



**Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa**  
**Universidade Atlântica**

**Dissertação**

**Contribuição para o estudo da Anexina V na Apoptose celular em  
Concentrados de Eritrócitos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ORGANIZAÇÃO E QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Orientador Interno:

Dra. Gracinda de Sousa

Orientador Externo:

Dra. Eugénia de Vasconcelos

Elaborado Por:

Maria Joana Damásio Galhardas

Lisboa



## **Agradecimentos**

Quando chega o momento dos agradecimentos, sinto vontade de dirigir uma palavra a cada um dos meus familiares, amigos e colegas por se mostrarem sempre interessados no meu trabalho e, entre estes, um especial obrigado aqueles que me souberam sempre orientar na direcção correcta.

Assim agradeço:

À minha família e aos meus pais, namorado e irmão em particular pelo apoio constante que me manteve sempre orientado para o sucesso neste trabalho.

Às minhas orientadoras Dra. Gracinda de Sousa e Dra. Eugénia Vasconcelos pela disponibilidade, atenção e profissionalismo, no acompanhamento da elaboração da dissertação.

Ao Dr. Álvaro Beleza, anterior Presidente do Conselho Diretivo do IPS IP e ao Professor Doutor Hélder Trindade, actual Presidente do Conselho Diretivo do IPST, IP pela autorização na elaboração desta dissertação.

À Dra. Matilde Santos, Directora do Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa, por me ter dado a oportunidade de elaborar esta tese no Centro.

À Técnica Coordenadora Maria João Alpoim, especialista de Análises Clínicas e Saúde Pública, pelo incentivo à realização da dissertação da tese de mestrado.

À Andreia Mendonça e ao Alexandre Salvador, da Enzifarma, por se mostrarem sempre receptivos, pelos conselhos e informações disponibilizadas quer pessoalmente quer por e-mail, sem os quais esta tese não era possível.

A todos os meus colegas e amigos, em particular Ivo, Francisco, Andreia e Vanessa que demonstraram sempre um especial interesse pela minha pesquisa e por aturarem instantes de inquietação e de alguma insegurança da minha parte em relação ao meu trabalho em momentos mais difíceis.

....a todos,

Obrigado



## **Dedicatória**

Aos meus pais e irmão.



**Nota prévia:**

A presente dissertação de Mestrado foi redigida de acordo com o antigo acordo ortográfico da língua portuguesa.



## **RESUMO**

A hemoterapia moderna baseia-se na utilização correcta dos diversos componentes sanguíneos, associados a um maior controle de qualidade do sangue, o que a torna mais segura e, actualmente, muitos doentes são beneficiados pois, a transfusão de componentes sanguíneos, em situações várias, está na linha da frente na manutenção da vida e em casos extremos, o último recurso que salva vidas.

A qualidade e a segurança nas transfusões de sangue são grandes preocupações da área médica, autoridades de saúde e doente<sup>1</sup>.

O sangue obtido pelos Centros de Sangue provém de doadores voluntários, dotados de uma enorme sensibilidade social, que periodicamente assumem uma postura benevolenta e altruísta e consequentemente mantêm os bancos de sangue providos de um produto imprescindível no tratamento de diversas patologias. O produto final disponível – concentrado de eritrócitos (CE's), plasma e concentrado plaquetário – tem de assumir um carácter seguro e viável de modo a que os riscos para o doente sejam diminutos<sup>2</sup>.

O controlo de qualidade aplicado a todo o sangue doado realiza provas de conformidade nas unidades com especificações previamente definidas, sendo a hemólise um dos parâmetros importantes na avaliação da qualidade dos concentrados de eritrócitos, pois, pode ocasionar implicações clínicas para o receptor. Para além disso a avaliação da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue doado mostra-se um controlo imprescindível que salvaguarda a qualidade e segurança do componente a transfundir<sup>3,4</sup>.

Até se obter um CE há todo um processo moroso e de responsabilidade vital. Todo o sangue obtido passa por várias etapas fundamentais até à obtenção do componente pretendido (análise, produção e armazenamento). Os CE's obtidos quando armazenados, num ambiente de refrigeração, têm uma vida útil de 42 dias. Após este período, o sangue deve ser inutilizado por se verificar alterações bioquímicas, biomecânicas, e imunológicas nos CE's e por consequência a sua instabilidade vital no que ao tratamento de patologias, para as quais este componente está indicado, diz respeito<sup>5</sup>.

Foi realizado um estudo experimental com o objetivo de avaliar a contribuição da Anexina V na apoptose celular nos concentrados de eritrócitos, constatando a degradação dos mesmos ao longo de todo o período de armazenamento e validar o paradigma que a ciência preconiza: "Os CE's após os 42 dias armazenados, em condições específicas (2 a 6º centígrados), são inviáveis para transfundir"<sup>6,7</sup>.

A avaliação dos níveis de apoptose por citometria de fluxo é geralmente realizada por métodos que utilizam Anexina V como marcador vital, que se associa aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo apoptótico.

**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

A Anexina V é uma proteína humana endógena dependente do ião  $Ca^{+2}$ , amplamente distribuída intracelularmente em altas concentrações na placenta e em concentrações mais baixas nos eritrócitos, plaquetas e monócitos. Apresenta como principal característica a capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido presente na camada interna da bicamada lipídica, que durante a apoptose celular é translocada para a camada externa da membrana celular.

A determinação da Anexina V é normalmente utilizada para verificar se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas por meio de diferenças na integridade da membrana plasmática. Assim, ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas por citometria de fluxo<sup>7</sup>.

Numa amostra de 15 CE's, a qual foi induzida a hemólise, verificou-se, por citometria de fluxo, que a viabilidade deste componente se desvanesce ao longo do tempo, confirmando assim que o tratamento, manuseamento e armazenamento do sangue compromete a vitalidade terapêutica deste insubstituível produto vital.

**Palavras-Chave:** Anexina V, Hemólise, Apoptose, Eritrócitos, Citometria de Fluxo.

## **ABSTRACT**

Modern hemotherapy is based on the correct use of various blood components associated with a better quality control of blood, which makes it safer and currently, many patients benefit from transfusion of blood components, in various situations, is at the forefront in sustaining life and in extreme cases, is the ultimate resource that saves lives.

The quality and safety of blood transfusions are the major concerns in the medical field, health authorities and patients.

Blood collected by blood centers comes from volunteer donors, endowed with enormous social sensitivity, which periodically take a benevolent and altruistic posture and consequently maintain blood banks provided with an essential product for the treatment of various diseases. The final product available - red cell concentrate (RCC), plasma and platelet concentrate must take a safe and viable character so that the risks to the patient are minimal.

Blood Centers quality control performs tests in accordance with previously defined specifications, and hemolysis is one of the important parameters in evaluating the quality of erythrocyte concentrates, because of the clinical implications for the recipient.

In addition the evaluation of hemoglobin (Hg) in blood donated is essential to safeguard the quality and safety of the component to be transfused.

Until a Red Cell Concentrate (RCC) is obtained, there is a whole lengthy process and vital responsibility. Whole blood obtained passes through several key steps to achieving the desired component (analysis, production and storage). RCC when stored in a cooling room, have a shelf life of 42 days. After this period, the blood must be discarded as they face biochemical, biomechanical and immunological changes and vital instability in the treatment of pathologies for which this component is indicated.

An experimental study was conducted in order to verify the contribution of Annexin V in cell apoptosis following their degradation throughout the storage period and to validate transfusion medicine science paradigm that advocates: "RCC after 42 days stored in specific conditions (2-6 degrees Celsius), are not feasible to transfuse".

The evaluation of apoptosis levels of by flow cytometry is usually performed by methods that use Annexin V as a vital marker that is associated with the waste phosphatidylserine, externalized in the early apoptotic process.

**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

Annexin V is an endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  ion dependent human protein with placental intracellular high concentrations and in lower concentrations in erythrocytes, platelets and monocytes. As main characteristic it presents the ability to bind to phosphatidylserine, a phospholipid present in the inner layer of the lipid bilayer that is translocated to the outer layer of cellular membrane during apoptosis.

Determination of Annexin V is usually used to determine if the cells are viable, apoptotic, or necrotic by differences in membrane integrity. Thus, by combining the Annexin V with FITC (fluorescein isothiocyanate) it is possible to identify and quantify apoptotic cells by flow cytometry.

In a sample of 15 RCC, in which hemolysis was induced it was found, by flow cytometry, that the viability of this component vanishes with time confirming that the treatment, handling and storage of blood compromise the vitality of this irreplaceable vital therapeutic product.

Keywords: Annexin V, Hemolysis, Apoptosis, Erythrocytes, Flow Cytometry.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1. Sangue .....	25
1.2. Eritrócito .....	26
1.3. Membrana do eritrócito .....	27
1.4. Morte celular.....	34
1.5. Mecanismos reguladores da apoptose .....	39
1.6. Fosfatidilserina .....	44
1.7. Anexina V .....	45
1.8. Lesão de armazenamento.....	50
1.9. Controlo de qualidade .....	55
1.10. Citometria de fluxo.....	56
<b>2. OBJECTIVOS .....</b>	<b>63</b>
2.1. Objectivo geral.....	63
2.2. Objectivos específicos .....	63
<b>3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....</b>	<b>65</b>
3.1. Metodologia .....	66
3.2. Recolha de dados.....	67
3.3. Pré-aplicação da técnica .....	68
3.4. Aplicação das técnicas.....	72
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>

4.1.	Controlo de qualidade .....	75
4.2.	Aplicação da técnica por citometria de fluxo nas amostras de CE's para determinação de apoptose através da Anexina V .....	80
4.3.	Aplicação da técnica por grau de hemólise nas amostras de CE's .....	81
4.4.	Correlação dos dois métodos Anexina V vs Grau de Hemólise .....	84
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Categorias de alterações celulares que formam a base dos ensaios de detecção da apoptose .....	47
<b>Quadro 2</b> - Requisitos relativos ao controlo da qualidade do sangue e dos componentes sanguíneos .....	55
<b>Quadro 3</b> - Vantagens e desvantagens da Citometria de Fluxo .....	61
<b>Quadro 4</b> - Caracterização da Amostra de estudo .....	67
<b>Quadro 5</b> - Concentrações e volumes de CE's diluídos com Ionóforo de Cálcio .....	69
<b>Quadro 6</b> - Detecção de sinais luminosos com os PMT .....	70
<b>Quadro 7</b> - Média e Desvio Padrão da leitura da apoptose dos eritrócitos por Citometria de Fluxo .....	81
<b>Quadro 8</b> - Média e desvio Padrão da leitura da Hemólise dos eritrócitos pelo método Grau de Hemólise .....	82
<b>Quadro 9</b> - Valores do $R^2$ avaliados durante os 45 dias de armazenamento na correlação dos dois métodos .....	88
<b>Quadro 10</b> - Coeficiente de Correlação de Pearson .....	89

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1</b> - Citometria de Fluxo do Controlo Positivo .....	75
<b>Gráfico 2</b> - Citometria de Fluxo do Controlo Negativo de Estimulação.....	77
<b>Gráfico 3</b> - Controlo negativo de marcação .....	79
<b>Gráfico 4</b> - Média e Desvio Padrão da leitura da apoptose dos eritrócitos por Citometria de Fluxo.....	81
<b>Gráfico 5</b> - Média das leituras da Hemólise dos eritrócitos pelo método Grau de Hemólise.....	83
<b>Gráfico 6</b> - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 5º dia de armazenamento dos CE's .....	84
<b>Gráfico 7</b> - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 30º dia de armazenamento dos CE's .....	85
<b>Gráfico 8</b> - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 35º dia de armazenamento dos CE's .....	86
<b>Gráfico 9</b> - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 42º dia de armazenamento dos CE's .....	87
<b>Gráfico 10</b> - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 45º dia de armazenamento dos CE's.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de componentes sanguíneos, temperatura e armazenamento.....	23
Figura 2 - Membrana plasmática celular.....	28
Figura 3 - Representação esquemática do Modelo do Mosaico Fluído .....	29
Figura 4 - Molécula de fosfatidilcolina.....	30
Figura 5 - Distribuição assimétrica dos fosfolípidos e glicolípidos na bicamada lipídica.....	31
Figura 6 - Organização da Membrana Celular.....	33
Figura 7 - Principais tipos de morte celular.....	35
Figura 8 - Morfologia da apoptose .....	39
Figura 9 - Vias principais da apoptose.....	41
Figura 10 - Via intrínseca e via extrínseca da apoptose.....	42
Figura 11 - Via extrínseca da apoptose .....	43
Figura 12 - Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina .....	50
Figura 13 - Lesão de armazenamento: .....	51
Figura 14 - Esquema da constituição interna de um citómetro de fluxo .....	57
Figura 15 - Representação de uma câmara de fluxo.....	58
Figura 16 – Citometria de Fluxo.....	60



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AIF</b> - do acrónimo inglês <i>apoptosis-inducing factor</i>	<b>FITC</b> – Isotiocianato de fluorescência	<b>PE</b> – Ficoeritrina
<b>Apaf-1</b> - do acrónimo inglês Apoptotic protease activating factor 1	<b>FS</b> – Fosfatidilserina	<b>PerCP</b> - Proteína peridrina clorofila
<b>ASST</b> – Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação	<b>Fs</b> - Forward scattering	<b>PFC</b> – Plasma Fresco Congelado
<b>ATP</b> – Adenosina trifosfato	<b>FSC</b> – Forward scatter	<b>PI</b> - Iodeto de Propídeo
<b>Bcl<sub>2</sub></b> – B-cell lymphoma 2	<b>g</b> – Gramas	<b>PMT</b> - Photomultiplier tube
<b>Bid</b> - do acrónimo inglês <i>Bcl intercatyng domain</i>	<b>Ge</b> -	<b>PS</b> - do acrónimo inglês phosphatidylserine
<b>Ca<sup>2+</sup></b> - Cálcio	<b>Gv</b> – Globulos vermelhos	<b>RNTS</b> – Rede Nacional de Transfusão Sanguinea
<b>CE's</b> – Concentrado de eritrócitos	<b>ISNT</b> - In situ nick translation	<b>RPM</b> – Rotações por minuto
<b>CO<sub>2</sub></b> – Dióxido de carbono	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> - Aniões bicarbonatos	<b>SS</b> - Side scattering
<b>CPD</b> – Citrate Phosphate Dextrose	<b>Hg</b> – Hemoglobina	<b>SAG-M</b> – Saline Adenine Glucose Mannitol
<b>CPD-A</b> – Citrate Phosphate Dextrose Adenine	<b>HIV</b> – Virus da Imunodeficiência Humana	<b>SMAC/DIABLO</b> – do acrónimo inglês Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding
<b>CST</b> – Centro de Sangue e Transplantação	<b>HTLV</b> - Vírus linfotrópico da célula humana	<b>SIDA</b> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>DISC</b> - do acrónimo inglês death-inducing signaling complex	<b>INS</b> – Instituto Nacional de Saúde	<b>SSC</b> - side scatter
<b>dl</b> – decilitros	<b>IPS</b> – Instituto Português de Sangue	<b>ST</b> – Sangue total
<b>DM</b> – Dominio da morte	<b>IPST</b> – Instituto Português de Sangue e Transplantação	<b>TNF</b> - do acrónimo inglês tumor necrosis factor
<b>DNA</b> – Ácido Desoxirribonucleico	<b>L</b> – litros	<b>TRADD</b> - do acrónimo inglês Tumor Associated Death Domain
<b>DPG</b> - Difosfoglicerato	<b>Mg<sup>+</sup></b> - Magnésio	<b>TRIM</b> - Transfusion Related Immunodulation
<b>EM</b> – Esfingomielina	<b>ml</b> – mililitros	<b>TUNEL</b> - Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
<b>FADD</b> - do acrónimo inglês <i>Fas Associated Death Domain</i>	<b>mm<sup>3</sup></b> – milímetros cubicos	<b>Unid.</b> – Unidade
<b>FC</b> – Fosfatidilcolina	<b>Nº.</b> – Número	<b>°C</b> – Graus centigrados
<b>FE</b> – Fosfatidiletanolamina	<b>Na<sup>+</sup></b> - Sódio	
<b>FI</b> – Fosfatidilinositol	<b>NK</b> - Natural Killer Cell	
	<b>nm</b> – Nanometros	
	<b>NO</b> - Nobélio	
	<b>K<sup>+</sup></b> - Potássio	
	<b>Kda</b> – Kilodaltons	
	<b>PARP-1</b> - do acrónimo inglês poly-ADP ribose polymerase 1	
	<b>PCM</b> - do acrónimo inglês Programmed Cell Death	



## **1. INTRODUÇÃO**

O sangue, sempre motivou um fascínio particular no ser humano desde as civilizações mais antigas até à sociedade moderna. Mas foi apenas no princípio do século XX que a prática da transfusão sanguínea se iniciou, tendo sido alvo de uma considerável evolução científica.

