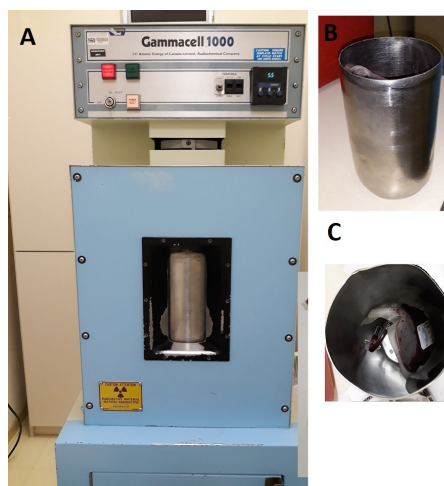


Figura 17 – Irradiação com irradiador específico de sangue - Em (A) mostra o Gammacell 1000, em (B) mostra o recipiente onde foram colocados os CH e em (C) mostra como as bolsas ficaram armazenadas e então colocadas no irradiador.

Fonte: A autora.

Para se dar início à irradiação é programado o tempo de 6,3 min e são apertados os botões lateral e start simultaneamente. Passado este período, o aparelho devolve o hemocomponente, para a posição load, de forma que o CH possa ser retirado da caçapa ou canister. Esta bolsa é então identificada com uma etiqueta "Irradiado". Todas as bolsas receberam a dose de 25 Gy garantida pela etiqueta de controle de irradiação.

A figura 18, mostra como é o interior do Gammacell 1000 através de uma vista superior e outra lateral. É demonstrado a existência um prato giratório, esta rotação constante serve para manter uma homogeneização da dose distribuída no interior da caçapa. No momento da irradiação, a caçapa é levada para dentro do aparelho em frente à fonte selada. Terminado o tempo de 6,3 min a caçapa retorna à posição inicial.

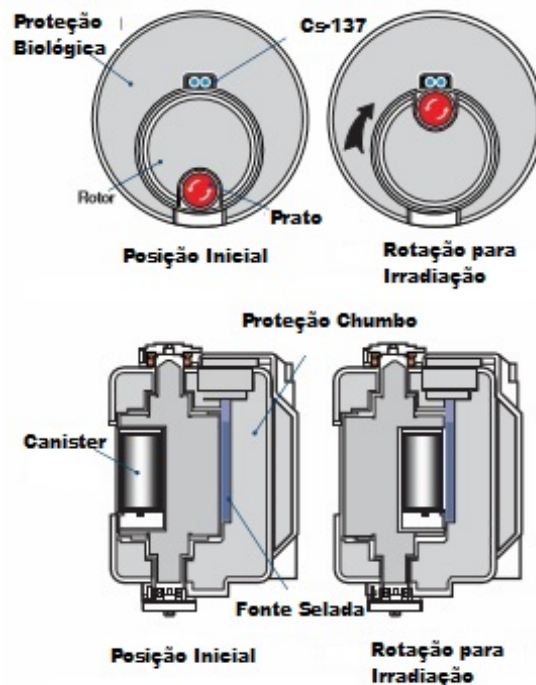


Figura 18 – Esquema de funcionamento aparelho Gammacell 1000 -mostra como é o funcionamento do gammacell 1000 em seu interior tendo uma vista superior e outra lateral.

Fonte: Adaptado de (AECLINDUSTRIAL, 1987).

A figura 19 mostra o mapa de isodose, as curvas mostram que o centro do recipiente recebe 25 Gy.

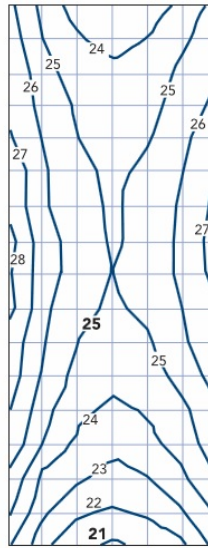


Figura 19 – Mapa de isodose do aparelho Gammacell 1000 - Demonstra a forma como é distribuída a dose na bolsa dentro do canister. Sendo a dose de 25 Gy no centro do canister

Fonte: (AECLINDUSTRIAL, 1987).

4.5 ANÁLISE DAS BOLSAS DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS

Cada bolsa foi homogeneizada dez vezes antes da coleta das amostras, as agulhas para coleta tinham calibre de 40 x 1,2 mm. Para concentração de potássio extracelular foram utilizados tubos com gel e ativador de coágulo e para a análise da eriptose foram utilizados tubos de citometria (5 mL) 12 x 75 mm. Cada tubo foi identificado com a taxa de dose recebida e um código numérico, as coletas foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical.

As coletas foram realizadas nos dias (dia 1, dia 7, dia 14, dia 21 e dia 28) após a irradiação. As amostras foram enviadas ao laboratório LANAC, para realizar a análise da concentração de potássio extracelular, pelo método de ISE indireto e ao Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-PR, para a análise da eriptose, através da citometria de fluxo. As amostras eram transportadas em caixas de isopor com gelo, com a temperatura para transporte controlada e as bolsas ficaram armazenadas em geladeira, com temperatura também controlada.

A data de validade de uma bolsa de sangue é de 35 dias devido as soluções anticoagulantes preservadoras CPDA-1 (Ácido cítrico Citrato de sódio Fosfato de Sódio Dextrose e Adenina), porém, com a irradiação a data diminui para 28 dias (Brasil, 2016) motivo pelo qual foi escolhido o 28º como último dia da análise da amostra.

4.6 POTÁSSIO EXTRACELULAR POR MÉTODO ISE INDIRETO

O eletrodo íon seletivo (ISE) efetua medidas de um sinal elétrico gerado por um sistema eletroquímico dentro de uma célula eletroquímica, por potenciometria, amperometria ou coulometria. A amostra é diluída com diluente em diferentes proporções, dependendo do analisador. Eles são padronizados usando-se concentrações normais de sólidos na proporção de 0,07 Kg/L do volume total do plasma ou de soro (SÁ et al., 2012).

Atualmente, os analisadores clínicos utilizam o ISE-K baseado em valinomicina e matriz de PVC. O método ISE, ou método dos eletrodos íon-seletivos (ISEs) para potássio tem grande seletividade para este íon (CESAR et al., 2001).

O módulo ISE para K⁺ integra eletrodos de membrana éter-coroa para sódio e potássio e uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o cloreto, específicos para cada íon de interesse na amostra. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a Equação de Nernst para o íon específico. Quando comparado com uma Solução de Referência Interna, este potencial elétrico é convertido em voltagem e, em seguida, na concentração de íons da amostra. A equação (9) de Nerst:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \cdot \log Q, \quad (9)$$

onde: E^0 é a força eletromotriz ou potencial normal da pilha correspondente (que se obtém a partir dos potenciais normais dos eletrodos); R é a constante universal dos gases; T é a temperatura em escala absoluta; F é a carga elétrica de um mol de elétrons; n é o número de mols de elétrons transferidos; Q é o quociente de reação (produto das concentrações das espécies ativas do segundo membro da reação de oxi-redução, elevadas a seus respectivos coeficientes estequiométricos), e seu denominador é o produto análogo das concentrações dos reagentes (SÁ et al., 2012).

A bula do reagente utilizado, assim como método ISE indireto consta no Apêndice F deste trabalho.

A figura 20, mostra de forma resumida, o que acontece no processo de Eletrodo Íon Seletivo (ISE indireto).

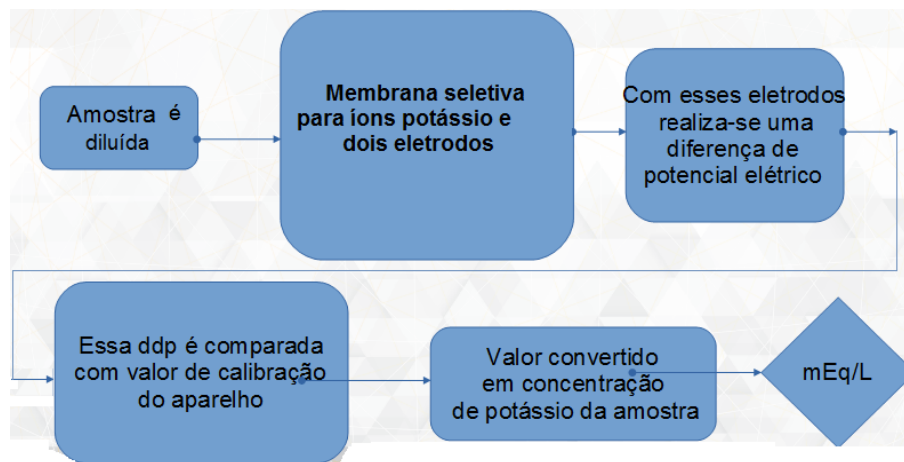


Figura 20 – Esquema resumido ISE indireto - Mostra de forma resumida, como ocorre o processo de medida da concentração extracelular do potássio através do ISE indireto.

Fonte: A autora.

4.7 ENSAIO DA ERIPTOSE

A Anexina V se liga a FOSFATIDILSERINA (fosfolípido presente na camada interna da membrana), de forma que, com a eriptose essa camada interna se transloca para o meio externo, e assim, é possível quantificar e identificar as células em eriptose. A figura 21, mostra um esquema resumido de como é realizado a medida da eriptose através do citômetro de fluxo.

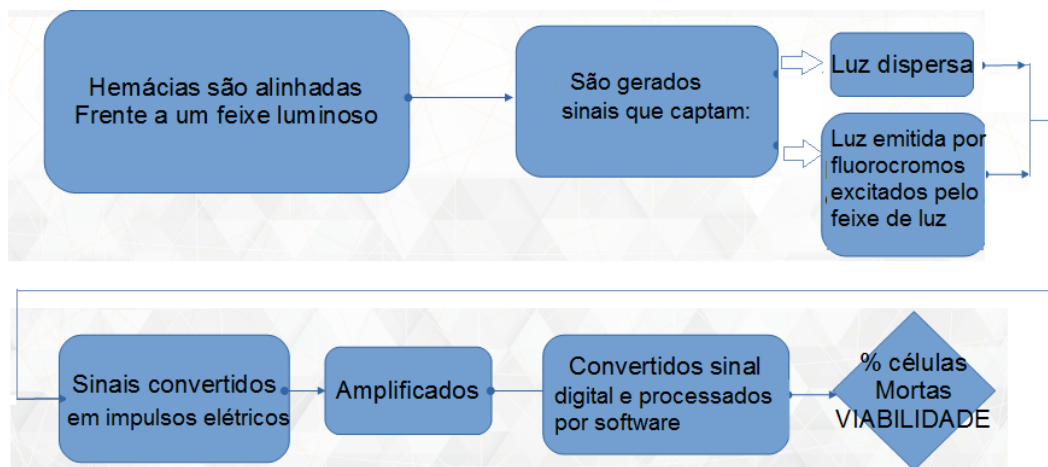


Figura 21 – Esquema resumido da citometria - Mostra de forma resumida, como ocorre o processo de medida da eriptose através do uso da citometria de fluxo laminar.

Fonte: A autora.

Para a análise da eriptose foi coletado 1 mL de sangue de cada amostra que foi transferido para um tubo de citometria (BD Falcon, Bergen, USA).

As amostras foram centrifugadas a 1800 g por 15 min, a 4°C. O plasma e as células brancas foram removidas. Em seguida, 3 mL de tampão salina fosfatado (PBS) gelado foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 min, a 4°C. Após, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 3 mL PBS gelado. As amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi removido. Então, 2,5 μ L das células homogeneizadas foram transferidas para um tubo de citometria contendo tampão Binding (BD Pharmingen™, San Diego, USA). Adicionou-se 5 μ L de Anexina V PE (BD Pharmingen™, San Diego, USA). As amostras foram incubadas por 15 min, a 37°C, na ausência de luz. Colocou-se 1 mL de PBS nas amostras que foram centrifugadas a 400 g por 10 min, a T.A. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. Aproximadamente 100.000 células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur e foram analisadas por meio do software FlowJo.