Ligada a uma forte vertente sociocultural e cada vez mais dependente de complexas exigências técnicas e legais, a transfusão sanguínea faz actualmente parte da prática clínica, sendo impensável prescindir da sua utilização num número considerável de situações<sup>8</sup>.

O sangue, como tecido imprescindível e vital, comporta características distintas e exclusivas de raças, etnias, grupos, e comunidades sociais, o que o torna ainda mais complexo e “precioso” no restabelecimento da saúde. Estas diferenças asseguram uma especificidade importante na medida em que as transfusões sanguíneas têm de assumir um risco diminuto para o doente que é sujeito a esta prática<sup>9</sup>.

Por detrás de uma transfusão de sangue, processo vital para quem dela necessita, existe todo um conjunto de procedimentos, técnicas e atuações que salvaguardam o rigor e segurança resultando numa maior eficiência na diminuição da morbilidade/mortalidade humana. O produto final disponível – Concentrado de eritrócitos (CE's), Concentrado de plaquetas e Plasma – tem de assumir um carácter seguro e viável de modo a que os riscos para o doente sejam diminutos.

Portugal integra o grupo dos países que dispõem de sistemas modernos de abastecimento de sangue doado por dadores voluntários e não remunerados. Independentemente do modo como cada país ou região organiza o seu próprio sistema, o objectivo é essencialmente o mesmo: assegurar a disponibilidade, a qualidade e a segurança dos componentes utilizados na transfusão<sup>10</sup>.

Em Portugal o setor é composto por uma Rede Nacional de Sangue, constituída por Serviços de sangue hospitalares e o Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST)<sup>10;11</sup>.

É pertinente verificarmos o percurso que o Instituto Português do Sangue (IPS) percorre até chegar ao Organismo Público atual.

Em 1958 é criada a primeira estrutura orgânica responsável pela área do sangue, designada por Instituto Nacional de Sangue (INS). No entanto, esta Entidade não resulta como se pretende e, em 1976, um grupo de profissionais de conceituada idoneidade e respeitando as instituições interessadas, elabora um esboço da futura Rede Nacional de Transfusão Sanguínea (RNTS).

Nos anos 80 começam a emergir alguns problemas, tais como a falta de sangue, a emergência de novas doenças transmissíveis pelo sangue (como por exemplo a SIDA), o que começa a dar relevo à ausência de uma organização, a nível nacional, que fosse capaz de gerir estes impasses.

Neste seguimento, há um grande desenvolvimento na investigação médica e tecnológica neste setor, o que levou a um aperfeiçoamento da terapêutica transfusional. Começa, também, a desenvolver-se a estrutura de prestação de cuidados de saúde, bem como a distinguir-se a diferenciação e sofisticação técnicas médicas e cirúrgicas, o que conduz a uma maior necessidade de componentes sanguíneos.

No entanto, este tipo de terapêutica sanguínea, pela sua complexidade e exigências científicas, bem como técnicas de segurança exigidas, acaba por determinar como imprescindível a definição rigorosa de regras a aplicar desde a colheita à administração terapêutica. Assim, a 21 de Setembro de 1990, surge a publicação do DL que regulamenta a Lei 25/89, que cria o Instituto Português do Sangue (IPS), com atribuições e competências específicas. O IPS aparece como um organismo público, com personalidade jurídica e autonomia técnica, administrativa e financeira, que integra a rede de serviços personalizados do Ministério da Saúde<sup>11</sup>.

Em 2012 o Instituto Português do Sangue passa a designar-se Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP (IPST, IP). Acolhe as atribuições dos três Centros de Histocompatibilidade, e por outro lado, absorveu as atribuições ao nível da colheita e da transplantação e de investigação científica nos domínios do sangue e da transplantação antes integradas na Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST), extinta por processo de fusão<sup>11</sup>.

O IPST, IP é formado por três Centros de Sangue e Transplantação localizados no Porto, Coimbra e Lisboa em que o denominador comum inclui a colheita de sangue e a produção de componentes sanguíneos como os concentrados de eritrócitos para posterior distribuição por Instituições de Saúde Públicas/Privadas que os podem solicitar para aplicar em transfusão<sup>11</sup>.

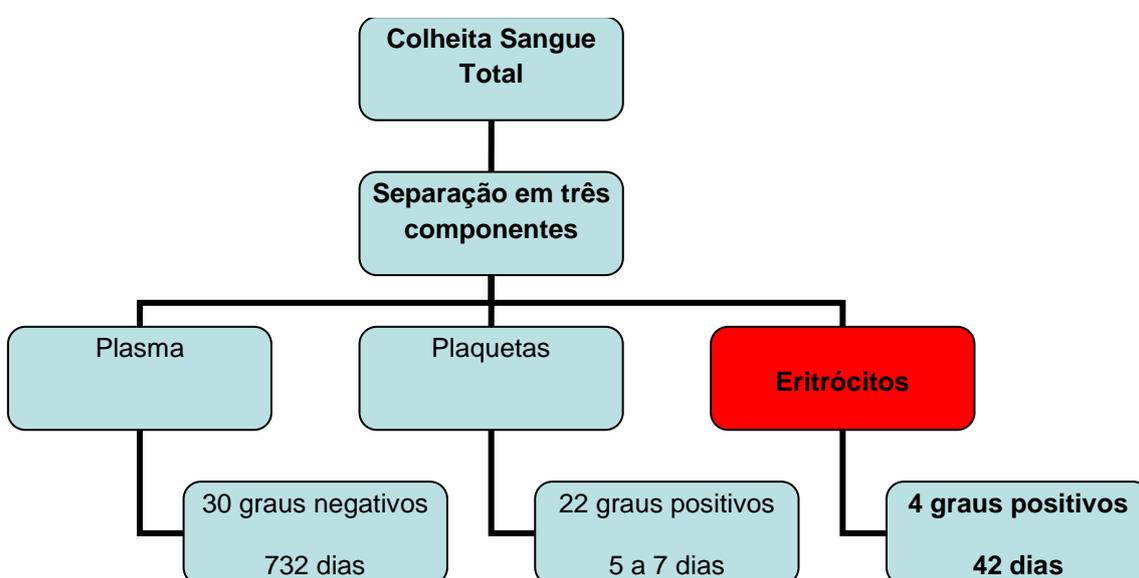
A doação de sangue é um acto voluntário que salva muitas vidas. É importante que pessoas saudáveis desenvolvam o hábito de doar regularmente, pois a ciência, apesar das tentativas e dos avanços alcançados, ainda não descobriu um substituto artificial eficiente para o sangue humano. Diversas situações de emergência e procedimentos médicos carecem de um fornecimento regular e seguro do sangue e seus componentes<sup>12</sup>.

Em cada dádiva são colhidos em média 450 ml de Sangue Total (ST) para o saco mãe e são também colhidos amostras de sangue para os tubos para realização dos exames obrigatórios –

determinação do grupo sanguíneo (AB0) e Rh(D), pesquisa de anticorpos eritrocitários irregulares e testes para a detecção de marcadores de hepatite B, hepatite C, sífilis, HIV 1/2 e HTLV1/2. Todo o material utilizado na doação é estéril, descartável e de uso único e de circuito fechado<sup>11;12;13</sup>.

O sangue colhido é separado em Plasma, Plaquetas e Eritrócitos, após a separação é armazenado conforme o componente específico, assim pode-se administrar apenas o componente precioso que o doente necessita, aproveitando da melhor forma possível as dádivas de sangue, efectuam-se vários procedimentos para a separação dos componentes do Sangue Total, o que permite uma conservação maior e a sua utilização com fins mais específicos<sup>12;13</sup>.

**Figura 1** - Produção de componentes sanguíneos, temperatura e armazenamento



Em primeiro lugar, centrifugam-se os sacos de Sangue Total para que os glóbulos vermelhos se depositem na parte inferior, logo a seguir fica a camada Leuco-plaquetária e depois o Plasma, após expressão do saco mãe consegue-se obter cada componente individualizado. Obtém-se assim um saco de concentrado de eritrócitos (CE's), que deve ser conservado a 4°C num máximo de 42 dias após colheita<sup>i</sup>, outro saco com o Plasma Fresco Congelado (PFC) é conservado a -30°C durante 732 dias, e as plaquetas são conservadas a 22°C durante 5 ou 7 dias em agitação constante, (plaquetas com 7 dias de validade são submetidas a redução patogénica)<sup>13;14</sup>.

<sup>i</sup> Entre 2 a 6°C num máximo de 42 dias após colheita (o tempo de armazenamento depende da solução de anticoagulante utilizada, com CPD ou CPD-A 1 o tempo de armazenamento é de 35 dias após colheita, com SAG-M o tempo de armazenamento é de 42 dias após colheita.

Os glóbulos brancos são retirados por filtração ou desleucocitação, processo esse que é efectuado através de um filtro, ou seja, os componentes sofrem a redução leucocitária.

Os componentes são sujeitos a um controlo de qualidade que garantem a fiabilidade e segurança destes produtos.

O controlo dos CE's, por exemplo, passa por métodos e técnicas laboratoriais específicas e modernas de forma a verificar e validar o componente sanguíneo. A hemoglobina e a determinação dos leucócitos residuais, são procedimentos de rotina para estes componentes. Para além disso a verificação do grau de hemólise é fundamental no controlo de qualidade dos CE's<sup>ii</sup>.

A hemólise dos eritrócitos pode ocorrer devido a lesões durante o armazenamento do CE ou por trauma mecânico no processo transfusional, podendo levar o paciente à exposição de efeitos deletérios da molécula de hemoglobina livre no plasma.

A hemólise é a ruptura da membrana das células vermelhas do sangue, causando a libertação de hemoglobina e outros constituintes internos para o fluido circundante (plasma) e é visualmente detectável mostrando uma cor avermelhada no soro ou plasma<sup>15</sup>.

A hemólise pode ocorrer a partir de duas fontes<sup>15;16</sup>:

- ✓ Hemólise in vivo pode ser devida a condições patológicas, tais como anemia hemolítica auto-imune ou reação adversa à transfusão.
- ✓ Hemólise in vitro pode ser devido à inadequada colheita da unidade, processamento, ou transporte/armazenamento.

Além da determinação da hemoglobina livre, a determinação dos níveis de potássio (K<sup>+</sup>) livre no plasma, um íão normalmente intracelular, serve também como um outro marcador bioquímico indicativo de hemólise, quando detectado acima dos níveis normais<sup>17</sup>.

O grau de hemólise poderá ser avaliado de acordo com os seguintes parâmetros<sup>17</sup>:

- Hemoglobina livre (g/dL) no plasma dos concentrados de eritrócitos;
- Percentagem de hemólise (%);
- Potássio livre no plasma (mmol/L) dos concentrado de eritrócitos

---

<sup>ii</sup> Directiva 2004/33/Comunidade Europeia da Comissão de 22 de Março de 2004 que dá execução à Directiva 2002/98/Comunidade Europeia do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita a determinadas exigências técnicas relativas ao sangue e aos componentes sanguíneos

## **1.1. Sangue**

Designa-se por sangue o líquido orgânico que, graças ao impulso cardíaco, circula por um sistema de vasos sanguíneos do corpo, com o objetivo de manter as funções vitais dos tecidos e dos diferentes órgãos<sup>9</sup>.

O sangue é pois um tecido conjuntivo líquido formado por diversos tipos de células, que constituem a parte "sólida" do fluido, cada tipo com anatomia e funções próprias; imersas numa parte líquida denominada plasma, que representa 55% do volume sanguíneo e, por sua vez é composto por água em 90%<sup>9;18</sup>.

As células sanguíneas, que supõem os restantes 45% são classificadas em três grupos básicos<sup>9;18;19</sup>:

### ➤ **Glóbulos vermelhos**

Também denominados de hemácias ou eritrócitos, são as células sanguíneas mais abundantes, pois cada mililitro (mL) de sangue contém, em média, cerca de 4,5 a 5 milhões de glóbulos vermelhos. Falaremos em mais detalhe posteriormente.

### ➤ **Glóbulos Brancos**

Também denominados leucócitos, são muito menos numerosos que os glóbulos vermelhos, entre 4 000 a 10 000 por mm<sup>3</sup>, e muito mais variados quanto à forma e tamanho. Fazem parte do sistema imunitário que protege o organismo das infeções e podem agir mediante vários mecanismos, pois enquanto uns permanecem boa parte da sua vida ativa no sangue, outros abandonam o aparelho circulatório para se inserirem nos diversos tecidos orgânicos, de modo a exercer a sua ação defensiva contra agentes estranhos. Todos os glóbulos brancos contêm um núcleo e alguns têm um núcleo com uma forma que, através da sua observação pelo microscópio, aparenta ter inúmeros lóbulos, o que justifica a distinção de dois tipos de leucócitos - os polinucleares e os mononucleares.

### ➤ **Plaquetas**

Igualmente denominadas como trombócitos, são os elementos corpusculares mais pequenos do sangue, de apenas 1,5 a 2 micrones de diâmetro. São células incompletas, porque carecem de núcleo, e a sua concentração oscila entre 150 000 e 300 000/mm<sup>3</sup> de sangue. As plaquetas têm uma vida média de cerca de dez dias e são responsáveis pela coagulação sanguínea e reconstrução vascular.

Em média, cada adulto tem cerca de 5 a 7 litros de sangue em circulação, compreendendo cerca de 10% do peso corporal total. A circulação do sangue por todo o corpo tem a função crucial de manutenção da vida do organismo no que concerne ao transporte de nutrientes, produtos excretados (metabolitos), oxigénio e dióxido de carbono, hormonas, anticorpos, e demais substâncias ou corpúsculos cujos transportes se façam essencialmente entre os mais diversos e mesmo remotos tecidos e órgãos do organismo<sup>19;20</sup>.

## **1.2. Eritrócito**

As células presentes em maior número no sangue são os glóbulos vermelhos (Gv), também chamados hemácias ou eritrócitos. São células anucleadas, ou seja, não possuem núcleo (sendo portanto, desprovidas de DNA), têm a forma de um disco bicôncavo, o que lhes permite uma elasticidade e uma deformabilidade importantes, conseguindo assim passar pelos capilares mais estreitos<sup>20</sup>.

A cor vermelha distinta do sangue é o resultado da hemoglobina nos glóbulos vermelhos. A hemoglobina, é um pigmento que contém ferro e é responsável pela função essencial dos eritrócitos: transportar o oxigénio dos pulmões para os tecidos do organismo e aí captar o produto residual do metabolismo celular, o dióxido de carbono, para ser reconduzido e permitir a sua expulsão para o exterior através da respiração.

O hematócrito, ou a percentagem de sangue total, representa o índice da concentração dos glóbulos vermelhos. Quando se diz que uma pessoa tem o hematócrito de 40 significa que 40% do volume sanguíneo são células vermelhas e o restante corresponde ao plasma.

Para dar uma melhor representação específica da distribuição dos diversos componentes do sangue para cada 600 Gv, existem aproximadamente uma célula de glóbulos brancos e 40 de plaquetas<sup>21</sup>.

Os Gv, após os 120 dias, em média, são destruídos no fígado, onde ocorre a quebra das moléculas de hemoglobina e a disponibilização dos aminoácidos para a síntese de novas proteínas. A maior parte do ferro presente na hemoglobina pode retornar à medula óssea, local de formação de novos eritrócitos<sup>21</sup>.

### **1.3. Membrana do Eritrócito**

A membrana eritrocitária é uma das membranas mais conhecidas em termos de estrutura, função e genética. Como qualquer membrana plasmática, tem como função mediar transportes e, ainda, fornece ao eritrócito resistência e maleabilidade<sup>22</sup>.

A membrana do eritrócito é o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelos. As membranas plasmáticas de um modo geral apresentam-se como barreiras seletivas que asseguram a composição interna constante das células, através do controle da transferência ativa e passiva de inúmeras moléculas. Estas membranas têm um sistema estrutural complexo, citoesqueleto, que envolve tanto a forma da célula, como a sua mobilidade, deformabilidade e o transporte de macromoléculas. Entre os diferentes constituintes da membrana apresentam-se receptores envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e fenómenos de adesão celular<sup>23</sup>.

Citando Murado, P. e coautores, “o eritrócito ou hemácia não é um simples “saco” que contém hemoglobina. Os lípidos e proteínas estão dispostos na superfície do eritrócito de forma tão complexa que são comparáveis com os mais sofisticados mosaicos bizantinos”<sup>24</sup>.

Neste sentido as membranas biológicas variam na sua composição, no entanto existem diversas atividades e propriedades comuns a todas elas, desempenhando quatro funções principais na célula:

- ✓ 1º e mais importante, envolvendo toda a célula, definindo o seu limite e agindo como uma barreira de permeabilidade que limita o movimento de substâncias para dentro ou para fora delas. Em eucariotos, além da membrana plasmática, existem ainda as membranas que revestem organelas como as mitocôndrias e o núcleo, actuando como barreiras para que não haja troca de conteúdos com o citoplasma<sup>25</sup>.
- ✓ 2º As membranas organizam e compartimentalizam atividades específicas dentro e ao redor das células através da sua associação com proteínas específicas<sup>25</sup>.
- ✓ 3º Regulam o transporte tanto ativo quanto passivo de moléculas para dentro e para fora das células e entre as organelas e o citoplasma. Essa atividade é regulada por proteínas específicas embebidas na membrana e que permitem a passagem seletiva de íões, glicose e outras moléculas pequenas<sup>25;26</sup>.

**Maria Joana Damásio Galhardas**

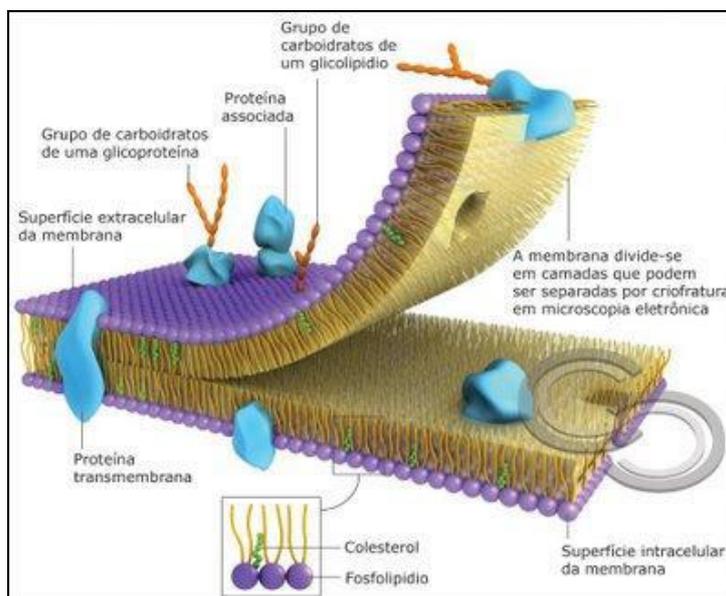
---

- ✓ 4º A membrana plasmática recebe sinais externos, principalmente de outras células. Na maioria dos casos, são sinais extracelulares na forma de pequenas moléculas ou proteínas que são detectadas por receptores presentes na membrana, resultando em mudanças na célula<sup>25</sup>.

A membrana plasmática, por sua vez, é constituída por duas camadas de moléculas lipídicas intercaladas com proteínas responsáveis pela função celular, com espessura aproximada de 7,5 nm a 10 nm e funciona como uma barreira de permeabilidade, permitindo à célula manter um meio químico apropriado para seus processos metabólicos, regulando o volume citoplasmático e transferindo informações sob a forma de sinais químicos e elétricos<sup>27</sup>.

Todas as membranas biológicas são formadas por uma dupla camada de fosfolipídios e por proteínas unidas por ligações covalentes que se comportam segundo o modelo de Mosaico Fluido, descrito por Singer e Nicolson, em 1972 (Figura 1)<sup>28</sup>.

**Figura 2 - Membrana plasmática celular**

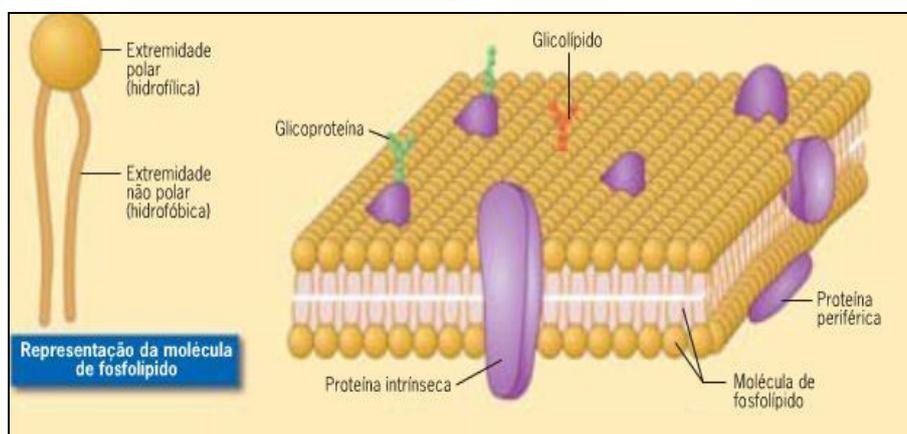


Fonte: <http://fisiando.blogspot.com.br/search/label/Fisiologia%20Humana>

Todas as membranas celulares, incluindo a membrana plasmática, organelas celulares e vesículas intracelulares são compostas pelo mesmo material. Diferentes formas de lipídios existem para fornecer suporte, estrutura e função para a membrana<sup>27</sup>.

Campbell afirma que “o modelo do Mosaico Fluido” é a descrição de membranas biológicas mais aceite atualmente. O Termo “*mosaico*” sugere que dois componentes existem lado a lado sem formar nenhuma outra substância de natureza intermediária. Por exemplo, não há formação extensa de complexo lípido-proteico. Em vez disso, a estrutura básica de uma membrana biológica é a de uma bicamada lipídica, na qual as proteínas estão embebidas. Tais proteínas tendem a ter uma orientação específica na membrana. O termo “*Mosaico Fluido*” implica que algum tipo de movimento lateral ocorre nas membranas, (...). As proteínas *flutuam* na camada lipídica e movem-se ao longo do plano da membrana”<sup>29</sup>.

**Figura 3** - Representação esquemática do Modelo do Mosaico Fluido

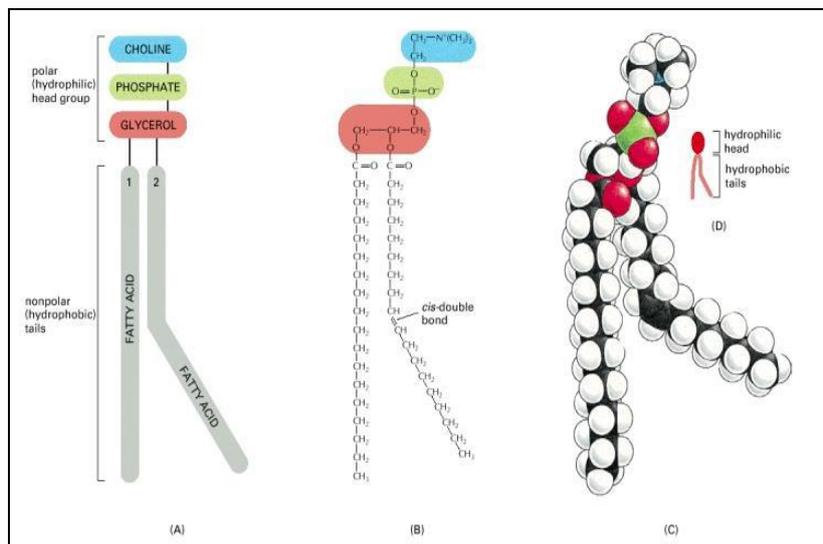


Fonte: <http://acienciadomomento.blogspot.pt/2012/03/modelo-de-mosaico-fluido.html>

### 1.3.1. Bicamada Lipídica

A bicamada lipídica fornece a estrutura básica de todas as membranas celulares. As moléculas lipídicas presentes na membrana plasmática são de caráter anfifílico, ou seja, possuem uma parte da molécula hidrofílica polar e outra parte hidrofóbica, apolar. Os lípidos mais abundantes na bicamada lipídica são os fosfolípidos, que possuem uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos apolares. Uma cauda, tipicamente possui uma ou mais ligações insaturadas (duplas) do tipo *cis*, enquanto que a outra cauda não possui esse tipo de ligação, sendo saturada. Cada ligação *cis* cria uma pequena torção na cauda (Figura 3). Por isso, as diferenças no comprimento e na saturação das cadeias lipídicas influenciam no modo como as moléculas fosfolipídicas se acoplam umas com as outras, contribuindo para a fluidez da membrana<sup>30</sup>.

Figura 4 - Molécula de fosfatidilcolina<sup>iii</sup>



Fonte: Alberts, 2002.<sup>31</sup>

Os principais lípidos presentes na membrana celular são os fosfolípidos, o colesterol e os glicolípidos. A sua distribuição pelas duas camadas é assimétrica, o que pode reflectir as diferentes funções das duas superfícies da membrana. Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas e dispõem-se em bicamada com a porção hidrófoba, não polar (cauda dos ácidos gordos) dirigida para o centro da membrana e com a porção hidrofílica, polar (cabeça com terminal fosfato) direccionada para o exterior ou interior da célula. Os fosfolípidos mais abundantes são os fosfolípidos ligados à colina (Fosfatidilcolina e Esfingomiéline) e os aminofosfolípidos (Fosfatidilserina e Fosfatidiletanolamina). O Fosfatidilglicerol, o Fosfatidilinositol e a Cardiolipina são também importantes mas estão presentes em menores quantidades<sup>29</sup>.

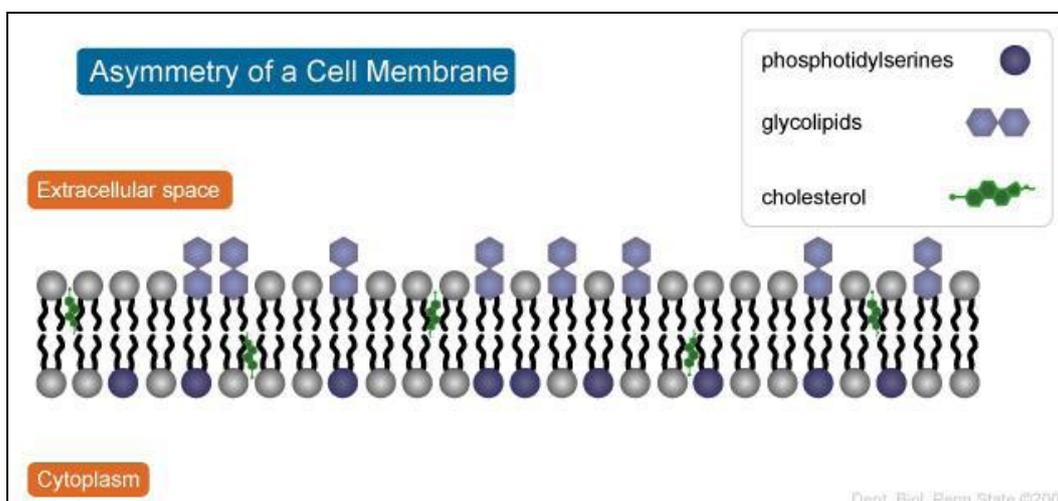
Assim, a composição química da membrana lipídica resume-se principalmente ao colesterol livre e fosfolípidos. Os fosfolípidos, por sua vez, são constituídos pelos seguintes elementos:

- Fosfatidilcolina (FC): 28%
- Fosfatidiletanolamina (FE): 27%
- Esfingomiéline (EM): 26%
- Fosfatidilserina (FS): 13%
- Fosfatidilinositol (FI): 4%
- Pequenos fosfolípidos: 2%

<sup>iii</sup> Nota: (A) representação esquemática; (B) representação por fórmula química; (C) por modelo de estrutura tridimensional; e (D) representação simbólica.

As duas metades da bicamada frequentemente possuem composições diferentes de moléculas de fosfolipídios e glicolipídios (Ilustração 4)<sup>30</sup>. Na camada externa da bicamada lipídica, pode-se encontrar principalmente fosfolipídios como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, enquanto que na camada interna, encontram-se glicolipídios, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina<sup>32</sup>. Já as proteínas, são embebidas na bicamada com orientações específicas cruciais para a sua função. A assimetria dos lipídios é estabelecida durante a sua produção, para que a membrana cresça por igual, sendo para isso, uma proporção dos lipídios recém-sintetizados, transferida para a monocamada oposta. Essa transferência é catalisada por enzimas chamadas flipases, que transferem seletivamente moléculas de fosfolipídios para sua respectiva monocamada, fazendo com que cada uma tenha sua concentração específica de fosfolipídios<sup>33</sup>.

**Figura 5** - Distribuição assimétrica dos fosfolipídios e glicolipídios na bicamada lipídica<sup>iv</sup>



Fonte: PennStateUniversity, 2012

Estruturalmente, o colesterol livre, a fosfatidilcolina e esfingomiéline estão localizadas principalmente na camada externa da dupla membrana, enquanto que a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão presentes na camada interna, do lado citoplasmático.

As proteínas que constituem a membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais ou transmembranárias e por periféricas ou extramembranárias, sendo estas responsáveis pela forma bicôncava dos glóbulos vermelhos<sup>32</sup>.

<sup>iv</sup> Fosfolipídios e glicolipídios têm distribuição assimétrica na bicamada lipídica da membrana plasmática. As moléculas de glicolipídios encontram-se na monocamada externa da membrana plasmática, enquanto que os fosfolipídios como a fosfatidilserina encontram-se na monocamada interna, e moléculas de colesterol apresentam-se distribuídos entre as duas camadas.

As proteínas integrais atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Fazem parte destas proteínas de transporte a Banda 3, denominada proteína transportadora de iões, e as Glicoforina A, B, C e D, que possuem recetores de membrana e antigénios que participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana<sup>33</sup>.

A Glicoforina A apresenta-se em maior concentração, correspondendo a 2%-4% das proteínas de membrana, o seu peso molecular é de 16 KDa. É composta em grande parte por carboidratos. Expressa os determinantes antigénicos do grupo ABO.

A Glicoforina B é uma glicoproteína transmembranária de 10 KDa. Expressa determinantes antigénicos S e s.

A Glicoforina C é o menor componente proteico da membrana eritrocitária, É uma proteína de 35 KDa. As Glicoforinas C e D definem os grupos sanguíneos Gerbich: Ge:1; Ge:2; Ge:3 e Ge:4.