4.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Nas análises realizadas foram utilizados testes não paramétricos, considerando que as suposições de normalidade, exigidas para os testes clássicos de estatística, não foram satisfeitas para as amostras em estudo. Para os testes de correlação, utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman. Para a comparação estatística dos grupos em estudo, foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon e o teste de Mann-Whitney. O teste de Wilcoxon foi utilizado quando o objetivo era o de comparar grupos dependentes, ou seja, quando as informações coletadas correspondiam ao mesmo indivíduo. Já o teste de Mann-Whitney foi utilizado quando o objetivo era o de comparar grupos independentes, isto é, observações de indivíduos distintos (Chow S, Shao J, 2008; NIKOLAEV, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transfusão de sangue tem muitos efeitos benéficos, porém, os mesmos podem causar reações transfusionais, cada qual tem seus efeitos no paciente e tratamentos específicos (Brasil. Ministério da Saúde, 2010). Através da irradiação de sangue, evita-se a RT chamada de Doença do Enxerto contra Hospedeiro Transfusional, que produz uma reação inflamatória produzida por citocinas liberadas pelos linfócitos presentes nos CH e que pode levar a uma taxa de mortalidade de 90 a 100% (LANDI; OLIVEIRA, 1999; ZAGO et al., 2013).

A DECHT ataca tecidos como fígado, medula óssea, trato gastrointestinal e pele prejudicando a funcionalidade destes órgãos (ASAI et al., 2000; SIX et al., 2012). No paciente imunossuprimido, onde os linfócitos do doador não são destruídos pelo receptor, acabam proliferando e produzindo citocinas que causarão a resposta inflamatória da DECHT, portanto estes pacientes devem receber CH irradiados como prevenção a esta reação transfusional (LANDI; OLIVEIRA, 1999; Brasil. Ministério da Saúde, 2010; ASAI et al., 2000).

Para realizar a irradiação de sangue deve-se utilizar irradiador específico de sangue, mas devido ao alto custo deste procedimento (DODD; VETTER, 2009; TADOKORO et al., 2010) é aceitável o uso do acelerador linear (Brasil, 2016; TADOKORO et al., 2010). Para o uso de irradiador gama é necessário uma licença para materiais radioativos, um físico responsável pela de segurança de radiação, treinamento especial e monitoramentos e manutenção são frequentemente necessários tornando este método mais oneroso em relação ao acelerador linear (JANATPOUR et al., 2005). Portanto, o menor custo inicial de uma unidade de irradiação de raios X em comparação com um irradiador gama apresenta outra vantagem do primeiro. Neste trabalho foi utilizado ambos aparelhos: o Gammacell 1000 e o Acelerador Linear da marca Elektra.

A determinação da dose de 25 Gy de irradiação foi de acordo com os dados disponíveis na literatura e principalmente com a Portaria n.158 de 4 de fevereiro de 2016 que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos (Brasil, 2016; Brasil. Ministério da Saúde, 2010).

A irradiação do sangue provoca danos nas células sanguíneas, esses danos vão ocorrer com maior ou menor intensidade, dependendo: da dose, taxa de dose, fracionamento dos campos de irradiação, tipo de radiação utilizada e tipo da célula

irradiada (BASHIR et al., 2011; ERKAL et al., 2009), por esse motivo, nesse trabalho foi estudado estes efeitos utilizando 25 Gy de dose, taxas de 135 cGy/min, 456 cGy/min, 448 cGy/min e 545 cGy/min, dois campos de irradiação, duas fontes de radiação (raios gama e raios X) e a célula foi a hemácia.

Em geral, altas taxas de dose são mais eficazes na produção de danos biológicos do que baixas taxas de dose. A principal explicação para este efeito é a diminuição do potencial de reparo de danos por radiação. As células têm uma maior oportunidade de reparar danos sub-letais em baixas taxas de dose do que em doses mais altas, reduzindo a quantidade de dano e aumentando a fração de sobrevivência (BERG et al., 2016; HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011), sendo observado esta afirmação neste trabalho.

Uma das formas de proporcionar ao paciente melhor sobrevida é oferecendo hemocomponentes de melhor qualidade, de forma a inibir a proliferação dos linfócitos e se danificar o menos possível as hemácias, pensando nisso, no presente trabalho foi avaliado o dano ocasionado na hemácia através de dois parâmetros: eriptose e concentração de potássio extracelular. Foram utilizados diferentes taxas de dose para se avaliar qual seria a melhor a ser utilizada.

A análise de concentração de potássio extracelular foi realizada por meio da técnica de ISE indireto (SÁ et al., 2012) pois a irradiação promove o aumento da concentração deste eletrólito no sangue (MATHAI, 2005; RAN et al., 2011; BARRBOSA, 2008; ASAI et al., 2000; LANDI; OLIVEIRA, 1999; ZAGO et al., 2013).

A análise da eriptose foi realizada por meio de citometria por fluxo laminar, pois a irradiação também promove a morte celular (MATHAI, 2005; RAN et al., 2011; BARRBOSA, 2008; ASAI et al., 2000; LANDI; OLIVEIRA, 1999). Não existe, atualmente, nenhuma norma regulamentar referente ao valor máximo de eriptose para as bolsas de transfusão. Para células mononucleares utilizadas nos transplantes, seja proveniente de medula óssea ou de cordão, a viabilidade acima de 70% é aceitável, e não causa nenhuma preocupação, sendo que cada centro transfusional tem o seu limite, mas a maioria utiliza este valor (TESHIMA et al., 2014).

Parece que não há diferença entre o uso dos raios X ou gama para a irradiação de sangue, pois é demonstrado que as diferenças com o uso de um ou outro equipamento não são clinicamente importantes no uso dos hemocomponentes para transfusão (JANATPOUR et al., 2005; BASHIR et al., 2011; SINCLAIR, 2011) assim como neste trabalho.

Para melhor discutir os resultados obtidos as análises foram divididas em relação aos dias de observação e quanto às taxas utilizadas.

5.1 CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EM RELAÇÃO AOS DIAS

Os valores das concentrações de potássio nas amostras controle variaram de (5,33 até 75,16) mEq/l. Nas amostras irradiadas com 135 cGy/min, 448 cGy/min, 456 cGy/min e 545 cGy/min, os valores variaram de (5,92 até 50,61) mEq/l, de (7,82 até 57,47) mEq/l, de (6,75 até 80,73) mEq/l e de (6,58 até 73,17) mEq/l, respectivamente. A tabela 3 mostra os valores absolutos obtidos das amostras e consta no Apêndice E.

Tabela 3 – VALORES ABSOLUTOS DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR

DOADOR	cGy/min	K+(mEq/L) DIA 1	K+(mEq/L) DIA 7	K+(mEq/L) DIA 14	K+(mEq/L) DIA 21	K+(mEq/L) DIA 28
1	545	7,33	61,67	57,22	47,61	71,69
	456	7,31	68,22	61,01	58,39	66,95
	CTLE	6,59	29,88	39,28	38,12	58,42
2	545	21,71	69,29	60,23	47,25	73,17
	456	21,11	76,04	69,15	49,79	80,73
	CTLE	21,82	61,09	66,80	47,57	75,16
3	545	6,94	52,24	52,12	47,43	68,33
	456	7,11	48,37	55,12	48,36	71,81
	CTLE	6,46	25,91	34,80	36,70	53,11
4	545	6,78	51,78	55,35	44,21	52,99
	456	6,92	41,87	48,12	43,04	62,05
	CTLE	6,4	28,21	34,02	36,47	54,26
5	545	6,58	54,21	56,77	51,03	69,81
	456	6,75	53,27	63,98	45,99	57,09
	CTLE	6,15	28,17	35,48	35,22	51,83
6	135	7,74	47,14	62,79	67,97	50,61
	448	10,28	50,65	61,74	62,63	55,43
	CTLE	7,74	33,32	42,21	47,91	43,11
7	135	5,92	46,32	54,99	62,08	44,65
	448	7,82	45,76	54,68	57,61	57,47
	CTLE	5,33	24,02	35,80	36,51	43,33
8	135	6,12	49,33	57,51	59,88	48,57
	448	8,53	47,41	59,85	63,74	44,85
	CTLE	5,81	31,08	39,22	42,79	48,17
9	135	8,4	56,09	60,89	71,37	49,25
	448	10,72	52,65	57,39	60,17	51,27
	CTLE	7,67	31,92	41,26	44,61	40,25
10	135	6,75	49,01	70,65	66,94	44,48
	448	8,94	51,13	74,92	55,74	47,03
	CTLE	6,31	29,19	38,93	42,88	49,38

Fonte: A autora.

Foi realizada uma análise relativa, dividindo a concentração de potássio extracelular da amostra irradiada pelo seu controle do mesmo indivíduo, e então feita

uma média para os cinco valores obtidos em cada taxa. O valor do controle portanto é um e valores das médias relativas das respectivas taxas constam na tabela 4 e a figura 22 mostra um gráfico da concentração relativa do potássio extracelular em relação aos dias.

Tabela 4 – CONCENTRAÇÃO RELATIVA DE POTÁSSIO EXTRACELULAR
- Para cada valor foi dividido a concentração de potássio extracelular da amostra pelo controle do mesmo indivíduo e então realizado uma média destes cinco valores. Sendo valor do controle igual a 1.

Dias	135 cGy/min	448 cGy/min	456 cGy/min	545 cGy/min
1	1,07	1,42	1,07	1,06
7	1,67	1,67	1,75	1,79
14	1,56	1,57	1,48	1,42
21	1,54	1,40	1,28	1,24
28	1,07	1,15	1,16	1,16

Fonte: A autora.

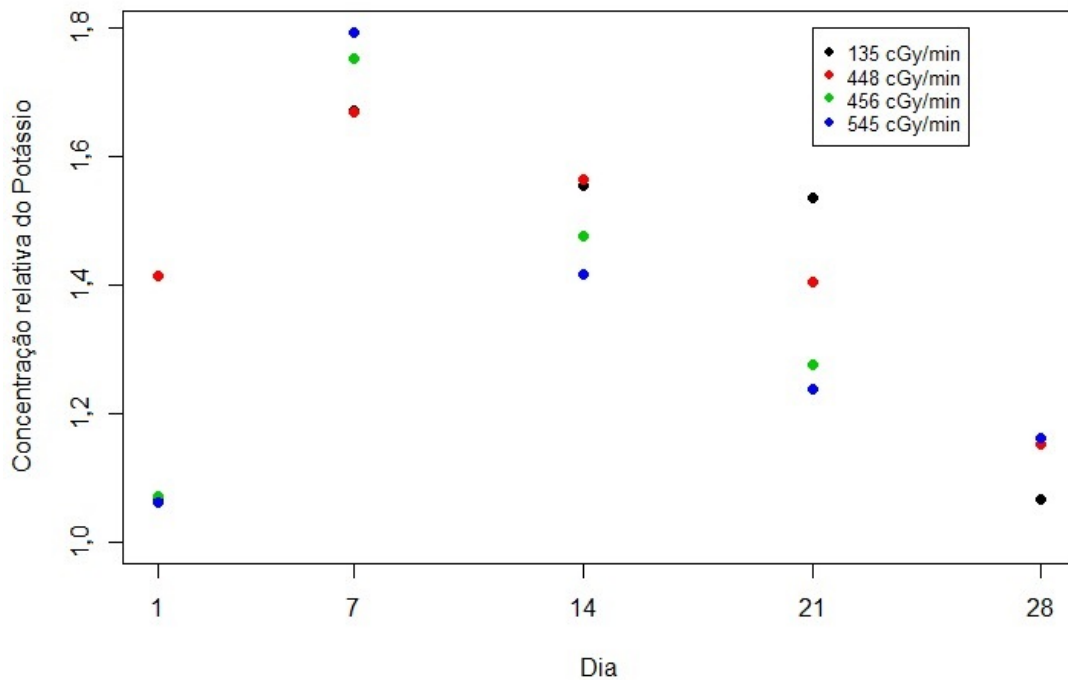


Figura 22 – Gráfico da concentração relativa de potássio extracelular - 1) Todas amostras irradiadas mostraram valores maiores que o controle; 2) No dia 1 valor do Gammacell 1000 foi maior que o AL; 3) Em todas taxas aplicadas houve um aumento da concentração de potássio extracelular e após este período todos tenderam a se aproximar do valor de controle; 4) Maior dano observado foi na taxa de 545 cGy/min e 5) Menor dano observado foi na taxa de 135 cGy/min.