As Glicoforinas apresentam-se, também, como elementos recetores utilizados pelos protozoários da Malária (*Plasmodium Falciparum*) para se fixarem e penetrarem no eritrócito. As pessoas que apresentam carência de Glicoforinas na composição da membrana eritrocitária são resistentes às infecções de *Plasmodium Falciparum*<sup>32</sup>.

A proteína Banda 3, *anion exchanger 1* é a mais volumosa e a principal das proteínas integrantes na membrana do eritrócito. O seu peso molecular é de 102KDa. Representa 25%-30% de todas as proteínas e tem em torno cerca de  $10^6$  cópias por eritrócito. Esta proteína, tem como função servir como "canal" para a troca passiva de aniões através da membrana. Actua na excreção de CO<sub>2</sub> dos tecidos, regulando também o transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (aniões bicarbonatos)<sup>34</sup>.

As proteínas periféricas formam o citoesqueleto da membrana, constituindo-se, principalmente por Espectrina, Actina, Anquirina e por fim a proteína 4.1 e 4.9.<sup>24</sup>

A Espectrina é a mais abundante proteína periférica do citoesqueleto, é uma proteína flexível e fibrosa, constituída por duas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$ . Apresenta peso molecular de 285 KDa. Esta proteína serve de sustentação à membrana e é responsável pelo fenómeno dos fantasmas eritrocitários.

A Espectrina está ligada à superfície interna da membrana por meio de ligações não covalentes a uma outra proteína, a Anquirina, que por sua vez se liga à proteína Banda-3. A porção terminal da Espectrina liga-se a duas outras proteínas: actina e a tropomiosina, ambas envolvidas na contratilidade do eritrócito<sup>35</sup>.

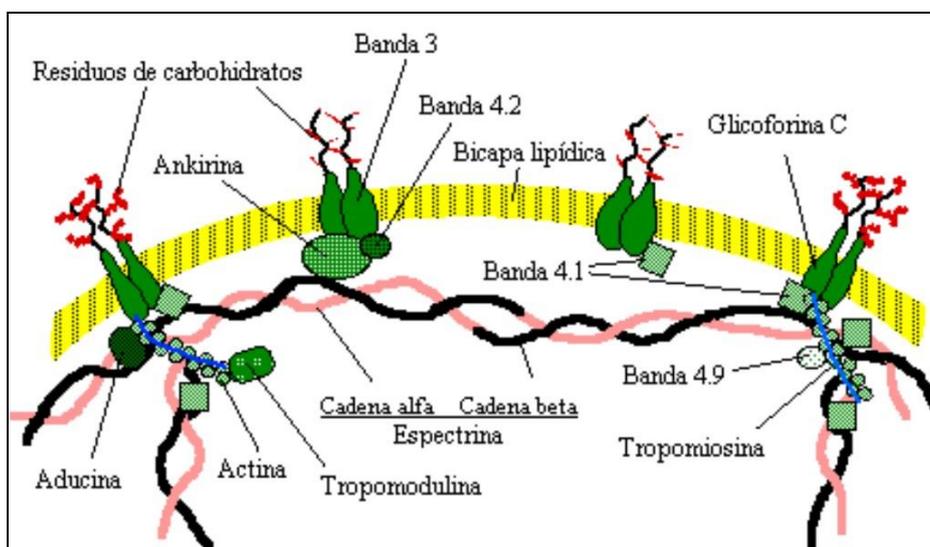
**Maria Joana Damásio Galhardas**

A Anquirina possui três domínios estruturais, o domínio funcional, que se liga à subunidade  $\beta$  da Espectrina, um segundo domínio funcional que interage com a Banda-3, e por fim, um domínio regulador que controla a função dos dois precedentes. Esta proteína tem peso molecular 434 Kda<sup>35</sup>.

A Proteína 4.1 possui peso molecular de 97 KDa e é integrante de uma família de proteínas definidas sobre a membrana do eritrócito como “organizadoras” do sistema de aderência. A maior ponte de ligação da banda 4.1 na membrana do eritrócito é com a Glicoforina C e D.

A proteína 4.9 é fosforilada por várias proteínas quinases do eritrócito e apresenta peso molecular de 46 Kda<sup>35</sup>.

**Figura 6 - Organização da Membrana Celular**



Fonte: <http://epidemiologiamolecular.com/membrana-citoplasmatica/>

As proteínas periféricas, pela sua disposição espacial na membrana, facilitam o movimento de substratos e co-fatores de dentro para fora da célula e vice-versa. Dois desses importantes sistemas enzimáticos são o Sódio ( $\text{Na}^+$ ), Potássio ( $\text{k}^+$ ) – ATPase e Cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), Magnésio ( $\text{Mg}^{++}$ ) – ATPase.

O primeiro sistema, conhecido por Bombas de Sódio – Potássio regula a quantidade de Sódio e Potássio no eritrócito, ou seja, o aumento de Sódio sem a perda de Potássio causa um ganho de água na célula, fazendo-a aumentar o volume, e conseqüente Hemólise, enquanto que o aumento de Potássio produz a sua retração ou encolhimento.

O segundo sistema, conhecido por Bomba de Cálcio, expulsa o Cálcio para fora da célula, evitando o aumento da sua concentração intracelular. O Cálcio está envolvido na regulação e estabilização da estrutura fosfolipídica da membrana. Concentrações elevadas de Cálcio no interior da célula produz alterações da sua forma<sup>36</sup>.

Fizeram-se grandes avanços no conhecimento da bioquímica das membranas biológicas, atualmente o homem tem a compreensão dos princípios básicos da dinâmica e da estrutura das membranas, porém a vida é diversificada, apresentando variadas formas e constituição química nem sempre semelhantes, sendo muitas vezes diferente e específica<sup>36;37</sup>.

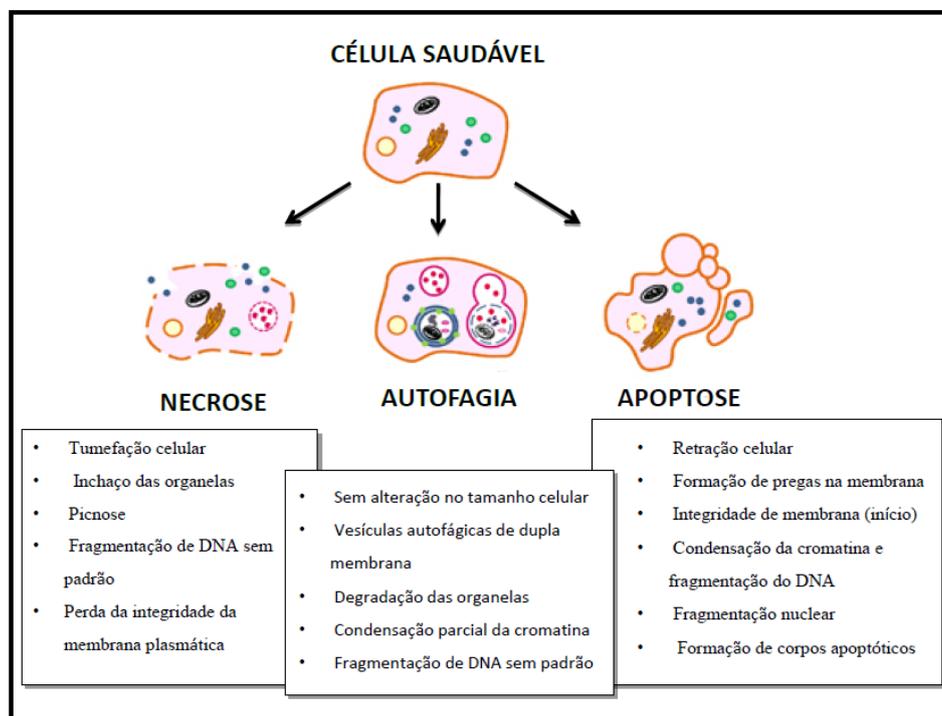
#### **1.4. Morte Celular**

A reação da célula a qualquer tipo de mudança nas suas condições endógenas ou exógenas envolve respostas complexas que eventualmente levam à adaptação celular e à sobrevivência, ou à iniciação e execução da morte celular<sup>34</sup>. Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo e de carácter degenerativo que ocorria em situações de lesão celular, infecção ou ausência de fatores de crescimento. Entretanto, hoje é sabido que nem toda a morte celular ocorre por um processo passivo, pois organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada em resposta a estímulos intra ou extracelulares<sup>39</sup>.

Os mecanismos de morte celular são essenciais como estratégia defensiva para remover células mutadas ou infetadas, como fenómenos de citotoxicidade, ou ainda, para um desenvolvimento embrionário normal.

Actualmente, são descritos na literatura três principais tipos de morte celular, a necrose, a autofagia e a apoptose (Figura 6)<sup>39;40</sup>. Além destas, tem crescido o número de estudos envolvendo outros tipos de morte celular menos conhecidos, como a mitose catastrófica e a necroptose<sup>41</sup>, a netose<sup>42</sup> e a anoikis<sup>43</sup>.

**Figura 7** - Principais tipos de morte celular. Principais características morfológicas da necrose, apoptose e autofagia



**Fonte:** Long, J. S.; Ryan, K. M. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*, 2012.

#### 1.4.1. Necrose

A necrose é tradicionalmente considerada um tipo de morte celular não programada e não sujeita a regulações celulares. Normalmente, a necrose é resultado de circunstâncias externas à célula como agentes infecciosos, radiação, fármacos ou agentes químicos<sup>44</sup>.

Morfológicamente, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular e das organelas, condensação da cromatina e ruptura da membrana plasmática, o que leva à desorganização do citoplasma e à liberação dos componentes celulares. O extravasamento do conteúdo celular causa dano às células vizinhas e, por fim, gera uma importante resposta inflamatória tecidual local<sup>45</sup>.

Além disso, as células necróticas são caracterizadas pela produção de espécies reativas de oxigênio, depleção de adenosina trifosfato (ATP), desregulação do equilíbrio do cálcio, ativação de proteases como as calpaínas e catepsinas e ruptura lisossomal. Vale ressaltar que nenhuma das alterações citadas acima serve como um marcador bioquímico ou imunológico específico para caracterizar a necrose. Por esse motivo, sua avaliação, normalmente, é feita por exclusão dos demais tipos de mortes celulares ou através de avaliação morfológica<sup>44</sup>.

Trabalhos recentes sugerem que pelo menos uma parcela das mortes celulares por necrose seja executada de forma rigorosamente regulada por mecanismos intracelulares próprios.<sup>46</sup>.

#### 1.4.2. Autofagia

O termo autofagia tem origem grega e significa literalmente “comer a si mesmo”, referindo-se ao processo controlado no qual a célula digere seu próprio conteúdo. Estudos recentes sugerem que a autofagia represente outro tipo de morte celular programada tão desejada quanto a apoptose no desenvolvimento de fármacos com atividade citotóxica para células neoplásicas<sup>47</sup>.

Existem três tipos definidos de autofagia: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas:

- ✓ **Macroautofagia:** É caracterizada pelo englobamento do citoplasma por vesículas de dupla membrana denominadas de autofagossomas, distinguíveis de outras vesículas celulares ou de corpos apoptóticos. Os autofagossomas com o conteúdo celular no seu interior se fundem ao lisossoma formando o autofagolisossoma. Dentro dos autofagolisossomas, tanto o material englobado quanto a vesícula são degradados por hidrolases lisossomais. Esse é o tipo mais frequente de autofagia.
  
- ✓ **Microautofagia:** Diferente da macroautofagia, na microautofagia os componentes citosólicos são diretamente englobados pelo lisossoma por meio de invaginações da membrana lisossomal.
  
- ✓ **Autofagia mediada por chaperonas:** Nesse tipo de autofagia, proteínas específicas são translocadas para a membrana lisossomal junto de proteínas chaperonas, onde são reconhecidas por receptores que resultam na sua degradação<sup>45;47;48;49; 50</sup>.

#### 1.4.3. Apoptose

A homeostase na proliferação celular e na regulação do sistema imunitário é garantida pela principal forma de morte celular programada, a apoptose, que selectivamente elimina as células desnecessárias, danificadas ou potencialmente deletérias<sup>51;52;53;54</sup>.

O termo apoptose foi introduzido em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para descrever um modelo de morte celular com morfologia característica e com mecanismos endógenos altamente regulados, a qual está envolvida na homeostase dos tecidos e na carcinogênese<sup>55</sup>. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como, por exemplo, na organogênese e na hematopoiese normal e patológica, no desenvolvimento embrionário, na reposição fisiológica de alguns

tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes genotóxicos<sup>56</sup>.

Assim, a apoptose é uma forma de morte celular regulada pelo ADN, sendo por isso um processo organizado e dependente de energia, denominada de morte celular programada ou apoptose, palavra originária do grego clássico *apóptōsis*, que se refere á queda das folhas de árvore do outono, expressa renovação e não a morte propriamente dita<sup>38;39</sup>.

Os achados histológicos da apoptose foram descritos pela primeira vez por Walter Flemming, em 1885, ao estudar folículos ovarianos maduros de mamíferos. Em 1914, Ludwig Graper, ao pesquisar células do endométrio propôs que este mecanismo seria oposto ao processo de mitose, e que estaria presente em todos os órgãos em que houvesse necessidade de eliminação de células. Kerr, a partir de 1971, analisando fígado de ratos submetidos à ligadura de segmentos de vasos portais, demonstrou as mesmas alterações histológicas anteriormente descritas, desta vez em células não germinativas ou embrionárias, retomando os conceitos do início do século. A este mecanismo de morte celular Kerr denominou apoptose.<sup>39</sup>

A desregulação do mecanismo de apoptose altera assim o balanço fisiológico contribuindo para uma multiplicidade de doenças. As patologias resultantes da ocorrência excessiva de apoptose levam à remoção prematura de células necessárias como ocorre em doenças degenerativas, rejeição de órgãos após transplante, isquémia e enfarte miocárdio<sup>27; 36</sup>.

Embora a apoptose tenha sido considerada, nas últimas décadas, sinónimo de morte celular programada (PCM, do acrónimo inglês *Programmed Cell Death*), recentemente tornou-se evidente que existem outros tipos de suicídio celular programado não-apoptótico, que têm em comum o facto de serem executadas por processos celulares activos que podem ser interceptados por interferir com a sinalização intracelular. O que os distingue da forma acidental de necrose que ocorre de forma caótica, e é caracterizado por edema celular e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação dos componentes celulares e a resposta inflamatória dos tecidos envolventes<sup>42;43</sup>.

A apoptose pode ser identificada pela morfologia das células, vias bioquímicas activadas, mecanismos de eliminação, a as consequências extracelulares de morte celular como a ausência de resposta inflamatória<sup>44</sup>. A forma de morte celular por apoptose, necrose ou outros, depende em parte da natureza do sinal que a despoleta, do tipo de tecido e do estado de desenvolvimento do tecido, assim como do meio fisiológico envolvente<sup>41</sup>.

Este tipo de morte celular pode ser desencadeada por uma grande variedade de estímulos e condições, quer fisiológicas quer patológicas, dentro ou fora da célula através de duas vias<sup>45</sup>.

No entanto, nem todas as células irão necessariamente morrer em resposta ao mesmo estímulo<sup>39</sup>. Os estímulos endógenos que podem iniciar a apoptose são, por exemplo, a ausência de oxigénio, nutrientes, factores de crescimento/sobrevivência, por outro lado os estímulos exógenos que a podem iniciar são a radiação ionizante, terapia anti-hormonal ou fármacos quimioterapêuticos, mas as citocinas podem induzir as duas vias<sup>35;37;46;47</sup>.

- **Morfologia da célula na apoptose**

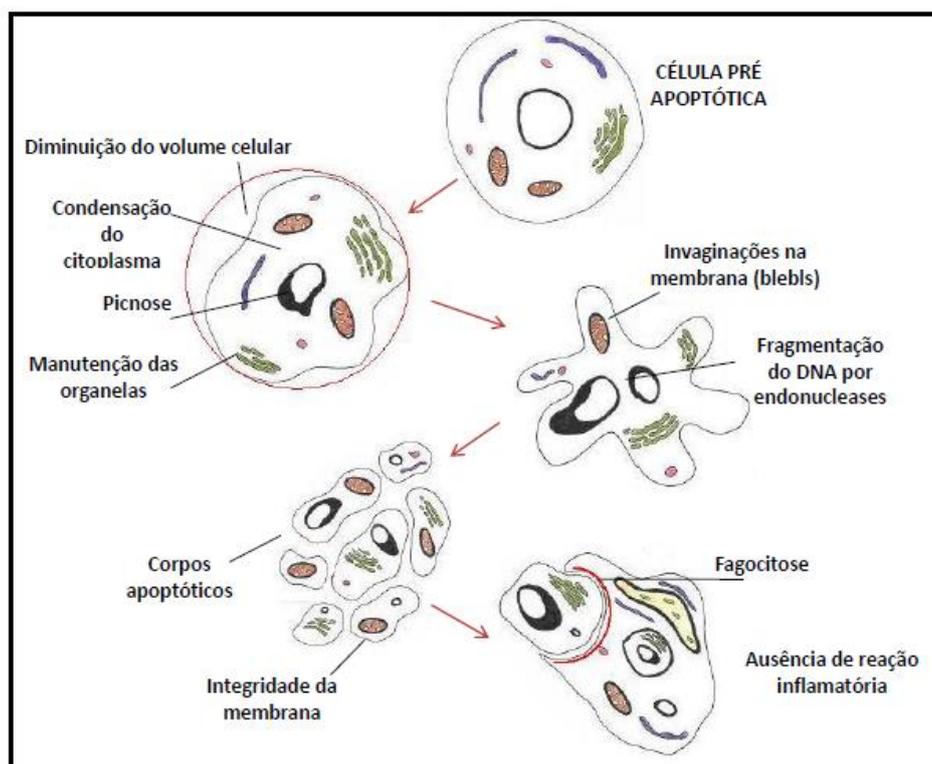
Antes de ocorrerem alterações morfológicas existe uma sequência de iniciação, denominada *lag phase* ou *trigger phase*. Este tempo de latência entre a exposição aos factores que despoletam a apoptose e as alterações morfológicas é variável, e também está dependente do tipo de célula, das condições do meio envolvente, bem como a intensidade de exposição e a duração do estímulo<sup>47</sup>.

As alterações morfológicas iniciam-se com a retracção da célula que causa perda de aderência quer com a matriz extracelular, como com as células vizinhas<sup>49</sup>. Nesta fase inicial do processo de apoptose é possível visualizar com recurso ao microscópio a diminuição da célula, no qual o citoplasma se torna mais denso e os organelos mais compactados, bem como uma das principais características da apoptose, a picnose que resulta da condensação da cromatina<sup>39</sup>. Posteriormente a membrana celular forma prolongamentos (*blebbing*) e o conteúdo intracelular é empacotado em pequenas estruturas vinculadas por membranas, denominadas de corpos apoptóticos<sup>37</sup>. Os corpos apoptóticos são removidos rápida e eficientemente por fagócitos ou por células vizinhas<sup>58</sup>.

Morfologicamente, durante o processo inicial de apoptose ocorre picnose e encolhimento da célula, de forma que o citoplasma se torna mais denso e as organelas mais empacotadas. A picnose é resultado da condensação da cromatina, uma característica marcante da apoptose. As organelas mantêm sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, as quais podem adquirir poros na sua membrana. Assim, nesse primeiro estágio, as células apoptóticas aparecem como uma massa oval ou arredondada, com citoplasma denso e núcleo compacto, podendo apresentar, ainda, aumento da granulosidade citoplasmática. Durante o segundo estágio, ocorre a formação de invaginações e pregas na membrana plasmática, denominadas *blebs*, o que culmina com a separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são formados por organelas íntegras e pelo conteúdo citoplasmático envolvidos pela membrana plasmática, podendo ou não conter fragmentos nucleares. Essas estruturas são reconhecidas como alvos fagocitários e são fagocitadas por células do sistema imune, como os macrófagos, e degradadas nos fagolisossomas (Ilustração 7). A apoptose gera pouca reação inflamatória, uma vez que as células apoptóticas não libertam o seu conteúdo celular para o tecido circundante, pois são digeridas rapidamente impedindo a necrose secundária e a libertação de citocinas inflamatórias<sup>50;59;60</sup>. Outra característica importante da apoptose é a

fragmentação do DNA, que ocorre pela ação de endonucleases ativas, as quais produzem fragmentos de tamanhos variáveis, sempre múltiplos de 200 pares de base. Esses fragmentos formam um padrão de quebra internucleossomal quando separados em gel de agarose e estão presentes na maioria das células em apoptose<sup>49,60,61</sup>.

**Figura 8 - Morfologia da apoptose<sup>v</sup>**



Fonte: Medicine and Biology<sup>62</sup>

## 1.5. Mecanismos Reguladores da Apoptose

Embora a compreensão detalhada das vias de sinalização que despoletam a apoptose seja incompleta, o mecanismo de apoptose é reflexo de duas vias distintas que convergem mutuamente através da cascata proteolítica complexa que envolvem a activação de grupos de cisteínas proteases denominadas de caspases (do acrónimo inglês *cystein aspartic acid-specific proteases*), executores centrais na indução da morte celular<sup>32;63</sup>. Estas podem ser classificadas em dois grupos, as caspases activadoras ou apicais e as caspases efectoras ou executoras. As caspases activadoras são capazes de activação auto-catalítica, enquanto as

<sup>v</sup> Principais características morfológicas da célula em apoptose, com posterior digestão celular pelos fagócitos e reação inflamatória mínima devido à ausência de liberação do conteúdo citoplasmático para o meio externo

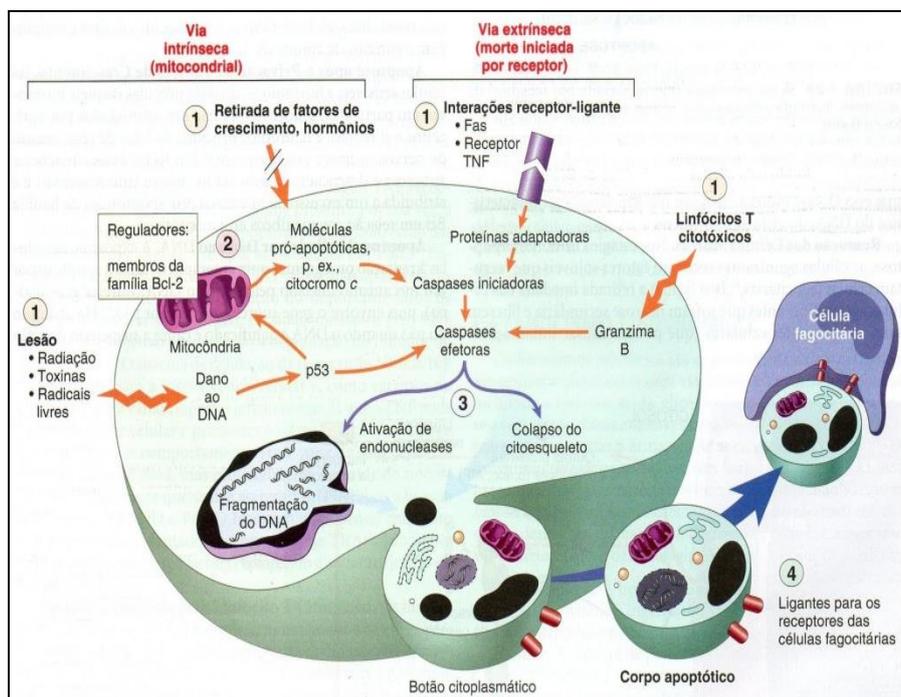
caspases efectoras necessitam de activação para iniciarem a clivagem das caspases<sup>64</sup>. Todo o processo é controlado por proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que embora apresentem funções moleculares diferentes, partilham sequências homólogas variando nos domínios Bcl-2 homólogos ou na homologia alfa-helical Bcl-2<sup>65</sup>. As caspases são expressas como pro-enzimas que devem ser proteoliticamente processadas de forma a tornarem-se activas<sup>66</sup>.

As vias apoptóticas são classificadas em intrínseca e extrínseca, e são também denominadas de via mitocondrial ou via dos receptores da morte, por respectivamente serem activadas por sinais intracelulares desencadeados pelas mitocôndrias activadas ou por serem activados sinais externos que actuam sobre os receptores da morte existentes na superfície da célula<sup>39</sup>. Subsequentemente à activação das cascatas apoptóticas, várias proteínas vitais são clivadas. Essa clivagem permite a correlação dos eventos morfológicos com os mecanismos moleculares subjacentes<sup>66</sup>.

Para além das duas principais vias, extrínseca e intrínseca, que requerem a activação de caspases, existem outras vias que activam a apoptose. Por exemplo, as células T citotóxicas e as células Nk (do acrónimo inglês *natural killer*) despoletam de células susceptíveis alvo, quer através do ligando Fas ou através da via dependente da perforina/granzima B<sup>66</sup>.

As caspases compreendem uma família de proteases que possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos, tornando-as capazes de clivar resíduos de ácido aspártico de proteínas específicas. Estas enzimas são expressas nas células na forma de zimógenos inativos ou de baixa atividade denominados pró-caspases, sendo necessária sua oligomerização e/ou clivagem para que se tornem activas<sup>66</sup>. As caspases são divididas em iniciadoras (caspase-8, -2, -9 e -10) e em efectoras (caspase-3, -6 e 7).

Figura 9 - Vias principais da apoptose



Fonte: Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças, 7ª Ed.

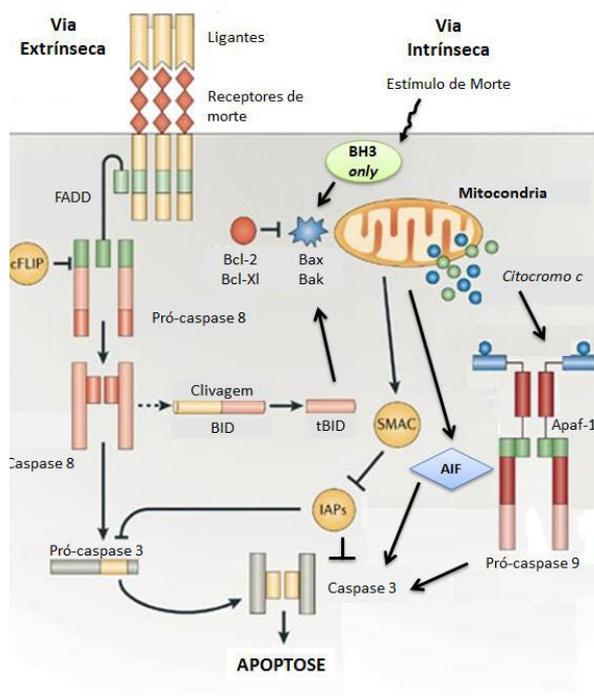
### 1.5.1. Via Intrínseca da apoptose

A via intrínseca ou mitocondrial apresenta como característica distintiva o envolvimento da mitocôndria e é mediada pela libertação do citocromo c através deste organelo<sup>67</sup>.

A via intrínseca depende da permeabilização da membrana mitocondrial externa para permitir a libertação selectiva de citocromo c e outros polipéptidos para o espaço citoplasmático<sup>34;68</sup>. A permeabilização da membrana externa depende da razão entre os membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família Bcl-2.<sup>34</sup>

Em determinadas condições a membrana mitocondrial interna também pode ser permeabilizada em conjunto com a membrana externa libertando outras proteínas como o factor indutor de apoptose (AIF, do acrónimo inglês *apoptosis-inducing factor*), Omi e Endo G, que são translocados para o núcleo resultando numa forma de apoptose independente das caspases<sup>37</sup>.

Figura 10 - Via intrínseca e via extrínseca da apoptose<sup>vi</sup>



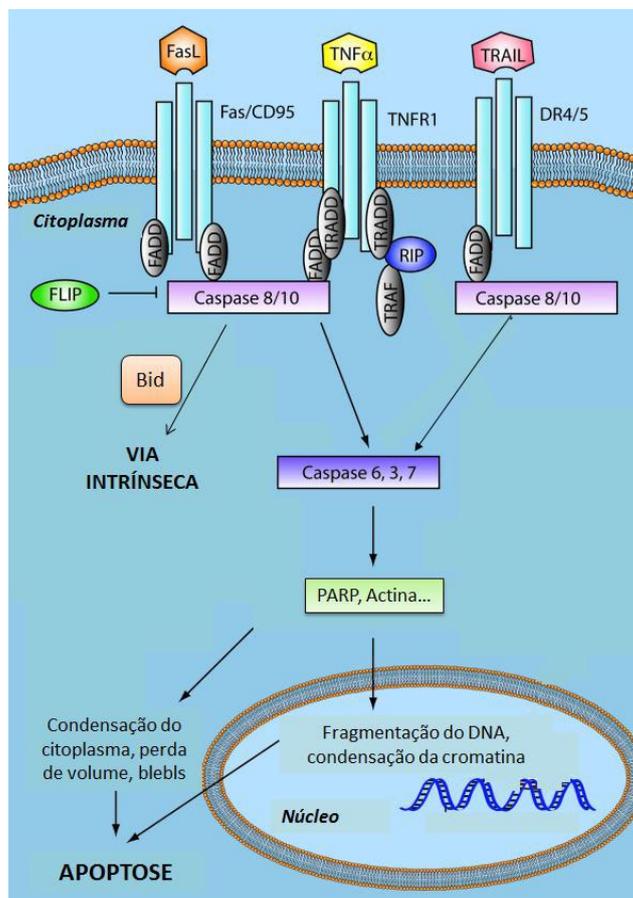
Fonte: Hotchkiss; Nicholson<sup>69</sup>

### 1.5.2. Via extrínseca da apoptose

A via apoptótica extrínseca ou dos receptores da morte é activada através da ligação aos receptores da morte existentes na superfície da célula dos seus ligandos específicos, activando as caspases parcialmente independentes da mitocôndria<sup>65</sup>.

<sup>vi</sup> A via intrínseca é iniciada por estímulos externos, resultando na despolimerização da membrana mitocondrial externa e na liberação de fatores como o citocromo c, evento regulado pela família de proteínas Bcl-2. A via intrínseca ocorre pela ativação dos receptores de morte. O resultado é a ativação da caspase-3, a qual leva a célula à apoptose. Outras proteínas como AIF, IAPs e Smac/Diablo também participam da cascata em diferentes momentos e com diferentes funções.

Figura 11 - Via extrínseca da apoptose<sup>vii</sup>



Fonte: Krakstad e Chekenya<sup>70</sup>

Existem diversos métodos para qualificar ou quantificar a apoptose, a maioria deles detetam alterações nucleares que ocorrem nas células durante o processo, como diminuição de tamanho, condensação da cromatina e fragmentação do DNA<sup>71</sup>.

A morte celular programada pode ser observada por microscopia ou por electroforese de DNA, uma vez que a fragmentação de DNA segue um padrão característico, sendo este último método qualitativo<sup>72</sup>.

A aferição das taxas de apoptose através da citometria de fluxo trouxe a possibilidade de sua quantificação, simplificando o processo. Através desta técnica, a morte celular programada pode ser detectada com o uso de corante nuclear, permitindo a quantificação através da identificação das células com DNA fragmentado (hipodiplóide)<sup>73:74</sup> ou ainda pela verificação da

<sup>vii</sup> A via extrínseca é ativada pela união de ligantes específicos aos receptores de morte (TNF-R, FasR/CD95 e TRAIL-R), o que resulta na ativação da cascata das caspases e na clivagem de substratos citoplasmáticos e nucleares. A via extrínseca pode ativar a via mitocondrial através da clivagem da proteína Bid pela caspase-8.

fosfatidilserina na membrana celular, fosfolípido que se exterioriza precocemente na membrana celular de células em apoptose<sup>75;76</sup>.