Fonte: A autora.

Este gráfico mostra que:

1. As concentrações de potássio extracelular nas amostras de hemácias após a irradiação, em todas as taxas aplicadas, foram maiores que as não irradiadas (controle) (MATHAI, 2005; RAN et al., 2011; BARRBOSA, 2008; ASAI et al., 2000; LANDI; OLIVEIRA, 1999).
2. Existem alterações estaticamente relevantes observadas nas amostras irradiadas pelo Gammacell 1000 no dia 1, obtendo maior valor em relação aos demais, porém nos dias seguintes de análise respondeu conforme as demais taxas. Uma hipótese para esta diferença, pode ter sido pelas diferentes energias de fótons utilizadas, sendo a energia nominal de 6 MV no acelerador linear e 662 keV no Gammacell 1000 (YOSHIMURA, 2009).
3. As concentrações relativas de potássio aumentaram do dia 1 para o dia 7, e no dia 28 todas as taxas utilizadas tenderam a retornar ao valor próximo do controle, mostrando uma tendência ao reparo celular. Segundo Olivo et al.(2015), a explicação pelo aumento da concentração do potássio extracelular, no dia 7, deve-se ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao íon (MOREIRA et al., 2008). Para o pico de valor no sétimo dia sugere-se hipótese de ser o período onde as células são mais radiosensíveis: fase G2 e mitose do ciclo celular (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).
4. Em relação à taxa mais alta foi observado um dano maior no sétimo dia, mas depois o efeito se aproximou ao efeito do Gammacell 1000 e da taxa de 456 cGy/min. A taxa mais alta produziu maior dano celular neste dia, 79 % em relação ao controle, confirmando que se for utilizada uma taxa de dose maior, o dano na célula também será maior (BERG et al., 2016; HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011).
5. A taxa mais baixa teve menor concentração relativa de potássio extracelular no início das medidas e no dia 28 foi o que mais se aproximou do valor de controle, confirmando que se for utilizada uma taxa de dose menor, o dano à célula também será menor, uma vez que, se foi obtido menor valor de concentração relativa de potássio extracelular, menor foi o dano causado à membrana celular (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).

Foi realizado teste de correlação entre a concentração de potássio extracelular em relação aos dias. O teste de correlação de Spearman apresentou um p-valor de (0,18) e

coeficiente de correlação de $(-0,108184)$, não rejeitando a hipótese de que não há correlação entre os dias e a concentração de potássio extracelular, ou seja, não existe uma correlação significativa entre as variáveis estudadas. Mas removendo o Dia 1 (que foi o dia em que as amostras foram irradiadas), para verificar se existe correlação entre os demais dias e a quantidade de potássio, obtemos através do teste de correlação de Spearman um p-valor significativo $(<0,01)$ e coeficiente de correlação de $(-0,3894)$, ou seja, do dia 7 em diante, observa-se que existe uma correlação entre os dias e a concentração de potássio extracelular e, por ser uma correlação negativa $(-0,3894)$, indica que a concentração de potássio extracelular vai reduzindo no sangue das amostras com o passar dos dias se aproximando do valor de controle, sugerindo a hipótese de um reparo celular.

5.2 CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EM RELAÇÃO ÀS TAXAS APLICADAS

A figura 23 mostra um gráfico da concentração relativa do potássio extracelular em relação às taxas aplicadas.

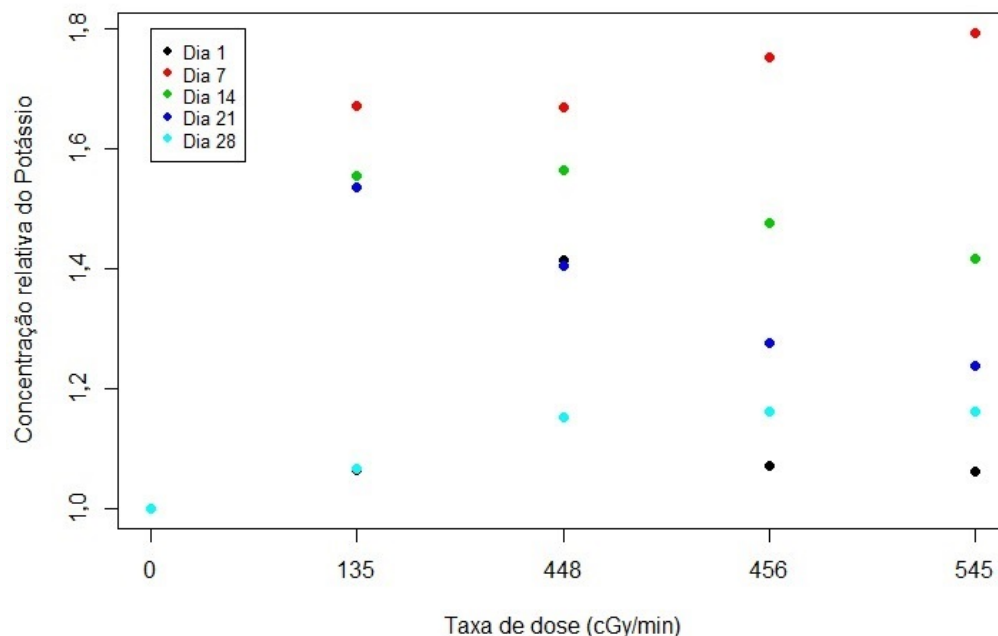


Figura 23 – Gráfico da concentração relativa de potássio extracelular por taxa de irradiação - 1) Aumentando a taxa de dose aumenta a concentração de potássio extracelular; 2) O dia 7 teve maior valor de concentração extracelular de potássio para todas taxas de dose e 3) A maior taxa de dose teve maior valor no dia 7.

Fonte: A autora.

Este gráfico mostra que:

1. Com o aumento da taxa de irradiação aumenta-se a concentração relativa de potássio extracelular. O teste estatístico de correlação não paramétrico de Spearman, apresentou um p-value significativo de (0,025) e coeficiente de correlação de (0,44), ou seja, existe uma correlação entre as variáveis estudadas, e por ser uma correlação positiva (0,44), indica que aumentando a taxa de incidência de irradiação nas bolsas de CH aumenta a concentração média de potássio extracelular no sangue das amostras, confirmando que quanto maior a taxa utilizada maior é o dano ocasionado na célula (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).
2. O dia 7 mostrou ter havido maior valor de concentração relativa de potássio extracelular para todas taxas utilizadas, sugerindo a hipótese de ter sido o período onde as células eram mais radiosensíveis (fase G2 e mitose do ciclo celular) (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013). Mas, segundo Olivo et al.(2015), o aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao íon pode ser maior neste período (MOREIRA et al.,2008).
3. A taxa de 545 cGy/min apresentou, no dia 7, maior valor no dano celular, cerca de 79% a mais que o controle, confirmando que, a taxa maior aplicada danifica mais a célula (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).

5.3 GAMMACELL 1000 X ACELERADOR LINEAR EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR

Utilizando os dois métodos para a irradiação de sangue: Gammacell 1000 com taxa de 448 cGy/min e o acelerador linear com taxa de 456 cGy/min, apesar do gráfico da figura 23 mostrar que o Gammacell 1000, nos dias 1, 14 e 21, apresentou valores maiores para a concentração relativa de potássio extracelular, foi verificado, através do teste de Mann-Whitney (p-valor=0,09939), que eles não possuem diferença significativa entre os dois métodos utilizados de irradiação.

E mesmo que estatisticamente não se tenha mostrado diferença entre eles, no gráfico é constatado que o comportamento não foi parecido, isso pode ser explicado por ter sido usado energias de fótons diferentes, sendo energia nominal de 6 MV no acelerador

linear e 662 keV no Gammacell 1000. Sendo que, neste trabalho, não foi levado em consideração as energias utilizadas, e sim as diferentes taxas de dose.

5.4 ERIPTOSE EM RELAÇÃO AOS DIAS

Os valores de eriptose nas amostras controle variaram de (1,18 até 6,62)%. Nas amostras irradiadas com 135 cGy/min, 448 cGy/min, 456 cGy/min e 545 cGy/min, os valores variaram de (2,59 até 4,23)%, de (2,76 até 5,92)%, de (2,87 até 6,8) % e de (2,01 até 5,83)%, respectivamente. A tabela 5 mostra valores absolutos obtidos das amostras, em porcentagem de eriptose e consta também no Apêndice E.

Tabela 5 – VALORES ABSOLUTOS EM PORCENTAGEM DE ERIPTOSE

DOADOR	cGy/min	ERIPTOSE (%)	ERIPTOSE (%)	ERIPTOSE (%)	ERIPTOSE (%)	ERIPTOSE (%)
		DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
1	545	3,56	4,94	3,97	3,05	5,7
	456	4,32	6,8	3,05	2,87	3,8
	CTLE	2,67	4,57	2,95	1,38	6,62
2	545	3,89	4,85	3,04	2,78	5,17
	456	3,99	5,89	4,35	3,10	5,24
	CTLE	2,94	4,79	4,70	1,18	6,08
3	545	2,01	3,54	2,59	2,32	4,19
	456	3,68	5,3	3,99	3,84	4,18
	CTLE	2,90	3,28	3,70	2,80	5,66
4	545	4,21	4,14	3,21	2,51	4,56
	456	3,63	4,82	4,38	3,59	4,49
	CTLE	3,10	3,58	3,73	3,04	4,78
5	545	4,25	5,83	3,69	3,54	5,5
	456	3,43	4,92	3,52	3,36	4,96
	CTLE	4,65	4,60	3,93	4,12	4,64
6	135	2,98	3,07	2,91	2,73	4,17
	448	3,89	4,45	4,02	3,99	4,39
	CTLE	3,84	4,68	3,6	3,04	3,47
7	135	3,08	3,72	3,35	2,68	3,59
	448	3,38	3,98	3,88	3,11	3,18
	CTLE	3,77	4,09	3,65	3,22	3,83
8	135	3,35	3,80	2,95	2,59	4,23
	448	3,84	5,92	4,99	4,26	4,88
	CTLE	4,4	5,66	3,88	3,38	3,57
9	135	3,14	3,3	3,09	2,94	3,63
	448	4,37	5,08	4,47	3,55	4,18
	CTLE	4,38	4,89	5,81	3,3	3,53
10	135	3,29	3,43	3,24	3,10	3,52
	448	2,76	3,95	3,55	2,80	3,53
	CTLE	3,56	3,83	3,80	3,11	3,27

Fonte: A autora.

Foi realizada uma análise relativa, dividindo o valor da eriptose da amostra irradiada pelo seu controle do mesmo indivíduo e feito uma média dos cinco valores. O valor de controle portanto é um. Os valores das médias relativas das respectivas taxas constam na tabela 6.

Tabela 6 – PORCENTAGEM RELATIVA MÉDIA DE ERIPTOSE - Para cada valor foi dividido o valor da eriptose da amostra pelo controle do mesmo indivíduo e realizado uma média destes cinco valores. Sendo valor do controle igual a um.

Dias	135 cGy/min	448 cGy/min	456 cGy/min	545 cGy/min
1	0,80	0,91	1,23	1,12
7	0,76	1,01	1,35	1,12
14	0,77	1,03	1,02	0,90
21	0,88	1,10	1,61	1,42
28	1,09	1,15	0,84	0,92

Fonte: A autora.

A figura 24 mostra um gráfico da concentração relativa média da porcentagem de eriptose em relação aos dias.

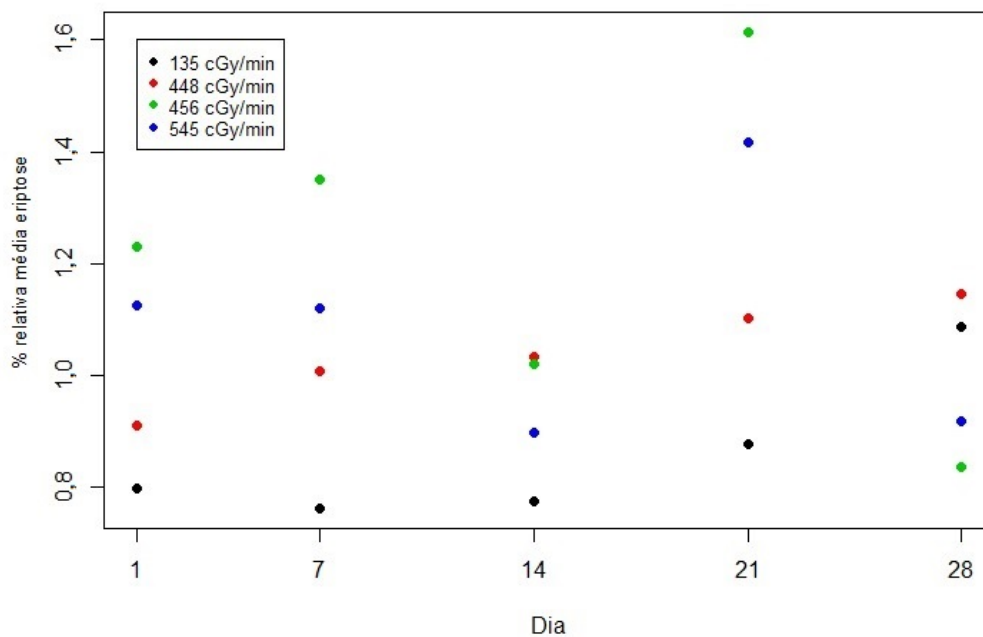


Figura 24 – Gráfico da porcentagem relativa média de eriptose em relação aos dias - 1) A maior alteração observada foi na amostra irradiada na taxa de 456 cGy/min no dia 21, seguido da taxa alta no mesmo dia; 2) As menores alterações observadas foram nas amostras irradiadas pelo AL na taxa de 135 cGy/min nos dias 1, 7, 14 e 21; 3) Taxas de dose menores que um determinado limiar, de aproximadamente 450 cGy/min tendem a ter inicialmente menor dano às hemácias, porém durante o período de 28 dias esse dano vai aumentando gradativamente e 4) As amostras submetidas taxas de dose acima do limiar apresentaram oscilações em relação ao valor médio de eriptose, porém após 28 apresentaram valores bem mais baixos que o inicial.

Fonte: A autora.

Este gráfico mostra que:

1. A maior alteração observada foi na amostra irradiada pelo AL, na taxa de 456 cGy/min, no dia 21 (61% maior de eriptose em relação ao controle), seguido da taxa de dose mais alta no mesmo dia (42% maior em relação ao controle), porém, quando se utiliza o teste de Wilcoxon entre estas taxas de dose com relação a eriptose, é constatado um p-valor de 0,07548, não rejeitando a hipótese de igualdade entre esses dois grupos ao nível de 5 % de significância. Dessa forma, pode-se dizer que as taxas de dose não possuem diferença estatística entre elas, sendo assim, as maiores taxas de dose forneceram maiores danos às hemácias (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).
2. As menores alterações observadas foram nas amostras irradiadas pelo AL na taxa de 135 cGy/min nos dias 1, 7, 14 e 21, sendo valores abaixo do controle, mostrando que a menor taxa danificou menos a célula (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).
3. Taxas de dose menores que um determinado limiar, de aproximadamente 450 cGy/min tendem a ter inicialmente menor dano às hemácias, porém, durante o período de 28 dias esse dano vai aumentando gradativamente chegando à valores até 1,2 vezes os iniciais.
4. As amostras submetidas a taxas de dose acima de 450 cGy/min apresentaram comportamento oposto, tendo oscilações em relação ao valor médio de eriptose, porém, após 28 dias apresentaram valores bem mais baixos que o inicial. Considerando apenas esse fator, esse comportamento sugere que as amostras de CH irradiadas com maiores taxas de dose poderiam ser utilizadas por períodos superiores àquelas irradiadas com menores taxas. Além disso, reforça a ideia de que quanto maior a dose maior a magnitude do reparo celular (TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, 2013).

Foram realizados testes estatísticos de comparação entre as taxas de dose dois a dois: teste estatístico de wilcoxon (p-valor<0,01) para taxa de 135 cGy/min e 448 cGy/; teste de Mann-Whitney (p-valor=0,0189) para taxa de 135 cGy/min e 545 cGy/min; teste de Mann-Whitney (p-valor= 0,0002405) para taxa de 135 cGy/min e taxa de 456 cGy/min. Esses testes mostraram que foram apresentados diferenças significativas, rejeitando a hipótese de igualdade entre os grupos analisados ao nível de 5% de significância.

Foi realizado, também, o teste de Kruskal-Wallis (p -valor= 0,00066) comparando todas as taxas simultaneamente e se rejeitou a hipótese de igualdade entre os grupos ao nível de significância de 5%. As maiores alterações observadas foram nas amostras irradiadas com acelerador linear, na taxa de 456 cGy/min, mas como no teste comparativo de Wilcoxon (p -valor= 0,07548) entre a taxa de 456 cGy/min e a de 545 cGy/min, não se rejeitou a hipótese de igualdade entre os grupos ao nível de 5% de significância podemos dizer que as taxas mais elevadas danificaram mais a hemácia (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).

5.5 ERIPTOSE EM RELAÇÃO ÀS TAXAS APLICADAS

A figura 25 mostra o gráfico de porcentagem relativa média das hemácias por taxa de irradiação.

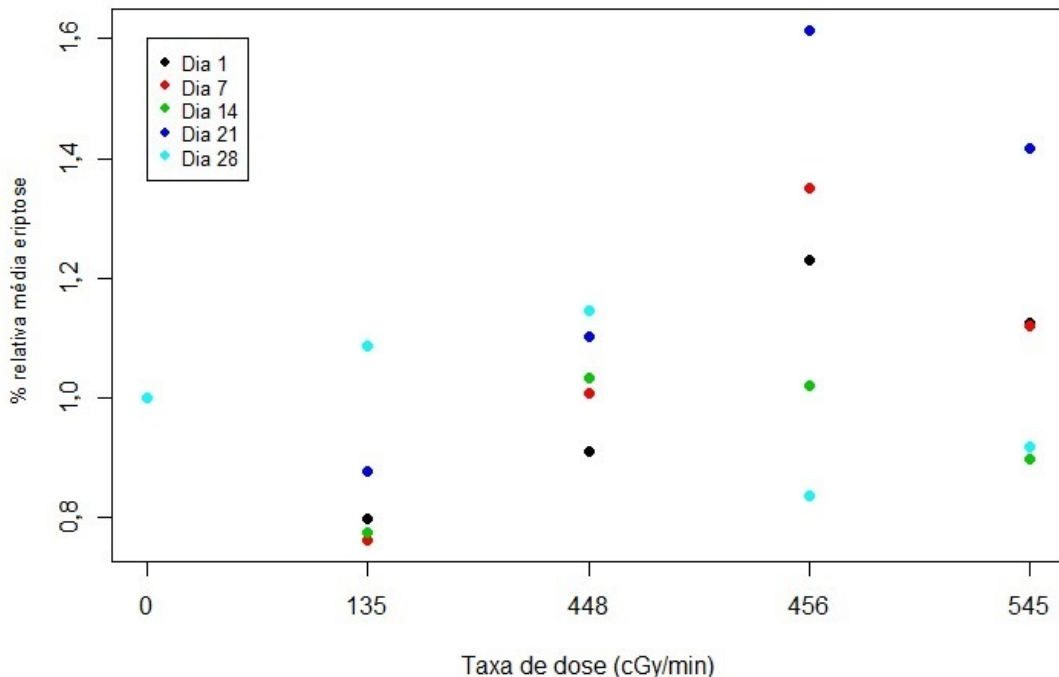


Figura 25 – Gráfico da porcentagem relativa da eriptose por taxa de irradiação -
 1) Aumentando a taxa de irradiação aumenta-se também a eriptose; 2) Na taxa de dose do Gammacell 1000 a eriptose ocorreu de forma gradativa ao longo dos dias; 3) O maior dano nas células ocorreram nas taxas mais elevadas e 4) A taxa de 135 cGy/min forneceu menores danos às hemácias na maioria dos dias analisados.

Fonte: A autora.

Este gráfico mostra que:

1. Com o aumento da taxa de irradiação aumenta-se também a eriptose, isso foi confirmado através do teste de correlação não paramétrico de Spearman que apresentou um p-valor significativo de 0,041, rejeitando a hipótese de que não há correlação entre as taxas de irradiação utilizada e o dano ocasionado nas hemácias. Por ser uma correlação positiva (0,4134), indica que com o aumento da taxa de irradiação utilizada aumenta também o dano nas membranas das hemácias, aumentando a porcentagem de eriptose, confirmando que quanto maior a taxa utilizada maior é o dano ocasionado na célula (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).
2. Foi observado que com o Gammacell 1000 a eriptose ocorreu de forma gradativa ao longo dos dias, o que não aconteceu com o AL, uma hipótese é que com o uso de um aparelho específico para irradiação de sangue, é possível ter uma reprodutibilidade melhor dos parâmetros aplicados na irradiação, ou seja, é aplicado o mesmo tempo, mesma distância de irradiação, além de que, dependendo do AL utilizado é necessário um tempo mais longo para se atingir a dose de 25 Gy comparado ao tempo que se levaria no irradiador com Césio-137. E assim, podem ocorrer possíveis variações de temperatura nas bolsas devido ao longo tempo de irradiação. A uniformidade do campo de radiação diferentes também fazem com que o irradiador seja a escolha mais aceitável (MERGEN et al., 2016).
3. O maior dano nas células foram observadas nas taxas mais elevadas sendo de 61% a mais de eriptose em relação ao controle, no dia 21, pela taxa de 456 cGy/min e de 42% a mais de eriptose em relação ao controle, no mesmo dia, pela taxa de 545 cGy/min, mas, como não há diferença entre as duas taxas, estatisticamente, é possível afirmar que as maiores taxas proveram maiores danos à célula (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).
4. A taxa de 135 cGy/min forneceu menores danos às hemácias na maioria dos dias analisados, afirmando que a menor taxa provocou menor dano nas hemácias analisadas (HALL; GIACCIA, 2002; SINCLAIR, 2011; BERG et al., 2016; ZAGO et al., 2013).