Existem kits comerciais para a realização destas técnicas, como o kit que contém Anexina V marcada, uma proteína que se liga à Fosfatidilserina libertada na membrana celular nas fases iniciais da apoptose.

## **1.6. Fosfatidilserina**

A fosfatidilserina (PS, do acrónimo inglês *phosphatidylserine*) é um fosfolípido de membrana que está ubiquamente presente em membranas eucarióticas e procarióticas<sup>77</sup>. A membrana plasmática caracteriza-se por uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos em células eucariotas. Os aminofosfolípidos como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão geralmente em maior quantidade no folheto interno, enquanto a fosfatidilcolina, a esfingomiéline e a glicosfingolípido estão principalmente localizados no folheto externo<sup>78</sup>. A grande variedade destes fosfolípidos na membrana define a fluidez desta, dado que regula as propriedades das proteínas aí existentes<sup>77</sup>.

A exposição da PS à superfície actua como sinal de reconhecimento para os macrófagos que expressam receptores da PS, promovendo assim a eliminação das células apoptóticas<sup>28</sup>. Ainda que a identificação de um receptor dominante capaz de reconhecer esse sinal permaneça controversa.

Embora no passado, a exposição da PS para a membrana externa fosse considerada como um dos pontos de não retorno da morte celular, esta não define necessariamente a morte celular<sup>46</sup>. A exposição da PS pode ocorrer a baixos níveis e de forma reversível sob condições de stresse, não sendo necessariamente significado de apoptose. A reversibilidade da exposição da PS é reposta com a remoção do stresse fisiológico, como são exemplo o óxido nítrico ou a privação dos factores de crescimento, entre outros. Neste sentido, a exposição da PS, ainda que de forma reversível, pode ser usada para avaliar tecidos em risco de morte celular e que devem ser recuperados ou sujeitos a imediata intervenção terapêutica<sup>39</sup>. Além disso, existem linhas celulares não-apoptóticas que apresentam variantes da normal exposição da PS, como granulócitos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos B e T, assim como anticorpos estimulados<sup>39;50</sup>.

## 1.7. Anexina V

A proteína humana Anexina V foi descoberta inicialmente como um anticoagulante *in vitro*<sup>79</sup> devido ao seu efeito inibitório na ativação da protrombina e sua habilidade em prevenir a formação de trombos em condições fisiológicas normais<sup>32</sup>, ligando-se fortemente a fosfolípidos<sup>80</sup>, as plaquetas<sup>81</sup> e ao colagénio<sup>82</sup>. Apresentam ainda a capacidade de formar canais de voltagem dependentes de  $Ca^{+2}$ <sup>83</sup>, inibindo a fosfolipase A2<sup>84</sup> e a proteína quinase C<sup>85;86</sup>, representando assim um importante papel na transdução de sinal, inflamação, desenvolvimento e diferenciação celular<sup>87</sup>.

A Anexina V humana é também descrita como nexina A5, proteína anticoagulante placentária I, anticoagulante vascular alfa, endonexina II, lipocortina V, proteína placentária 4 e ancorina CII<sup>32</sup>. Consiste em uma proteína endógena produzida pelas células epiteliais de diversos tecidos, assim como placenta, cordão umbilical, fígado, baço, rins, coração, útero, músculo esquelético, eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e plaquetas<sup>39</sup>.

A Anexina V é uma ligação natural da PS, com afinidade nanomolar, que pertence à superfamília de proteínas anexinas<sup>78;88</sup>. Esta é constituída por 319 aminoácidos e apresenta um peso molecular de 36 kDa<sup>89</sup>.

Os membros da família de anexinas compartilham funções e estrutura idênticas, e caracterizam-se pela capacidade de se ligarem à superfície de fosfolípidos de carga negativa de forma reversível e dependente de cálcio ( $Ca^{+2}$ )<sup>90</sup>. Cada anexina é constituída por duas regiões diferentes, o domínio N-terminal único, também denominado de cauda, e o domínio C-terminal ou núcleo. O domínio C-terminal consiste em quatro repetições similares de aproximadamente 70 aminoácidos, excepto para a Anexina VI que contém 8 repetições. Este domínio é em geral o responsável pela ligação ao  $Ca^{+2}$  e aos fosfolípidos<sup>91</sup>.

A Anexina V encontra-se principalmente no espaço intracelular, no citosol, ainda que em pequena concentração circule também no compartimento sanguíneo de humanos saudáveis. Além disso, esta proteína é expressa numa variedade de tipos celulares, nomeadamente: cardiomiócitos, endotélio vascular, eritrócitos, plaquetas, linfócitos, células gliais, astrócitos, oligodendrócitos, células de *Schwann*, hepatócitos, células da mucosa brônquica, condrócitos e osteoblastos<sup>32</sup>.

Embora sejam bem estudadas várias funções desta proteína, a função fisiológica precisa das Anexinas permanece incerta. Nos finais da década de 70 foi isolada da placenta humana e, posteriormente, foi descoberta nos vasos sanguíneos<sup>67</sup>. Além desta função, a anexina inibe a fosfolipase A2, uma enzima responsável pela libertação de ácido araquidónico, componente do processo inflamatório, pela membrana celular; e inibe a proteína cinase C, responsável pelo sistema de sinalização intracelular<sup>39</sup>.

Além disso, a anexina V é conhecida por se ligar seletivamente, com afinidade nanomolar ( $K_d = 0.5-7.0$  nM) aos resíduos de fosfatidilserina da membrana plasmática. Essa ligação não só ocorre muito rapidamente como é fortemente dependente da presença de íons  $Ca^{+2}$ .

#### 1.7.1. Aplicações da Anexina V

A Anexina V tem sido amplamente utilizada como ferramenta para detecção de apoptose tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Com base nas suas características, foi originalmente complexada com diferentes compostos fluorescentes, sendo utilizada rotineiramente em laboratórios para identificar e quantificar células apoptóticas *in vitro*. Gang Niu e Xiaoyuan Chen, no estudo publicado em 2010, sobre “*Apoptosis Imaging: Beyond Annexin V*” referem que devido a ausência de imunogenicidade e toxicidade *in vivo*, a Anexina V tem sido utilizada ainda no diagnóstico de apoptose *in vivo* através da complexação com radionuclídeos para monitorização de terapias contra o cancro<sup>91,92</sup>, sendo capaz de identificar estágios iniciais de apoptose.

Koopman (1994) afirma que a Anexina V/FITC é usualmente utilizada com um marcador vital de células, como por exemplo, Iodeto de Propídeo (PI). Células viáveis apresentam a membrana plasmática íntegra, e dessa forma, consegue-se excluir o corante vital PI, enquanto as membranas das células mortas são permeáveis ao corante, que se incorpora no DNA.

Assim sendo, a partir destes marcadores é possível identificar células viáveis (Anexina V/FITC e PI negativas), células em um estágio recente de apoptose (Anexina V/FITC positivas e PI negativas) e células que estão em um estágio tardio de apoptose ou mesmo mortas (Anexina V/FITC e PI positivas)<sup>93</sup>.

#### 1.7.2. Métodos de Detecção da Apoptose

A apoptose representa um processo ativo de remoção celular que frequentemente requer ativação génica, síntese protéica e ativação de endonucleases<sup>94</sup>. Morfologicamente, este processo é caracterizado pela condensação da cromatina, diminuição do citoplasma, formação de vesículas a partir da membrana e finalmente, formação dos corpos apoptóticos<sup>95</sup>.

Baseadas na detecção de tais alterações morfológicas, diferentes metodologias como eletroforese, microscopia electrónica e citometria de fluxo, são amplamente empregues na avaliação da apoptose<sup>93,96</sup>. (Tabela 1).

A fragmentação do DNA por endonucleases, por exemplo, é classicamente demonstrada por eletroforese como uma graduação típica de DNA<sup>93</sup>, enquanto o percentual de fragmentação pode ser determinado por métodos colorimétricos após a separação dos fragmentos por ultracentrifugação<sup>96</sup>.

Alternativamente, a fragmentação do DNA pode ser visualizada a partir da quantificação percentual de bases celulares por ensaios de transferência de marcação *in situ* (ISNT, *in situ* nick translation) <sup>97;98;99</sup>. Contudo, as evidências morfológicas da apoptose nem sempre são acompanhadas pela clivagem do DNA, podendo acarretar em interpretações subestimadas a respeito deste mecanismo de morte celular<sup>100;101</sup>.

A utilização de microscopia electrónica associada a corantes fluorescentes<sup>96</sup> embora permita detectar o processo apoptótico por criteriosa avaliação morfológica torna-se inapropriado na quantificação da apoptose, posto que a marcação das células, geralmente realizada através de marcadores não vitais, ocorre somente após o dano da membrana<sup>95</sup>.

As metodologias que incluem a avaliação e quantificação das populações celulares por citometria de fluxo fornecem análises mais precisas e reprodutíveis do processo de morte celular por apoptose<sup>102</sup>. Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*) de dispersão da luz, respectivamente<sup>103</sup>.

Entre os marcadores nucleares e corantes fluorescentes comumente utilizados nos ensaios de verificação e quantificação da apoptose por citometria de fluxo, destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), acridine orange<sup>93</sup>, anexina-V-FITC e calceína AM<sup>103</sup>. (Quadro 1).

**Quadro 1** - Categorias de alterações celulares que formam a base dos ensaios de detecção da apoptose

<b>Evento</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Deteção</b>
<p><b>Alterações da morfologia nuclear:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condensação da cromatina, segmentação e formação de corpos apoptóticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcadores de DNA (DAPI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscopia</li> </ul>
<p>Alterações na permeabilidade da membrana:</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corantes Vitais (PI);</li> <li>• Marcadores de permeabilidade do DNA (DAPI Hoechst 33258, Calceína AM).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscopia;</li> <li>• Citometria de fluxo com determinação simultânea de tamanho.</li> </ul>
<p>Alterações na composição da membrana:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Externalização da fosfatidilserina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Associação à Anexina V</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citometria de fluxo</li> </ul>

**Maria Joana Damásio Galhardas**

<b>Clivagem de proteínas nucleares</b>	<b>Polimerase poly ADP ribose</b>	<b>Western blot</b>
<p>Atividade e integridade mitocondriais</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alterações na transição da permeabilidade (<math>\Delta\Psi_m</math>);</li> <li>• Acessibilidade a antígenos mitocondriais;</li> <li>• Liberação de citocromo-c;</li> <li>• Produção de radicais livres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corantes Vitais (DiOC<sub>6</sub>, JC-1);</li> <li>• Anticorpos Apo2,7;</li> <li>• Anticorpos Anti-citocromo-c;</li> <li>• DPPP/dihidroetídio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citometria de fluxo;</li> <li>• Citometria de fluxo;</li> <li>• Citometria de fluxo, Western blot;</li> <li>• Citometria de fluxo.</li> </ul>
<p>Ativação de caspases:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção de produtos da clivagem de caspases;</li> <li>• Detecção de caspases ativas;</li> <li>• Detecção da atividade de caspases.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Substratos conhecidos de caspases: PARP, caspase 3, caspase 8, DNA-PK, PK-C;</li> <li>• Anticorpos anti-caspase 3 ativada;</li> <li>• Clivagem de substratos fluorescentes ou coloridos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Substratos conhecidos de caspases: PARP, caspase 3, caspase 8, DNA-PK, PK-C;</li> <li>• Anticorpos anti-caspase 3 ativada;</li> <li>• Clivagem de substratos fluorescentes ou coloridos.</li> </ul>
<p>Degradação do DNA:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragmentos grandes;</li> <li>• Fragmentos pequenos;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcadores de DNA Homodímero de Etídio, SYBR green);</li> <li>• Marcador de DNA (Homodímero de Etídio);</li> <li>• Radioatividade (C<sup>14</sup>);</li> <li>• Marcador de DNA (Homodímero de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eletroforese em gel de campo oscilante;</li> <li>• Comet</li> <li>• Detecção de DNA radiomarcado por filtrado marcado;</li> </ul>

**Maria Joana Damásio Galhardas**

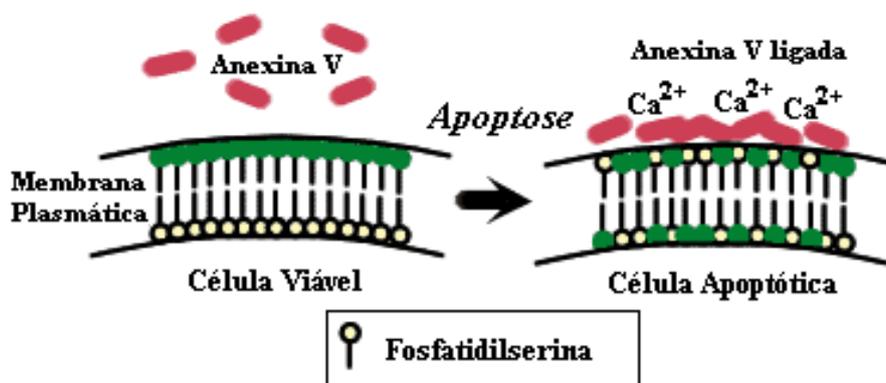
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção do pico Sub-G1</li> </ul>	<p>Etídio);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Radioatividade (<math>C^{14}</math>);</li> <li>• Marcador de DNA (PI).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eletroforese em gel de agarose (escala de DNA);</li> <li>• Detecção de DNA radiomarcado por filtrado marcado;</li> <li>• Citometria de fluxo.</li> </ul>
<p>Detecção de finos fragmentos de DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corte da porção terminal dUTP e marcação (TUNEL);</li> <li>• PCR mediada por ligação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hibridização in situ, Citometria de fluxo;</li> <li>• Eletroforese</li> </ul>

Fonte: Willingham, M. C., 1999, Badley et al., 2000<sup>94;104</sup>

A anexina V mostrou-se útil na detecção de células apoptóticas em decorrência da sua ligação preferencial a fosfolipídios negativamente carregados, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico<sup>75;76;95</sup>. A conjugação do corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) à anexina V<sup>95</sup>, permite identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo (Ilustração 11). A utilização concomitante do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI), por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose.

Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como iodeto de propídio, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Desse modo, utilizando citometria de fluxo, o marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais da apoptose, enquanto o iodeto de propídio permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular<sup>105</sup>.

Figura 12 - Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina



Fonte: VanENGLAND et al., 1998; WILLINGHAM, 1999<sup>104;105</sup>

## 1.8. Lesão de armazenamento

Desde a primeira tentativa bem-sucedida de armazenamento de sangue, há quase um século, os avanços científicos e tecnológicos têm demonstrado eficácia na preservação dos CE's prolongando a viabilidade dos glóbulos vermelhos armazenados<sup>106;107</sup>.

Ao longo das últimas décadas, tem havido um aumento do interesse nas alterações e mudanças que os CE's apresentam, durante o período de armazenamento. Estas alterações, que ocorrem no período de armazenamento foram denominadas, colectivamente de lesão de armazenamento dos eritrócitos (Figura 13).

Durante a recolha, preparação de componentes e armazenamento refrigerado de unidades de CE's, os glóbulos vermelhos passam por inúmeras alterações físico-químicas, referidos colectivamente como a lesão de armazenamento dos CE's, o que afecta a qualidade, função e na sobrevivência *in vivo* da transfusão de CE's. Assim, Rosemary L. Sparrow afirma que as implicações para o doente a ser transfundido tendo em conta as alterações relacionadas com o armazenamento de CE's são actualmente uma questão de grande interesse e debate na comunidade clínica e científica<sup>108</sup>.