Com relação ao teste estatístico realizado na eriptose celular comparando as taxas de irradiação duas a duas, as diferenças significativas observadas foram entre as seguintes

taxas: 135 cGy/min e 448 cGy/min, 135 cGy/min e 456 cGy/min e 135 cGy/min e 545 cGy/min. Mas comparando as taxas de 448 cGy/min com 456 cGy/min e a taxa de 448 cGy/min com 545 cGy/min utilizando o teste de Mann-Whitney obteve-se p-valor de (0,1888 e 0,6721) respectivamente, não rejeitando a hipótese de igualdade entre os grupos ao nível de 5% de significância e comparando simultaneamente todas taxas aplicadas o teste de Kruskal-Wallis apresentou um p-valor significativo de 0,00066, rejeitando a hipótese de igualdade entre eles ao nível de 5% de significância.

5.6 GAMMACELL 1000 X ACELERADOR LINEAR COM RELAÇÃO À ERIPTOSE

Comparando o Gammacell 1000 (448 cGy/min) com o acelerador linear (456 cGy/min) o irradiador específico de sangue apresentou valores menores de eriptose nos dias 1, 7 e 21, porém utilizando o teste de Mann-Whitney (p-valor=0,1888), não rejeitou a hipótese de igualdade entre os grupos ao nível de 5 % de significância, ou seja, eles não possuem diferença significativa entre os dois métodos utilizados de irradiação (irradiação gama ou X) com relação à eriptose.

6 CONCLUSÃO

As hemácias, ao serem submetidas a irradiação com dose total de 25 Gy e com diferentes taxas de dose (135 cGy/min, 448 cGy/min, 456 cGy/min e 545 cGy/min), apresentaram danos biológicos. Isto foi evidenciado devido à concentração relativa de potássio extracelular ter sido maior nas amostras de sangue irradiadas do que as não irradiadas.

Foram alcançados todos objetivos especificados através da irradiação das bolsas de concentrados de hemácias em todas taxas de dose mencionadas. Foram realizadas as análises das concentrações de potássio extracelular e eriptose das amostras.

Com o aumento da taxa de dose na irradiação das bolsas de CH, aumenta-se a concentração relativa de potássio extracelular e eriptose no sangue analisado, confirmando que quanto maior a taxa de dose utilizada maior é o dano ocasionado na célula.

Os resultados obtidos entre as taxas de 448 cGy/min no Gammacell 1000 e 456 cGy/min no acelerador linear, não tiveram diferenças significantes, para a concentração relativa do potássio extracelular e a eriptose, nas taxas de dose e metodologia utilizadas neste trabalho.

Portanto, foi possível avaliar que aumentando a taxa de dose utilizada na irradiação de sangue, aumenta-se também o dano na hemácia, pois aumenta a eriptose relativa e a concentração relativa do potássio extracelular. O ideal na transfusão de sangue, seria utilizar o concentrado de hemácias irradiado com uma taxa de dose mais baixa, por ocasionar menor dano às hemácias. Mas, ainda é possível utilizar a taxa mais alta, pois, as células mononucleares utilizadas nos transplantes, seja proveniente de medula óssea ou de cordão é aceito com a viabilidade acima de 70% e não causa nenhuma preocupação. Logo, o maior valor de eriptose, obtido neste trabalho, foi de 6,8 % em uma taxa de dose alta, portanto, a viabilidade está acima deste limite.

REFERÊNCIAS

AECLINDUSTRIAL. **Gammacell 1000 Operators Manual**. 1987. 40 p.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). **Boletim de Hemovigilância - 7**. 2015. 14 p. Disponível em: <www.saude.gov.br
<<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/index.htm>>.

AMÂNCIO, F. F. **Ação da radiação ionizante sobre hemácias humanas e suas proteínas de membrana**. 1998. 69 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 1998.

ANDERSON, K. C.; WEINSTEIN, H. J. Transfusion-associated graft-versus-host disease. **New England Journal of Medicine**, Mass Medical Soc, v. 323, n. 5, p. 315–321, 1990.

ASAI, T.; INABA, S.; OHTO, H.; OSADA, K.; SUZUKI, G.; TAKAHASHI, K.; TADOKORO, K.; MINAMI, M. Guidelines for irradiation of blood and blood components to prevent post-transfusion graft-vs.-host disease in Japan. **Transfusion medicine (Oxford, England)**, v. 10, n. 4, p. 315–320, 2000. ISSN 09587578.

AZEVEDO, W. Doença enxerto versus hospedeiro aguda A- GVHD. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2010. ISSN 1516-8484.

BARRBOSA, L. A. d. O. **Hemostasia iônica de concentrados de hemácias irradiadas: ação da Na⁺, K⁺ ATPase**. 2008. 118 p. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

BASHIR, S.; NAIK, F.; CARDIGAN, R.; THOMAS, S. Effect of X-irradiation on the quality of red cell concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 101, n. 3, p. 200–207, 2011. ISSN 00429007.

BERG, J. T.; SEIBERT, J. A.; JR., E. M. L.; BOONE, J. M. **The Essential Physics of Medical Imaging**. 2016. Disponível em: <<http://www.abebooks.com/9780683301182/Essential-Physics-Medical-Imaging-2nd-0683301187/plp>>.

BJORKMAN, P.; SAPER, M.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.; STROMINGER, J.; WILEY, D. The foreign antigen binding site and t cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 329, n. 6139, p. 512, 1987.

BOLTON-MAGGS, P. H. **Serious Hazards of Transfusion (SHOT)**. 2012. Disponível em: <www.shotuk.org/wp-content/uploads/2012/07/SHOT-ANNUAL-REPORT_Final/WebversionBookmarked_2012_06_22.pdf. Acesso em: 10 mar. 2019>.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 25, p. 37, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. **Guia para o uso de Hemocomponentes**. 2010. 140 p. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>.

CESAR, J.; FERNANDES, B.; KUBOTA, T.; NETO, G. D. O. Eletrodos íon-seletivos: historico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos Conceitos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 120–130, 2001.

CHAPMAN, J.; FINNEY, R.; FORMAN, K.; KELSEY, P.; KNOWLES, S.; NAPIER, J.; PHILLIPS, P.; MITCHELL, R.; MURPHY, M.; WATERS, A. et al. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. **Transfusion Medicine**, Wiley Online Library, v. 6, n. 3, p. 261–271, 1996.

Chow S, Shao J, W. H. **Sample Size Calculations in Clinical Research. 2nd Ed. Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series**. 2008. 91 p. ISBN 1584889829.

D'ERRICO, F. Structural shielding design and evaluation for megavoltage x-and gamma-ray radiotherapy facilities: Ncrp report no. 151 published by: National council on radiation protection and measurements, 7910 woodmont avenue, suite 400/bethesda, md 20814-3095, usa isbn: 0-929600-87-8, 246 pp (2005) 100.00(hardback); 80.00 (electronic pdf file, available at <http://ncrppublications.org>). **Radiation Protection Dosimetry**, Oxford University Press, v. 121, n. 3, p. 342–343, 2006.

DODD, B.; VETTER, R. J. Cs Irradiators with X-ray Irradiators. **The Radiation Safety**, v. 96, p. 4, 2009.

ERKAL, H. S.; KARAKO, Y.; SERIN, M. The effects of irradiation on the blood dynamics. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 41, n. 4, p. 263–267, 2009. ISSN 13860291.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. Radiobiology for the Radiologist. 5th ed. **Radiology**, Lippincott Williams & Wilkins, v. 224, n. 2, p. 512–512, 2002. ISSN 0033-8419. Disponível em: <<http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2242022530>>.

HARMENING, D. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. In: **Rio de Janeiro: Revinter**. 2006. ISBN 85-7309-980-1.

JANATPOUR, K.; DENNING, L.; NELSON, K.; BETLACH, B.; MACKENZIE, M.; HOLLAND, P. Comparison of X-ray vs. gamma irradiation of CPDA-1 red cells. **Vox Sanguinis**, v. 89, n. 4, p. 215–219, 2005. ISSN 00429007.

Japanese Red Cross Society. Haemovigilance by JRCS 2013. 2013. Disponível em: <http://www.jrc.or.jp/mr/english/pdf/JRCS_Haemovigilance2013_en.pdf>.

KNOLL, G. F. **Radiation Detection and Measurement, Third Edition**. 2000. 816 p. ISSN 1527-3350. ISBN 0471073385.

LANDI, E.; OLIVEIRA, J. D. Doença do enxerto contra hospedeiro pós-transfusional-guia para irradiação gama de hemocomponentes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 261–272, 1999. ISSN 0104-4230.

LIMA, R. D. S.; AFONSO, J. C.; PIMENTEL, L. C. F. Raios-x: fascinação, medo e ciência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 263–270, 2009. ISSN 0100-4042.

LLOYD, D.; DARROUDI, F.; FENECH, M.; KÖTELES, G. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment : a manual TECHNICAL REPORTS SERIES No. 405. **Technical Report Series-International**, p. 0–127, 2001. ISSN 0966-0410. Disponível em: <http://www.teneb.eu/IAEA_report_405.pdf>.

MATHAI, J. **Irradiated blood components**. 2005. 371–373 p.

MENDONÇA, J. C. G.; MENDES, M. E.; SANTOS, N.; LIMA, F. F. Análise da frequência de alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos irradiados com Co-60. **Associação Brasileira de Energia Nuclear - ABEN**, 2013.

MERGEN, C.; KUNZEL, R.; GÓES, E. G.; CAS, E. V. da; ALVES, N. M.; BOTELHO, M. Z. Dosimetria do sangue irradiado com equipamento de cobaltoterapia. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 6, n. 1, p. 67–77, 2016.

MOREIRA, O. C.; OLIVEIRA, V. H.; BENEDICTO, L. B.; NOGUEIRA, C. M.; MIGNACO, J. A.; FONTES, C. F. L.; BARBOSA, L. A. Effects of γ -irradiation on the membrane ATPases of human erythrocytes from transfusional blood concentrates. **Annals of Hematology**, v. 87, n. 2, p. 113–119, 2008. ISSN 09395555.

NIKOLAEV, I. **Biostatistics Book**. 2013. 445–462 p. ISSN 0030-8730. ISBN 9781305268920. Disponível em: <<http://msp.org/pjm/2013/261-2/p09.xhtml>>.

NOUAILHETAS, Y.; EDUARDO, C.; ALMEIDA, B. d. **Apostila Educativa - Radiações Ionizantes e a Vida**. 2008. v. 1, 42 p. Disponível em: <www.cnen.gov.br>.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. Física das Radiações. **São Paulo: Oficina de Textos**, v. 1, p. 296, 2010.

OLIVEIRA, M. B. S. C.; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. **Epsjv**, p. 1–156, 2013. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/Material/L226.pdf>>.

OLIVO, R. A.; SILVA, M. V. da; GARCIA, F. B.; SOARES, S.; JUNIOR, V. R.; MORAES-SOUZA, H. Evaluation of the effectiveness of packed red blood cell irradiation by a linear accelerator. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2015. ISSN 18060870.

PERKINS, H. A. Should all blood from related donors be irradiated? **Transfusion**, Wiley Online Library, v. 32, n. 4, p. 302–303, 1992.

PINTO, N. G. V. **Estudo dos efeitos da irradiação em sangue total, matriz celular e plasma usando espalhamento coerente de raios X e fluorescência de raios X por reflexão total**. 2008. 132 p. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

PODGORSAK, E. **Radiation Oncology : A Handbook for Teachers and Students Vienna**. 2005. ISBN 9201073046.

QU, L.; TRIULZI, D. J. Clinical Effects of Red Blood Cell Storage. **Cancer Control**, v. 22, n. 1, p. 26–37, 2015. ISSN 15262359.

RAN, Q.; HAO, P.; XIAO, Y.; ZHAO, J.; YE, X.; LI, Z. Effect of irradiation and/or leucocyte filtration on RBC storage lesions. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011. ISSN 19326203.

REVERBERI, R.; GOVONI, M.; VERENINI, M. Deformability and viability of irradiated red cells. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 2, p. 176–185, 2007. ISSN 00212571.

SÁ, A.; ALBUQUERQUE, C.; BOTTINO, L. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática (vol. 2)**. 2012. 148 p. ISBN 21)38919900. Disponível em: <www.controllab.com.br>.

SAKUMA, A.; OTTOBONI, M. A. P.; SIERRA, P. C. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes**. 2011. 120 p.

SCHONKEN, P. **Health effects of exposure to low levels of ionizing radiation** By the Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations of the National Research Council Washington D.C., National Academy Press, 421 pp., 1990, ISBN 0-309-03995-9, £30.00. 1991. 269 p. ISSN 01688510. ISBN 0309589703. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/1224.html> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016885109190028V>>.

SHIVDASANI, R. A.; HALUSKA, F. G.; DOCK, N. L.; DOVER, J. S.; KINEKE, E. J.; ANDERSON, K. C. Graft-versus-host disease associated with transfusion of blood from unrelated hla-homozygous donors. **New England Journal of Medicine**, Mass Medical Soc, v. 328, n. 11, p. 766–770, 1993.

SINCLAIR, A. **X-ray versus gamma irradiation of blood components for prevention of transfusion-associated graft versus host disease**. 2011. 9 p.

SIX, C. K.; HAUGHT, J. M.; SAFYAN, E. L.; PATTON, T.; STAHLFELD, K. **Transfusion-associated graft-versus-host disease: A case report and review of literature**. 2012.

SKUTELSKY, E. Comparative Study of Nuclear Expulsion from the Late Erythroblast and Cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 60, p. 427–436, 1970.

SOARES, B. M. D.; ALMEIDA, D.; SILVA, M. d. L. d. B.; RIBINIK, M. L. R. Coleta de sangue de doadores. **Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (Brasil)**, n. 2, p. 42, 1998.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Fundamentos da Circulação Extracorpórea. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea**, v. 2, p. 828, 2006.

STEVENSON, A.; KERR, C. On the distributions of frequencies of mutation to genes determining harmful traits in man. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Elsevier, v. 4, n. 3, p. 339–352, 1967.

TADOKORO, K.; REESINK, H. W.; PANZER, S.; CHABANEL, A.; SANTAILLER, G.; GUÉRIN, T.; SOCQUET, D.; DAVID, B.; LABRUNE, J. L.; LIN, C. K.; TSOI, W. C.; LETOWSKA, M.; PAPIS, J. A.; NANIEWICZ, J.; DUDZIAK, K.; LACHERT, E.; LOZANO, M.; SCHNEIDER, K.; SNYDER, E. L.; CHAMPION, M. H. **Problems with irradiators**. 2010.

TAUHATA, Luiz; SALATI, Ivan; PRINZIO, Renato Di; PRINZIO, A. R. D. Radioproteção E Dosimetria. **Ird/Cnen**, n. 9, p. 345, 2013.

TERASAKI, P. I. **History of HLA: Ten recollections**. UCLA Tissue Typing Laboratory, 1990.

TESHIMA, T.; CHABANNON, C.; NIEDERWIESER, D.; LANZA, F.; SZABOLCS, P.; PADLEY, D.; LEEMHUIS, T.; BAZARBACHI, A.; KOH, M. B. C.; KEEVER-TAYLOR, C. a. Essential requirements for setting up a stem cell processing laboratory. **Bone Marrow Transplantation**, Nature Publishing Group, v. 49, n. 8, p. 1098–1105, 2014. ISSN 0268-3369. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2014.104>>.

TWARDELLA, D.; CHANG-CLAUDE, J. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view - Overview of methods and results. **Radiotherapy and Oncology**, v. 62, n. 3, p. 249–260, 2002. ISSN 01678140.

VASSELAI, A. **Estudo clínico-histológico das alterações de pele e associação com doença do enxerto contra o hospedeiro em pacientes pediátricos submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas no serviço de transplante de medula óssea do HC-UFPR**. 2008.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.; NETO, S. Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. **Atheneu**, p. 1º Edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.

VOGELSANG, G. B. Transfusion-associated graft-versus-host disease in nonimmunocompromised hosts. **Transfusion**, Wiley Online Library, v. 30, n. 2, p. 101–103, 1990.

WINTER, K. M.; JOHNSON, L.; KWOK, M.; REID, S.; ALARIMI, Z.; WONG, J. K.; DENNINGTON, P. M.; MARKS, D. C. Understanding the effects of gamma-irradiation on potassium levels in red cell concentrates stored in SAG-M for neonatal red cell transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 108, n. 2, p. 141–150, 2015. ISSN 14230410.

YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações : interação da radiação com a matéria Radiation Physics : interaction of radiation with matter. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. Editora Atheneu, 2013. 65–67 p. ISBN 9789725564677.

ZINKERNAGEL, R.; DOHERTY, P. et al. Restriction of in vitro t cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. 1974.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTO PARA REALIZAÇÃO DA CITOMETRIA DAS HEMÁCIAS

Controle autólogo *Projeto Letícia*

CITOMETRIA: ENSAIO DE ERIPTOSE

Antes de começar...

- Transferir para um tubo de citometria 100 µL de tampão Binding [1x] previamente aquecido
 - O tampão Binding vem [10x] (cat.: 556454 / lote: 84296 / val.: 2013-10) está na geladeira
 - Para ficar [1x], diluir o tampão Binding em água destilada

Citometria...

- Coletar 1 mL de sangue de cada amostra em um tubo de citometria
- Homogeneizar bem a amostra
- Centrifugar a amostra a 3000 RPM, por 15 min, a 4°C
- Após centrifugação, a amostra apresentará as seguintes fases:
 - Plasma
 - Células brancas (névoa)
 - Hematócrito (pellet gigante)
- Remover o plasma com ponteira e descartá-lo
- Remover as células brancas (névoa) e descartar
- Adicionar 3 mL PBS gelado até completar o tubo
- Homogeneizar por inversão manual
- Centrifugar a 1500 RPM, por 10 min, a 4°C
- Remover o sobrenadante com ponteira (a amostra ainda vai apresentar células brancas que devem ser retiradas nesse momento)
- Colocar novamente 3 mL PBS gelado até completar o tubo
- Homogeneizar por inversão manual
- Centrifugar a 1500 RPM, por 10 min, a 4°C
- Remover o sobrenadante com ponteira (a amostra ainda vai apresentar células brancas que devem ser retiradas nesse momento)
- Homogeneizar bem a amostra
- Pipetar 2,5 µL das células homogeneizadas e transferir para o tubo de citometria contendo tampão Binding [1x]
- Adicionar:
 - 5 µL de Anexina PE
 - 5 µL 7-AAD (só na primeira vez)
 - 15 amostras: 27/04/2018
 - 15 amostras novas: 04/05/2018
- Incubar por 15 min, a 37°C (na estufa), no escuro
- Colocar 1 mL de PBS
- Centrifugar a 1500 RPM, por 10 min, a T.A.
 - Descartar o sobrenadante
 - Fixar as células com 300 µL PFA 1%

APÊNDICE B – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO


Nós, Aleteia Brante Mori, André Luiz Coelho Conceição e Jaqueline Kappke, pesquisadores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, estamos convidando (o Senhor, a Senhora) doador voluntário de sangue do Biobanco a participar de um estudo "Comparação Entre Os Danos Causados À Célula Pela Irradiação De Hemácias Com A Utilização De Irradiador Específico Gammacell 1000 E Com Acelerador Linear" que visa verificar o que acontece com o sangue quando se submete ao processo de irradiação em diferentes taxas de dose e avaliar qual método utilizado prejudica menos a célula sanguínea, visto que, o sangue doado é também utilizado em pessoas imunodeprimidas e quanto melhor a qualidade do sangue, melhor para a recuperação do paciente. O sangue doado geralmente passa pela irradiação para evitar uma doença grave e fatal chamada doença do enxerto contra hospedeiro transfusional, e existem determinados pacientes que só podem receber o sangue irradiado.

O objetivo desta pesquisa é irradiar o sangue doado com diferentes taxas de dose através de um aparelho de Radioterapia de pacientes e com um irradiador de sangue e verificar o que acontece às hemácias e com a concentração de potássio nesses diferentes métodos, visando verificar qual método prejudica menos os glóbulos vermelhos do sangue que tem como objetivo transportar o oxigênio pelo corpo.

Caso (o Senhor, a Senhora) participe da pesquisa, será necessário apenas assinar este termo de consentimento e doar seu sangue de forma voluntária para esta pesquisa, não será utilizado nenhum dado pessoal, as bolsas serão identificadas por códigos, de forma anônima e o senhor ou senhora também NÃO precisará ser convocado para retornar para uma nova coleta. Sendo esta uma única doação.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE 


MARIA JOSÉ MOCEKIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UFPR
Matricula 7462

Será utilizado na pesquisa apenas uma parte do sangue, os concentrados de hemácias, a parte de plaquetas e o plasma poderão ser doados ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas caso (o Senhor, a Senhora) permita a doação e esta esteja dentro dos critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, podendo assim, ser utilizadas pela Unidade Transfusional, caso contrário o plasma e a plaqueta será descartado de forma adequada pelo PGRSS – Programa de Gerenciamento de Resíduos dos Serviços de Saúde do Hospital de Clínicas.

É possível que (o Senhor, a Senhora) experimente algum desconforto como algum mal-estar devido a doação sanguínea como palidez, transpiração, tontura e estes podem progredir para hematomas entre outros.

Os riscos relacionado ao estudo ocorre apenas com relação à doação de sangue, o estudo não influenciará em nada o doador de sangue.

Os benefícios esperados com essa pesquisa é poder entender se existe algum método utilizado de irradiação que possa prejudicar menos as hemácias do sangue, embora nem sempre (o Senhor, a Senhora) seja diretamente beneficiado(a) por sua participação neste estudo.

Os pesquisadores Aleteia Brante Mori, André Luiz Coelho Conceição e Jaqueline Kappke, responsáveis por este estudo, poderão ser localizados para esclarecer eventuais dúvidas que (o Senhor, a Senhora) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo por e-mail, telefone em horário comercial das 8:00 as 17:00 horas de segunda a sexta. Em situações de emergência ou urgência, relacionadas à pesquisa, os mesmos poderão ser contatados pelo telefone (041) 999697220, com acesso direto com a pesquisadora envolvida Aleteia Brante Mori.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE 


MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UFPR
Matricula 7462

Se (o Senhor, a Senhora) tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas André Luiz Coelho Conceição e Jaqueline Kappke, orientador e co-orientadora do projeto, dra.Alexandra Cristina Senegaglia, dra.Lidiane Maria Boldrini Leite e dra Alessandra Ferreira Kozlowski que realizarão as medidas das amostras de sangue, Aleteia Brante Mori, pesquisadora principal, Guadalupe Cardoso farmacêutica do Banco de Sangue. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

O material obtido das amostras de concentrado de hemácias serão utilizados unicamente para esta pesquisa e será destruído ou descartado através do programa utilizado pelo hospital para o lixo hospitalar logo termine de realizar as medidas das amostras da bolsa de concentrado de hemácias doadas, que leva em torno de 35 dias após a doação, e 28 dias após a bolsa ser irradiada. Já o concentrado de plaquetas, plasma e crioprecipitado poderão ser utilizados por pacientes que necessitem desse tipo de doação caso haja aceite por parte (do senhor, da senhora) e do Biobanco, caso contrário será descartado pelo PGRSS – Programa de Gerenciamento de Resíduos dos Serviços de Saúde do Hospital de Clínicas para dar o fim adequado ao material. As despesas necessárias para a realização da pesquisa como material de coleta do sangue não são de sua responsabilidade e (o Senhor, a Senhora) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE Jsh


MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UPFR
Matrícula 7462

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que farei uma doação única e voluntária do meu sangue para utilização nesta pesquisa. Eu entendi que não precisarei retornar para futura doação para esta pesquisa e que não serei prejudicado por participar. Eu entendi que uma parte do sangue será utilizada para pesquisa que é a parte das hemácias e outra parte como a plaqueta e o plasma poderão ser utilizados pela Unidade Transfusional caso a doação ocorra dentro dos critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, caso contrário será descartado de forma adequada. Por isso é de meu desejo:

doar as plaquetas e demais componentes que não serão utilizados na pesquisa para o Biobanco.

descartar as plaquetas e demais componentes que não serão utilizados na pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome completo, legível do Participante e/ou Responsável Legal

Assinatura do Participante e/ou Responsável Legal

ALETEIA BRANTE MORI

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Aleteia Brante Mori

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Maria José Moçelin
MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HCU/UFPR
Matricula 7462

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.