K. Pavenski, na investigação sobre o tema "Lesões de armazenamento dos eritrócitos" questionam o porquê do sangue armazenado perder viabilidade e consequentemente não trazer benefícios ao doente a ser transfundido.

Estes afirmam que existem múltiplas teorias para explicar as diferenças entre transfusões de CE's mais frescos paralelamente aos CE's mais antigos. Uma das hipóteses sugere que as substâncias sobrenadantes dos eritrócitos armazenados poderão ser a causa dos

**Maria Joana Damásio Galhardas**

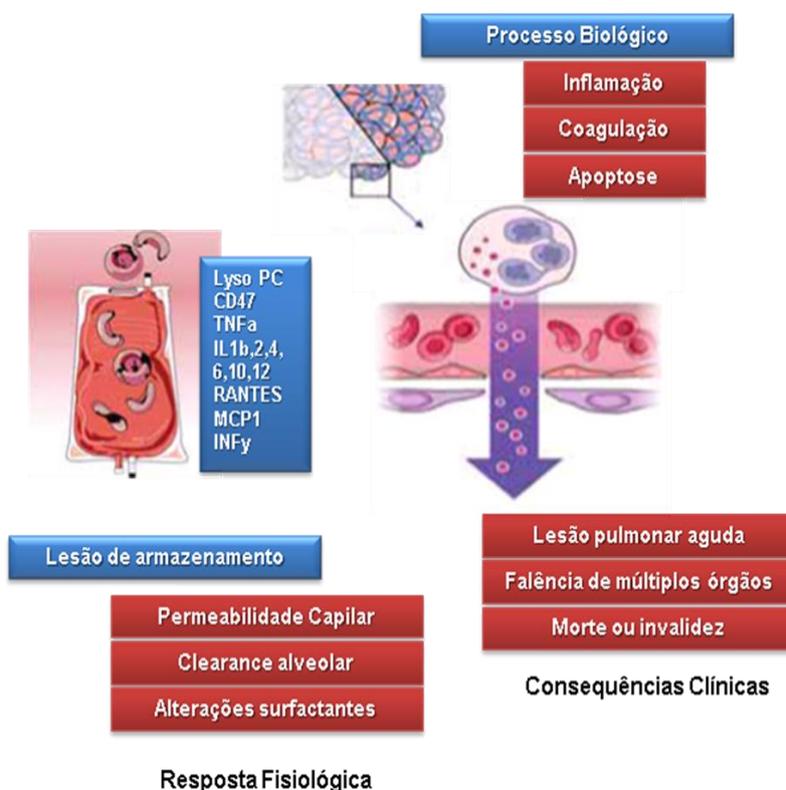
inconvenientes pós transfusionais. Estas substâncias incluem fundamentalmente hemoglobina livre que elimina óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, produz vasoconstrição, bem como micropartículas inflamatórias que podem ter actividade pró-coagulantes<sup>109</sup>.

Outras da hipótese levantada pelos autores remete para as alterações intrínsecas nos Gv pois seriam responsáveis pelas diferenças observadas. Com a diminuição do ATP verificar-se-á uma perda da actividade vasodilatadora e conseqüentemente poderá surgir isquémia de órgãos<sup>110</sup>.

Essas alterações podem ser extensas e são principalmente classificados em três grandes categorias: bioquímicas, biomecânicas e imunológicas.

**Figura 13 - Lesão de armazenamento:**

Conseqüências biológicas e fisiológicas dos CE's



Fonte: Daryl J. Kor et al.: Red Blood Cell Storage Lesion (2009)

- **Alterações bioquímicas dos CE's durante o armazenamento**

As alterações bioquímicas nos Gv armazenados estão relacionadas pelas alterações patentes no metabolismo energético com difosfoglicerato (DPG)<sup>111;112</sup> e depleção da adenosina trifosfato (ATP)<sup>113;114</sup>.

- *Difosfoglicerato (DPG)*

Uma das mudanças mais notáveis durante o armazenamento dos Ce's é a rápida queda no DPG<sup>111;112</sup>. O DPG é um alostérico modificador da hemoglobina, que desempenha um papel preponderante na liberação de oxigénio nos órgãos.

Foi demonstrado que níveis de DPG diminuem rapidamente durante o armazenamento dos Ce's, tornando-se indetectáveis no período de duas semanas<sup>115</sup>. Esta observação levantou a preocupação de que, apesar da melhoria no fornecimento de oxigénio aquando da transfusão, os GV armazenados podem não libertar oxigénio suficiente para os tecidos<sup>112</sup>.

Embora biologicamente possível, parece haver poucas consequências, do ponto de vista clínico, da queda abrupta de DPG. Vários autores não conseguiram encontrar um efeito adverso significativo na transfusão de Ce's com níveis de DPG baixos.

Em parte, a carência de DPG numa primeira transfusão pode resultar na rápida recuperação dos níveis de DPG nas transfusões seguintes<sup>116</sup>. A normalização dos níveis de DPG começa dentro de poucas horas após a transfusão e está totalmente restaurado dentro de 48 a 72 horas<sup>117</sup>.

- *Adenosina Trifosfato (ATP)*

A segunda alteração bioquímica, verifica-se numa redução do potencial do ATP no CE's<sup>113;114</sup>. Devido ao seu papel central no metabolismo celular, os níveis adequados de ATP são fulcrais para inúmeros processos celulares, como por exemplo<sup>115</sup>:

- A manutenção da actividade dos iões Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e a actividade da ATPase,
- Estabilidade da membrana dos CE's,
- Transporte da glicose,
- O stress oxidativo e mecanismos de defesa,
- A distribuição de fosfolípidos da membrana,
- A vasodilatação sob condições de hipoxia.

Reat e Verhoeven mostraram reduções acentuadas nos níveis de ATP durante o armazenamento dos CE's. A descida dos níveis de ATP nos CE's é detectável, de forma mais pronunciada, com o tempo de armazenamento<sup>114</sup>. Ou seja, quanto mais tempo os CE's estiverem armazenados mais os níveis de ATP vão diminuindo.

Enquanto a depleção de ATP pode resultar em mudanças na deformação observados nos CE's armazenados por tempo mais prolongado, estas alterações morfológicas pode ser reversível com a normalização dos níveis de ATP.

É importante ressaltar que os níveis de ATP têm de normalizar rapidamente após a transfusão de CE's.

Adicionalmente, a redução mais gradual nos níveis intracelulares de ATP não parece correlacionar bem com essas mudanças morfológicas<sup>113</sup>. O impacto de depleção de ATP nos CE's, sobre a resposta vasodilatadora à hipoxemia é uma área de interesse que tem sido inadequadamente explorado e vai exigir estudos adicionais.

- **Alterações biomecânicas durante o armazenamento de CE's**

Como o diâmetro capilar varia de 3 a 8  $\mu\text{M}$  verifica-se pequenas alterações na deformação dos eritrócitos que leva a um impacto substancial na sua capacidade de atravessar a microcirculação.

A deformabilidade dos eritrócitos depende em grande parte da área do volume superficial, elasticidade da membrana e a viscosidade intracelular<sup>118</sup>.

As alterações biomecânicas nos Gv durante o armazenamento incluem<sup>115</sup>:

- Deformabilidade,
- Fragilidade osmótica,
- Agregabilidade e viscosidade intracelular.

Essas mudanças têm sido demonstradas afetando a circulação dos Gv através da microcirculação o que provoca a diminuição na oxigenação dos tecidos<sup>119;120</sup>.

As alterações bioquímicas observadas nos Gv armazenados, que resultam de alterações morfológicas incluem<sup>113;114</sup>:

- Depleção de ATP e de DPG,
- Perda da membrana fosfolipídica,
- Desordenação na proteína e oxidação lipídica.

Adicionalmente, Brunauer<sup>121</sup> e outros<sup>122</sup> descreveram a internalização de fosfolipídios da membrana caracterizada por uma carga oxidativa.

A resultante perda da assimetria fosfolipídica afecta a deformabilidade dos eritrócitos e a sua sobrevivência *in vivo*.

Recentemente, Karon et al. no seu estudo “Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells”. demonstraram que as alterações morfológicas são irreversíveis como a perda da função dos CE's que ocorrem durante o armazenamento<sup>123</sup>.

Usando uma técnica espectroscópica mais sensível, os autores detectaram uma reorganização da Banda 3 dentro das membranas dos eritrócitos intactos antes da perda da faixa 3 e o aparecimento de vesículas, alterações que são conhecidas quando o armazenamento ultrapassa o 30º dia.

Estão a ser postos em prática estudos adicionais na tentativa de melhor caracterizar as alterações morfológicas que ocorrem na membrana dos eritrócitos durante o armazenamento refrigerado<sup>124;125</sup>.

- **Alterações imunológicas durante o Armazenamento de CE's**

A associação entre a terapia transfusional e as alterações imunológicas detetadas no doente não tinham sido reconhecidas até ao ano de 1973. Opelz et. al. descreve uma intrigante observação em doentes transplantados renais: “Os doentes transfundidos com sangue alogénico apresentam melhorias em comparação com doentes similares que não foram sujeitos a transfusão de sangue”.

Especificamente, o estudo de Opelz<sup>126</sup> demonstrou a presença de um efeito imunossupressor ou imunomodulador no doente transfundido com CE's (mais tarde conhecida como Transfusion Related Immunodulation – “TRIM”). Subsequente foi constataado o potencial para múltiplos efeitos adversos, (por exemplo: infecções nosocomiais, lesão pulmonar aguda relacionada com a transfusão, falência de múltiplos órgãos) resultantes destes efeitos imunomoduladores.

## 1.9. Controlo de qualidade

Juran define qualidade como sendo a capacidade de o serviço/produto cumprir a missão a que é proposto sendo uma adequação ao uso pretendido<sup>127</sup>. Segundo Shigeru Mizuno, "Um produto não precisa necessariamente ter a melhor qualidade possível: o único requisito é que o produto satisfaça as exigências do cliente para o seu uso."<sup>128</sup>

Controle de qualidade é definido como uma medida adoptada para definir padrões em procedimentos de maneira uniforme, tendo como objectivo principal garantir a qualidade de todo o produto. Em todo o mundo, há entidades que regulamentam o controlo de qualidade de acordo com a legislação de cada país<sup>129</sup>.

Relativamente ao sangue e componentes sanguíneos, a Directiva da União Europeia 2002/98/CE estabelece normas de qualidade e segurança com vista à colheita e análise de sangue humano e de componentes sanguíneos, qualquer que seja o fim a que se destinem e ao seu processamento, armazenamento e distribuição, caso se destinem a transfusões, a fim de assegurar um elevado nível de protecção da saúde humana.

No Diário da República, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011- Decreto-Lei n.º 100/2011 estão patentes os requisitos relativos ao controlo da qualidade do sangue e dos componentes sanguíneos (quadro 2).

**Quadro 2** - Requisitos relativos ao controlo da qualidade do sangue e dos componentes sanguíneos

Componente	Requisitos de qualidade exigidos	Resultados aceitáveis para os requisitos de qualidade.
<b>Eritrócito</b>	Volume	Válido para as características do armazenamento por forma a manter o produto dentro dos valores especificados de hemoglobina e hemólise.
	Hemoglobina <sup>viii(*)</sup>	Não inferior a 45 g por unidade.
	Hemólise	Menos de 0,8 % da massa de eritrócitos no fim do período de armazenamento.
<b>Eritrócitos com remoção da camada leuco -plaquetária (buffy coat).</b>	Volume	Válido para as características do armazenamento por forma a manter o produto dentro dos valores especificados de hemoglobina e hemólise.
	Hemoglobina <sup>(*)</sup>	Não inferior a 43 g por unidade.
	Hemólise	Menos de 0,8 % da massa de eritrócitos no fim do período de armazenamento.
<b>Eritrócitos desleucocitados</b>	Volume	Válido para as características do armazenamento por forma a manter o produto dentro dos valores especificados de hemoglobina e hemólise.
	Hemoglobina <sup>(*)</sup>	Não inferior a 40 g por unidade.
	Hemólise	Menos de 0,8 % da massa de eritrócitos no fim do período de armazenamento.

**Fonte:** Ministério da Saúde, **Decreto-Lei n.º 100/2011** - Diário da República, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011

<sup>viii</sup> Em relação às dádivas autólogas, recomendam-se, mas não se exigem, os requisitos assinalados com um asterisco (\*).

Tanto a lesão como a hemólise das células vermelhas que ocorre durante o processamento e armazenamento de CE's têm implicações clínicas potencialmente graves para os doentes transfundidos. Sawant, R. B. e coautores, na sua investigação sobre "*Red cell hemolysis during processing and storage*" (publicada em 2007)<sup>130</sup>, referem que é importante detectar hemólise excessiva para minimizar a transfusão de unidades de CE's devido a bactérias. Estes autores referem ainda que a extensão da hemólise nos CE's é um indicador importante da integridade celular e um parâmetro de qualidade, e que níveis plasmáticos elevados de hemoglobina se devem a factores como deficiências no processamento / armazenamento dos CE's e por procedimentos vários, nomeadamente a lavagem, irradiação e filtração de células vermelhas para remoção de leucócitos.

## **1.10. Citometria de Fluxo**

Como referido anteriormente, a necessidade de obter informação dos processos biológicos, nomeadamente processos de morte celular, tem conduzido ao aparecimento e utilização de múltiplos equipamentos e técnicas para o efeito<sup>131</sup>. Uma das técnicas utilizadas para avaliar tais processos biológicos é a Citometria de Fluxo.

### 1.10.1. Princípio

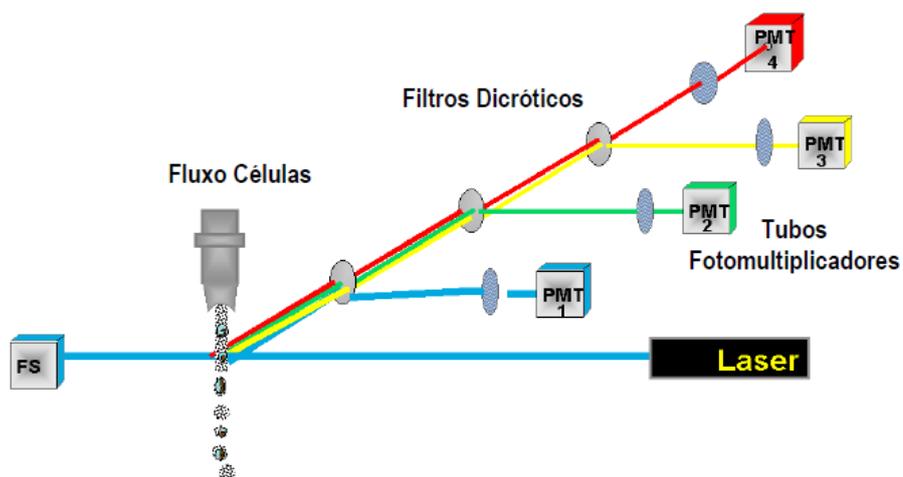
O princípio de Citometria consiste na passagem de partículas ou células em suspensão alinhadas uma a uma frente a um feixe luminoso. A interação das células ou partículas com o raio luminoso gera sinais que são conduzidos aos detectores fornecendo a informação sobre as diferentes propriedades biológicas e físico químicas, morfológicas e estruturais da célula. Esta informação é dada por dois parâmetros: os que provêm da dispersão da luz e os que estão relacionados com a emissão da luz por fluorocromos presentes na célula e que foram excitados pela fonte de radiação do aparelho. Os sinais luminosos detetados são transformados em impulsos elétricos que se amplificam e que se convertem em sinais digitais que são processados pelo computador.<sup>132</sup>

### 1.10.2. Constituição do Citómetro

O citómetro de fluxo é um equipamento óptico e hidráulico com a função de analisar partículas, como as células. O citómetro é constituído por cinco elementos: Fonte de luz (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir de uma gama espectral mais vasta,

fotodíodos ou fotomultiplicadores para a deteção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade que processa dados recolhidos<sup>131</sup> (figura 13).