ALETEIA BRANTE MORI

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Aleteia Brante Mori

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba, ___/___/___



MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UFPR
Matrícula 7462

APÊNDICE C – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES DO COMPLEXO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR - EBSERH



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-Reitoria de Graduação e Educação Profissional
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Sistema de Bibliotecas

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES DE EMPRESAS

Empresa: Complexo Hospital de Clínicas - UFPR - EBSERH
 CNPJ: 75.085.679/0002-20 Inscrição Estadual: —
 Endereço completo: R. General Carneiro 181
 Representante da empresa: Rosires Pereira de Andrade
 Telefone: (41) 3360 1840 e-mail: rosires.pereira@hc.ufpr.br
 Tipo de produção intelectual: () TCC¹ () TCCE² (x) Dissertação () Tese
 Título/subtítulo: ANÁLISE DA ERIPTOSE E CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DO
POTÁSSIO NAS HEMÁCIAS IRRADIADAS COM DIFERENTES TAXAS DE DOSE.
 Autor³: ALETEIA BRANTE MURI Código de matrícula³: 118818
 Orientador: PROF. DR. ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO
 Co-orientador: PROF. DR. JAQUELINE KAPPE ZAMBIANCHI
 Curso/Programa de Pós-graduação: EM ENGENHARIA ELÉTRICA E INFORMÁTICA
INDUSTRIAL DA UFPR NA ÁREA DE ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Como representante da empresa acima nominada, declaro que as informações e/ou documentos disponibilizados pela empresa para o trabalho citado:

- Podem ser publicados sem restrição.
 Possuem restrição parcial por um período⁴ de _____ anos, não podendo ser publicadas as seguintes informações e/ou documentos: _____
 Possuem restrição total para publicação por um período⁴ de _____ anos, pelos seguintes motivos: _____

Prof. Dr. Rosires Pereira de Andrade
Gerente de Ensino e Pesquisa
Complexo Hospital de Clínicas - CRM 3738
UFPR/EBSERH - Matr. 6341251
Representante da empresa

Curitiba, 08/05/2019
Local e Data

¹ TCC – monografia de Curso de Graduação.


² TCCE – monografia de Curso de Especialização.

³ Para os trabalhos realizados por mais de um aluno, devem ser apresentados os dados de todos os alunos.

⁴ O período de restrição parcial ou total deste Termo deve ser igual ao período definido em termo específico estabelecido entre a UFPR e a empresa. A íntegra do resumo e os metadados ficarão disponibilizados.

Prof. Dr. Rosires Pereira de Andrade
Gerente de Ensino e Pesquisa
Complexo Hospital de Clínicas - CRM 3738
UFPR/EBSERH - Matr. 6341251

APÊNDICE D – CÁLCULO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO DO IRRADIADOR DE SANGUE GAMMACELL 1000



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

**Cálculo do Tempo de Irradiação
Irradiador de Sangue Gammacell**

$A(t) = A_i e^{(-\lambda t)}$, em que

$A(t)$ = atividade em função do tempo
 A_i = atividade inicial
 λ = constante de decaimento
 t = tempo decorrido

$\lambda = \ln 2 / t_{1/2}$, em que
 $t_{1/2}$ = meia-vida do radioisótopo (Cs-137 = 30,17 anos)

Taxa de dose em 04/fev/1988:
53.500,00 cGy/h

Cálculo atualizado para 01/jan/18: JAN – JUN de 2018
Tempo t decorrido = 10.924 dias

$A(t) = 26.902,59$ cGy/h ou 448,38 cGy/min (no ar)

Considerando a constante de atenuação de massa para a água $\mu = 0,89$:
 $A(t) = 399,06$ cGy/min

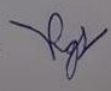
Portanto, para entregar 2500cGy, temos 6,3 min

Cálculo atualizado para 01/jul/18: JUL – DEZ de 2018
Tempo t decorrido = 11.105 dias

$A(t) = 26.597,90$ cGy/h ou 443,30 cGy/min (no ar)
 $A(t) = 394,54$ cGy/min (água)

Portanto, para entregar 2500cGy, temos 6,3 min

Responsável:
Ricardo Goulart, Físico Médico
Supervisor de Radioproteção



Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória
80.060-900 Curitiba/ PR
(41) 3360-1900

**APÊNDICE E – TABELA DE VALORES ABSOLUTOS DA ERIPTOSE E
CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EXTRACELULAR**

Doador	cGy/min	Erip(%)	Pot (mEq/L)	Erip(%)	Pot (mEq/L)	Erip(%)	Pot (mEq/L)	Erip(%)	Pot (mEq/L)	Erip(%)	Pot (mEq/L)
1	545	3,56	7,33	4,94	61,67	3,97	57,22	3,05	47,61	5,7	71,69
	456	4,32	7,31	6,8	68,22	3,05	61,01	2,87	58,39	3,8	66,95
	CTLE	2,67	6,59	4,57	29,88	2,95	39,28	1,38	38,12	6,62	58,42
2	545	3,89	21,71	4,85	69,29	3,04	60,23	2,78	47,25	5,17	73,17
	456	3,99	21,11	5,89	76,04	4,35	69,15	3,1	49,79	5,24	80,73
	CTLE	2,94	21,82	4,79	61,09	4,7	66,8	1,18	47,57	6,08	75,16
3	545	2,01	6,94	3,54	52,24	2,59	52,12	2,32	47,43	4,19	68,33
	456	3,68	7,11	5,3	48,37	3,99	55,12	3,84	48,36	4,18	71,81
	CTLE	2,9	6,46	3,28	25,91	3,7	34,8	2,8	36,7	5,66	53,11
4	545	4,21	6,78	4,14	51,78	3,21	55,35	2,51	44,21	4,56	52,99
	456	3,63	6,92	4,82	41,87	4,38	48,12	3,59	43,04	4,49	62,05
	CTLE	3,1	6,4	3,58	28,21	3,73	34,02	3,04	36,47	4,78	54,26
5	545	4,25	6,58	5,83	54,21	3,69	56,77	3,54	51,03	5,5	69,81
	456	3,43	6,75	4,92	53,27	3,52	63,98	3,36	45,99	4,96	57,09
	CTLE	4,65	6,15	4,6	28,17	3,93	35,48	4,12	35,22	4,64	51,83
6	135	2,98	7,74	3,07	47,14	2,91	62,79	2,73	67,97	4,17	50,61
	448	3,89	10,28	4,45	50,65	4,02	61,74	3,99	62,63	4,39	55,43
	CTLE	3,84	7,74	4,68	33,32	3,6	42,21	3,04	47,91	3,47	43,11
7	135	3,08	5,92	3,72	46,32	3,35	54,99	2,68	62,08	3,59	44,65
	448	3,38	7,82	3,98	45,76	3,88	54,68	3,11	57,61	3,18	57,47
	CTLE	3,77	5,33	4,09	24,02	3,65	35,8	3,22	36,51	3,83	43,33
8	135	3,35	6,12	3,8	49,33	2,95	57,51	2,59	59,88	4,23	48,57
	448	3,84	8,53	5,92	47,41	4,99	59,85	4,26	63,74	4,88	44,85
	CTLE	4,4	5,81	5,66	31,08	3,88	39,22	3,38	42,79	3,57	48,17
9	135	3,14	8,4	3,3	56,09	3,09	60,89	2,94	71,37	3,63	49,25
	448	4,37	10,72	5,08	52,65	4,47	57,39	3,55	60,17	4,18	51,27
	CTLE	4,38	7,67	4,89	31,92	5,81	41,26	3,3	44,61	3,53	40,25
10	135	3,29	6,75	3,43	49,01	3,24	70,65	3,1	66,94	3,52	44,48
	448	2,76	8,94	3,95	51,13	3,55	74,92	2,8	55,74	3,53	47,03
	CTLE	3,56	6,31	3,83	29,19	3,8	38,93	3,11	42,88	3,27	49,38

APÊNDICE F – MÉTODO ISE INDIRETO PARA POTÁSSIO



REAGENTES ISE

AUH1011	Buffer	4 x 2 000 mL
AUH1012	Mid-Standard	4 x 2 000 mL
AUH1013	Reference	4 x 1 000 mL
AUH1014	Low Serum Std.	4 x 100 mL
AUH1015	High Serum Std.	4 x 100 mL
AUH1016	High/Low Urine Std.	4 x 100 mL
AUH1017	Internal Ref. Sol.	2 x 25 mL
AUH1018	Na ⁺ /K ⁺ Selectivity Check Sol.	2 x 25 mL

Fim a que se destina

Reagente para a determinação quantitativa de concentrações de sódio, potássio e cloreto no soro e na urina humanos nos módulos ISE da Beckman Coulter.

Resumo

Os eletrólitos afetam a maioria dos processos metabólicos. Servem para manter a pressão osmótica e a hidratação de vários compartimentos de fluidos corporais, pH adequado do organismo e regulação das funções cardíaca e muscular apropriadas. Os eletrólitos também se encontram envolvidos nas reações oxidação-redução e participam como partes essenciais ou, cofatores, nas reações enzimáticas.¹

Metodologia

A determinação de eletrólitos é uma das funções mais importantes no laboratório clínico. Os métodos para a determinação de eletrólitos incluem espectrometria de emissão, espectrometria de chama, análise de ativação de neutrões, espectroscopia de absorção atômica e eletrodos seletivos de íons. O módulo ISE para Na⁺, K⁺ e Cl⁻ integra eletrodos de membrana éter-coroa para sódio e potássio e uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o cloreto, específicos para cada íon de interesse na amostra. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a Equação de Nernst para um íon específico. Quando comparado com uma Solução de Referência Interna, este potencial elétrico é convertido em voltagem e, em seguida, na concentração de íons da amostra.¹

Informação do sistema

Para analisadores AU400/400⁺/480, AU600/640/640⁺/680, AU2700/5400 e AU5800 da Beckman Coulter.

Conteúdo, reagentes/padrões

Concentração de ingredientes ativos:

ISE Low Serum Standard		ISE Mid-Standard		ISE High Serum Standard	
Na ⁺	130 mmol/L	Na ⁺	4,3 mmol/L	Na ⁺	160 mmol/L
K ⁺	3,5 mmol/L	K ⁺	0,13 mmol/L	K ⁺	6 mmol/L
Cl ⁻	85 mmol/L	Cl ⁻	3,1 mmol/L	Cl ⁻	120 mmol/L
Conservantes		Conservantes		Conservantes	
ISE Buffer		ISE Reference		ISE Na ⁺ Selectivity Check	
Trítanotolamina	0,1 mol/L	Cloreto de potássio	1,00 mol/L	Na ⁺	150 mmol/L
Conservantes				Conservantes	
ISE Low/High Urine Standard		ISE Internal Reference		ISE K ⁺ Selectivity Check	
Na ⁺	(Baixo) 50 mmol/L (Alto) 200 mmol/L	Cloreto de potássio	3,3 mol/L	K ⁺	5 mmol/L
K ⁺	(Baixo) 10 mmol/L (Alto) 100 mmol/L	Cloreto de prata	Saturado	Conservantes	
Cl ⁻	(Baixo) 50 mmol/L (Alto) 180 mmol/L				
Conservantes					

Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Não ingerir. Nocivo se ingerido.
3. ISE Buffer, ISE Mid Standard: Irritante. Contém formaldeído. Pode causar sensibilização em contacto com a pele. Evitar o contacto com a pele. Usar luvas adequadas. Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos.
4. Elimine todos os resíduos em conformidade com as orientações locais.
5. Consulte as Folhas de Dados de Segurança para mais informações

Preparação dos reagentes

Os reagentes estão prontos a utilizar. Não é necessária qualquer preparação.

Reagentes ISE

Armazenamento e estabilidade

- Os reagentes permanecem estáveis enquanto não forem abertos até à data de validade mencionada no rótulo, se armazenados entre 2°C e 25°C. O AUH1017 é armazenado entre 15°C e 25°C.
- Depois de abertos, os reagentes AUH1011, AUH1012 e AUH1013 permanecem estáveis durante 90 dias, se armazenados no compartimento de reagentes ISE do analisador.
- Após a abertura, os reagentes AUH1014, AUH1015, AUH1016 e AUH1018 podem ser armazenados entre 2°C e 25°C até um máximo de 90 dias, desde que a tampa seja colocada imediatamente após cada utilização. Após a abertura, o reagente AUH1017 pode ser armazenado entre 15°C e 25°C até um máximo de 90 dias.

Indicações de deterioração

A existência de turvação ou de precipitação nos líquidos e reagentes de trabalho fechados pode indicar decomposição e são motivo para interromper a utilização. Consulte a secção ISE do manual do utilizador do respetivo analisador AU para obter mais informações.

Colheita e preparação de amostras

A amostra recomendada é soro sem hemólise.

Estabilidade da amostra

Separe o soro das células sanguíneas logo que possível. Evite a hemólise porque pode originar valores K⁺ falsamente elevados. Se tiver de utilizar plasma, os anticoagulantes recomendados são heparina de lítio e heparina de amónio. As amostras de urina devem ser recolhidas num recipiente limpo, à prova de fugas, e não devem ser acidificadas. Se o transporte se atrasar, as amostras devem ser mantidas refrigeradas entre 2°C e 8°C. Os tempos de colheita recomendados para as amostras de urina, para determinação do analito de interesse, são os indicados a seguir.²

Sódio:	colheita de 24 horas
Potássio:	colheita de 24 horas
Cloreto:	colheita de 24 horas

Armazenamento da amostra

O sódio e o potássio permanecem estáveis no soro durante, pelo menos, uma semana, se armazenados entre 2°C e 8°C. O cloreto permanece estável no soro durante uma semana, se armazenado entre 2°C e 30°C. Conserve a amostra num tubo com tampa, se a análise estiver atrasada.² As amostras de urina devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C.

Substâncias interferentes

Determinados anticoagulantes, conservantes, fármacos e compostos organofílicos podem afetar as determinações de eletrólitos. Para mais informações sobre as substâncias interferentes, consulte Young³ para obter uma compilação de interferências relatadas para este teste. As amostras de urina visualmente turvas devem ser centrifugadas antes da análise.² As amostras altamente lipémicas podem apresentar uma diminuição inapropriada dos resultados do sódio, potássio e cloreto devido a deslocação do volume. Estas amostras devem ser ultracentrifugadas e a análise realizada no infranadante (camada transparente média). É preciso ter cuidado aquando da interpretação de resultados de doentes com hiperlipidemia e hiperproteinemia decorrente do efeito de exclusão de eletrólitos.

Procedimento

Materiais fornecidos

ISE Buffer, Mid-Standard, Reference, High Serum Standard, Low Serum Standard, High/Low Urine Standard, Internal Reference Solution e Na⁺/K⁺ Selectivity Check Solution.

Parâmetros analíticos sugeridos

Consulte na secção ISE no manual do utilizador do respetivo analisador AU uma lista completa de parâmetros e procedimentos do ensaio.

Estabilidade da mistura de reação final

O analisador AU da Beckman Coulter calcula automaticamente cada determinação com o mesmo intervalo a 37°C.

Calibração

Consulte a secção ISE do manual do utilizador do respetivo analisador AU para uma lista completa dos procedimentos de calibração recomendados. Este procedimento deve ser utilizado para a calibração diária.

Controlo de qualidade

Durante o funcionamento do analisador AU da Beckman Coulter devem ser testados, pelo menos, dois níveis de um material de controlo de qualidade apropriado, no mínimo uma vez por dia. Além disso, devem ser efetuados controlos após a calibração com cada lote novo de reagente e a seguir aos procedimentos específicos de manutenção ou de resolução de problemas, descritos no manual do utilizador do respetivo analisador AU da Beckman Coulter. Os testes de controlo de qualidade devem ser realizados de acordo com os requisitos regulamentares e de acordo com o procedimento padrão de cada laboratório. Devem ser usados controlos qualificados da urina durante a análise da urina.

Resultados

Os resultados são automaticamente impressos para cada amostra em mEq/L.

Amplitude dinâmica

Os procedimentos do Módulo ISE são lineares nas amostras de soro, plasma ou urina, como indicado a seguir:

Reagentes ISE

Soro		Urina	
Na ⁺	50 – 200 mEq/L	Na ⁺	10 – 400 mEq/L
K ⁺	1,0 – 10,0 mEq/L	K ⁺	2,0 – 200,0 mEq/L
Cl ⁻	50 – 200 mEq/L	Cl ⁻	15 – 400 mEq/L

As amostras superiores ao intervalo dinâmico do ensaio devem ser diluídas com água desionizada e analisadas novamente. Os resultados obtidos devem ser multiplicados pelo fator de diluição para obter a concentração correta para a amostra não diluída.

Valores de referência¹

Soro:	Na ⁺	136 – 145 mEq/L	K ⁺	3,5 – 5,1 mEq/L	Cl ⁻	98 – 107 mEq/L
Urina:	Na ⁺	40 – 220 mEq/dia	K ⁺	25 – 125 mEq/dia	Cl ⁻	110 – 250 mEq/dia

Os valores de referência podem variar em função da idade, sexo, dieta e localização geográfica. As boas práticas laboratoriais ditam que cada laboratório determine os seus próprios valores de referência.

Características de desempenho específico

Os dados seguintes foram obtidos com os reagentes ISE nos módulos ISE dos analisadores AU segundo os procedimentos estabelecidos. Os resultados obtidos nos laboratórios individuais podem ser diferentes.

Precisão⁵

As estimativas de precisão para o soro, com base nas recomendações do CLSI⁴, são compatíveis com o desempenho típico. A precisão no teste é inferior a CV 3% e a precisão total é inferior a CV 5%. Foram realizados ensaios de amostras de controlo de soros e de urina combinados e os dados foram processados de acordo com as diretrizes do CLSI mencionadas anteriormente.

Urina

N = 100				No teste					
Média				DP			CV%		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Nível 1	88	32,1	111,3	0,6	0,3	0,7	0,7	0,8	0,6
Nível 2	182,3	85,8	238,8	0,7	0,5	0,9	0,4	0,6	0,4

N = 100				Total					
Média				DP			CV%		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Nível 1	88	32,1	111,3	0,8	0,3	0,9	0,9	1,0	0,8
Nível 2	182,3	85,8	238,8	1,5	0,9	1,4	0,8	1,1	0,6

Soro⁴

N = 80				No teste					
Média				DP			CV%		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Nível 1	127	3,1	83	0,8	0,03	0,6	0,6	0,9	0,7
Nível 2	153	6,1	115	0,9	0,04	0,8	0,6	0,6	0,7

N = 80				Total					
Média				DP			CV%		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Nível 1	127	3,1	83	1,08	0,03	0,8	0,9	1,1	0,9
Nível 2	153	6,1	115	1,14	0,05	0,9	0,7	0,8	0,8

Comparação de métodos⁵

Foi realizada uma comparação entre os módulos ISE dos analisadores AU da Beckman Coulter com amostras de soro de doentes. A tabela abaixo demonstra o desempenho representativo nos analisadores AU.

Comparação de soro

AU640/640 ⁹ vs. AU600			
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
N	230	230	230
r	0,998	0,999	0,999
inclinação	1,01	0,99	1,01
interseção	0,3	0,12	0,7

AU5800 vs. AU680			
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
N	200	199	199
r	0,9987	0,9995	0,9993
inclinação	0,984	0,990	1,003
interseção	3,24	0,075	0,29

Reagentes ISE

Comparação de urina

As comparações da Beckman Coulter foram realizadas utilizando amostras de urina de doentes. A tabela abaixo demonstra o desempenho representativo nos analisadores AU.

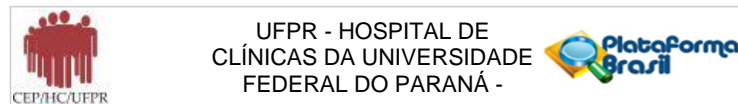
AU640/640 ⁹ /680 vs. AU600			
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
N	184	184	184
r	0,999	0,999	0,999
Inclinação	1,01	0,99	0,99
Interseção	1,5	4,7	-0,4

Referências

1. Tietz, N.W., editor, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Edition, W.B.Saunders 1987.
2. Pesce, A.J., Kaplan, L.A., editors, Methods in Clinical Chemistry, C.V. Mosby Company, 1996.
3. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 5th edition, AACCC Press, 2000.
4. CLSI Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods EP5-A2, 2004
5. Dados em arquivo para analisadores AU específicos.
6. Scott MG, Heusel JW, LeGrys VA, Siggaard-Anderson O. Electrolytes and blood gases. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia:WB Saunders Company, 1999;1061-1062.

Fabricado por: Beckman Coulter, Inc., 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821, EUA

ANEXO A – PARECER ACEITO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DO PARANÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação Entre Os Danos Causados À Célula Pela Irradiação De Hemácias Com A Utilização De Irradiador Especifico Gammacell 1000 E Com Acelerador Linear

Pesquisador: ALETEIA BRANTE MORI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 85057318.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.595.160

Apresentação do Projeto:

Projeto elaborado para obtenção de grau de mestre, da aluna Aletéia Brante Mori no programa de Pós Graduação de Engenharia Elétrica e Informática na Universidade Tecnológica da UFPR. Sendo o orientador Dr. André Luiz Coelho Conceição e co-orientação da Dra. Jaqueline Kappke. Serão necessários para essa pesquisa 10 doadores voluntários de sangue, as doações serão obtidas através do Biobanco do Hospital de Clínicas com autorização dos doadores através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Cada bolsa de concentrados de hemácias serão fracionadas em três bolsas de transferência com igual volume totalizando 30 bolsas para o estudo. As bolsas serão irradiadas com dose total de 25 Gy, e serão utilizados 5 concentrados de hemácias irradiadas no irradiador específico de sangue GAMMACELL 1000 com Césio-137 (raios gama) situado no setor de Radioterapia do Hospital de Clínicas, 5 bolsas irradiadas no acelerador linear (raios-X) do RADION - Instituto de Oncologia e Radioterapia de Curitiba com mesma taxa de dose (ou bem próxima), 5 irradiadas no acelerador linear do RADION com uma taxa de dose maior, 5 irradiadas no acelerador linear do RADION com uma taxa de dose menor e as últimas 10 para serem utilizadas como controle e não serão irradiadas por nenhum processo. Após efetuadas as irradiações das bolsas de hemácias com o acelerador linear e com o aparelho específico Gammacell 1000, as bolsas serão armazenadas no banco de sangue do Hospital de Clínicas durante o período de 28 dias, que é a data de validade de uma bolsa de hemácia irradiada, para a

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br