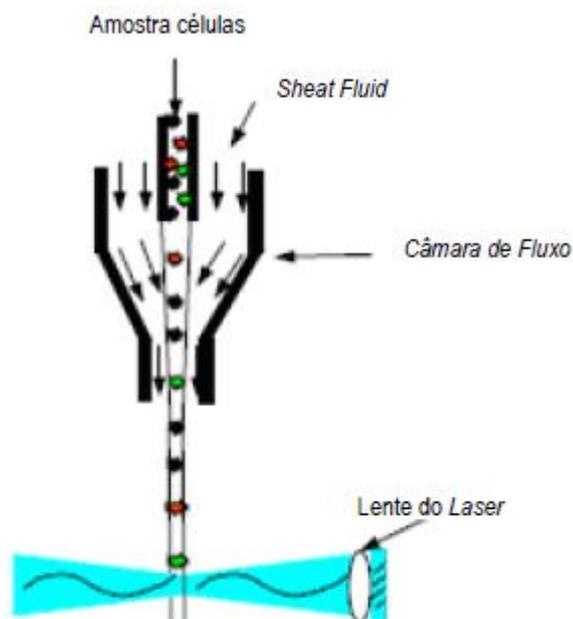
**Figura 14** - Esquema da constituição interna de um citómetro de fluxo



Fonte: <http://csm.colostate-pueblo.edu/biology/dcaprio/412L/Fluor1.html>

A Câmara de fluxo é constituída por dois compartimentos, o que contém o líquido com a suspensão celular e o que contém um fluido hidrodinâmico denominado envolvente e que rodeia o líquido que contém a amostra (figura 14)<sup>147</sup>.

Figura 15 - Representação de uma câmara de fluxo<sup>ix</sup>



Fonte: Nolla, H. (2008). Basic Principles in Flow Cytometry. U. o. California. Berkeley

A diferença de velocidades entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução de revestimento (Sheath fluid) é superior à da amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra para que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem detetar-se até 10000 células (eventos) por segundo.

A fonte luminosa é constituída por radiação laser e sistemas ópticos de focagem e direcionamento da luz. A maior parte dos citómetros de fluxo possuem 5 sistemas ópticos de medida: dois de dispersão da luz, um de forma frontal Fs (forward scattering) e o outro lateral SS (side scattering) e três de Fluorescências que se situam em ângulo reto e é a partir dos quais se determinam as células marcadas com fluorocromos.

O feixe de luz de excitação ao intercepar a célula na câmara sofre dispersão quer na direção frontal (forward scattering - Fs), proporcionalmente ao tamanho da célula, quer lateral (side scattering - SS), proporcionalmente à complexidade interna da célula (ou seja, à forma do núcleo, à quantidade e tipo de grânulos citoplasmáticos ou a rugosidade da membrana). Assim sendo, podemos separar as células pelas suas características físicas de tamanho e complexidade, mesmo na ausência de marcação com fluorocromos.

---

<sup>ix</sup> A passagem individual das células (eventos) é conseguida pela focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio da solução salina (sheath fluid).

A combinação dos dois tipos de luz dispersa revela informações importantes, nomeadamente, a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia.<sup>133</sup>

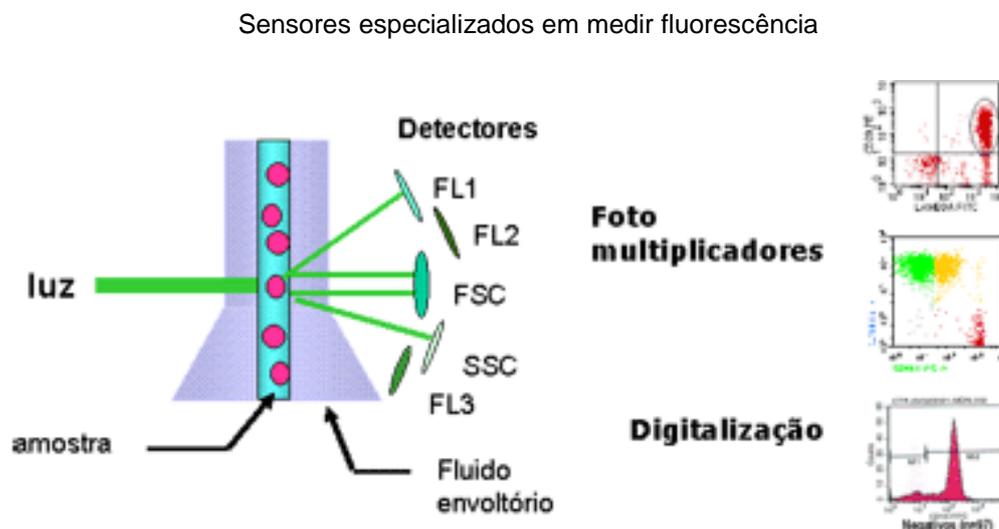
Simplificadamente, poderá dizer-se que o sensor de dispersão de luz frontal – FS dá informação sobre o tamanho da célula, baseado na difração e refração da luz, permite distinguir as células vivas dos restos celulares, enquanto o sensor de dispersão de luz lateral - SS, mede a luz dispersada, avalia a «granularidade» intracelular, constituída pelo núcleo, cromossomas, mitocôndrias e outros organelos ou partículas<sup>134</sup>.

A luz assim dispersa é detetada diretamente por fotodíodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores.

Os citómetros de fluxo possuem ainda um número variável de sensores especializados em medir fluorescência, nomeadamente a que provém de fluorocromos como o isotonicidade de fluorescência (FITC), ficoeritrina (PE), entre outros, que vão ser acoplados a anticorpos monoclonais. A fluorescência emitida é detetada por sensores que recebem o comprimento de onda selecionado. A especificidade da detenção de cada sensor é controlada pela seleção do comprimento de onda através da conjugação de filtros ópticos colocados previamente a esses sensores, permitindo separar os diversos componentes do espectro de emissão (Figura 15).

Os Fluorocromos são utilizados normalmente para determinar densidades de receptores específicos da superfície das células, identificam a presença de moléculas ou marcadores celulares, podendo também avaliar a densidade de expressão. Cada fluorocromo possui um padrão espectral distinto de absorção e emissão, de tal maneira que até três cores de luz podem ser opticamente separadas com os filtros seletivos encontrados nos citómetros comuns<sup>134</sup>.

Figura 16 – Citometria de Fluxo.



Fonte: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/manuais/manual-hematologia/Pages/imunofenotipagem-das-neoplasias-hematologicas.aspx>

### 1.10.3. Vantagens da Citometria de Fluxo

A informação que se pode retirar dos ensaios de viabilidade clássicos, sobre os estados fisiológicos das células, é limitada a dois níveis extremos de atividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente à morte celular. Contudo, por vezes, as células encontram-se num estado fisiológico intermédio entre o metabolicamente ativo e a morte celular, sendo que, o método tradicional não contabiliza essas células.

A vantagem da Citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na deteção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que realmente existem numa determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade populacional. Para além disso, os dados obtidos através das técnicas clássicas são relativos à cultura como um todo, ou seja, uma amostra representativa da cultura apresenta um único valor, referente à média dos valores de um determinado parâmetro, de todas as células. Mais uma vez, a Citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas, à escala da célula individual. Desta forma, dados que representam sub-populações diferentes podem fornecer uma “imagem” mais detalhada e real da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado bioprocessos.

A combinação de vários fluorocromos em Citometria de fluxo permite a diferenciação de diferentes sub-populações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Esta diferenciação levou à introdução do termo “viável, mas não

culturável”, aplicado a células que não estando metabolicamente ativas, também não estão mortas e, evidentemente, não são reveladas através dos ensaios de viabilidade celular. A utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial da membrana citoplasmática e a integridade da mesma, permitem caracterizar estes estados metabólicos.

De forma geral, a utilização da mistura de diversos corantes permite a diferenciação dos seguintes estados metabólicos funcionais: células saudáveis (com capacidade para se dividirem), “vitais”, intactas e permeabilizadas. Pensa-se que quando uma célula se encontra sob stress, alguns dos sistemas de transporte ativo são afetados (células “vitais”), seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, mais tarde, a sua permeabilização (células mortas)<sup>131;132</sup>.

Assim, é possível diferenciar o estado fisiológico de uma célula individual, para além do clássico e estrito conceito de viabilidade, baseado no funcionamento de alguns sistemas de transporte activo, ou na presença ou ausência da membrana citoplasmática intacta e polarizada.

A Citometria de fluxo surge assim como uma técnica consistente e fiável na deteção das verdadeiras percentagens de células viáveis e mortas, numa determinada população de células<sup>133</sup>.

**Quadro 3 - Vantagens e desvantagens da Citometria de Fluxo**

<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Rapidez de análise (100-500 células)</li><li>• Maior reprodutibilidade</li><li>• Avaliação de múltiplos parâmetros em células individuais</li><li>• Disponibilidade de amplo perfil de anticorpos específicos</li><li>• Análise de antigénios de superfície, intracitoplasmáticos e intranucleares</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Necessidade de células em suspensão</li><li>• Necessidade de contraste</li><li>• Necessidade de operadores qualificados</li><li>• Elevado custo</li></ul>



## **2. OBJECTIVOS**

Este trabalho tem como objectivo geral avaliar a Anexina V na Apoptose Celular em Concentrados de Eritrócitos por Citometria de Fluxo, tendo como finalidade, verificar se no final do prazo de armazenamento dos concentrados eritrocitários as células sofrem lesão ao ponto de se considerar produto inviável para transfusão.

### **2.1. Objectivo Geral**

O objetivo geral deste estudo pretende verificar se a aplicação da Anexina V é eficaz na deteção da apoptose nos Concentrados de eritrócitos ao longo do tempo de armazenamento tendo como controlo paralelo o grau de hemólise.

### **2.2. Objectivos Especificos**

Pretende-se com os objetivos específicos:

- a) Observar o grau de degradação dos CE's manipulados ao longo do tempo de armazenamento.
- b) Correlacionar o Grau de Hemolise com a determinação da apoptose dos eritrocitos através da Anexina V.
- c) Observar se o manuseamento e armazenamento desadequado do sangue compromete os requisitos definidos para vitalidade terapêutica deste produto sanguíneo.



### 3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este trabalho de investigação teve como objetivo contribuir para a construção de conhecimento relacionado com determinado fenómeno. Neste caso específico pretendeu-se verificar qual o comportamento da Anexina V na apoptose celular ao longo do armazenamento de Ce's (Concentrados de eritrócitos) relacionando com o grau de hemólise dos eritrócitos.

A teoria que suporta o âmbito e o objetivo desta dissertação, constituiu o fator determinante para a seleção das ações operacionais da atual pesquisa, que assentaram na análise e interpretação dos indicadores de qualidade dos Ce's armazenados na organização em análise porque "...a teoria é o ponto de partida insubstituível e o elemento que comanda os seus momentos e opções fundamentais..."<sup>135</sup>

É através da metodologia que se estuda, descrevem e explicam os métodos que se vão aplicar ao longo do trabalho, de forma a sistematizar os procedimentos adotados durante as várias etapas, procurando garantir a validade e a fidelidade dos resultados, obtidos no CST de Lisboa.

A metodologia surge como etapa fulcral da investigação, visto que orienta a pesquisa de forma a atingir os objetivos preconizados garantindo validade científica ao estudo. Atesta as estratégias adotadas pelo pesquisador para desenvolver informações precisas, objetivas e passíveis de interpretação. Em suma, a metodologia é o conjunto de conhecimentos ordenados, processos e técnicas que acompanham a elaboração do processo de investigação científica<sup>136;137;138</sup>.

A metodologia é então um conjunto de conhecimentos que permitem ao investigador orientar a pesquisa, ou seja, é um conjunto de procedimentos que o investigador utiliza para conduzir a sua pesquisa, de forma a obter uma resposta ao problema.<sup>136</sup>

A sua adequação fundamenta-se na necessidade que temos de escolher um desenho apropriado, explorar, descrever um fenómeno, examinar associações e diferenças ou verificar a hipótese. Esta etapa está na dependência estrita da natureza do problema de investigação e do "estado de arte".

A presente dissertação baseia-se no **método quantitativo - experimental**, com fins **descritivos simples**. O método quantitativo-descritivo consta da tipificação proposta por Creswell em 2002.<sup>138</sup>

O método serve para quantificar uma população e descrever dados de fontes secundárias, sem modificar o observado.

Assim, os resultados de um estudo desta natureza permitem aos investigadores tomar uma maior clareza o entendimento da sua realidade, e podem apoiar a tomada de decisões adequadas a um processo de melhoria contínua.

### 3.1. Metodologia

#### Actividades

Tal como descreve Fortin (2000), a realização deste trabalho de investigação teve como linhas orientadoras as questões éticas eminentes em todos os processos de investigação, que foram definidos e aceites pela comunidade de investigadores.<sup>136</sup>

No trabalho de investigação, teve-se em consideração os princípios regentes que decorrem do objetivo da mesma investigação, sem nunca pôr em causa o investigador e a população, sem que haja danos físicos, morais ou profissionais no decurso da investigação.

Ao longo deste estudo estiveram presentes os requisitos éticos definidos por Polit e Hungler<sup>138</sup>, o anonimato e carácter confidencial da informação.

Até ao resultado final deste estudo foi necessário desenvolver diversas actividades que seguidamente serão descritas de forma resumida:

Escolha de um tema pertinente para a realização do estudo;

➤ Proposta do tema à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e Universidade Atlântica para a realização da dissertação “Contribuição para o estudo da Anexina V na Apoptose Celular em Concentrado de Eritrócitos” - (Anexo 1);

➤ Pedido de autorização ao Presidente do Instituto Português do Sangue e Transplantação – IPST,IP – Dr. Álvaro Beleza, para o desenvolvimento do projecto – (Anexo 2);

➤ Autorização e motivação dos orientadores para a elaboração da dissertação do tema da tese de mestrado – (Anexo 2);

➤ Pesquisa bibliográfica referente à temática seleccionada;

➤ Preparação de todo o material necessário à atividade experimental, que serviu de suporte para a investigação científica a que nos propusemos.

- Disponibilização de quinze Ce's obtidos pelo CST de Lisboa;

- Anexina V (*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*);

- Ionóforo de Cálcio (*A23187*);

- Glicoforina A (*Bd Biosciences*)

- Citómetro de fluxo (*Faxcalibur – Bd Biosciences*)

- Vortex

**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

- Banho Maria
- Fotómetro Hemocue Plasma Low
- Pipetas (Enzifarma)
- Contador Celulas LH 750 Beckman Coulther (Izasa)

- Redação da fundamentação teórica que serviu de suporte à análise dos resultados obtidos;

### 3.2. Recolha de dados

A recolha de dados foi obtida no ano de 2012 e conjugou-se em diversas etapas de forma a alcançar a máxima viabilidade e exatidão na análise dos resultados.

#### Caraterização da Amostragem

O Instituto Português do Sangue e da Transplantação, nomeadamente o Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa disponibilizou quinze (15) CE's (Concentrados de Eritrócitos) como amostra aleatória para a investigação deste estudo. Estes componentes comportam características similares referenciadas na tabela abaixo.

**Quadro 4 - Caracterização da Amostra de estudo**

<b>Género</b>	<b>Idade</b>	<b>Grupo Sanguíneo</b>	<b>Hb CE's g/dL</b>	<b>Hb CE's g/unid</b>
<b>Feminino</b>	21	0+	17,4	41
	29	0+	17,8	42
	30	A+	17,1	51
	32	B+	18,5	52
	42	0+	17,2	47
	43	A+	17,8	44
	44	AB-	17,5	42
47	0+	17,6	48	
<b>Masculino</b>	32	A+	19,9	56
	45	B-	19,5	54
	46	A+	18,5	51
	49	A+	19,4	51
	52	A+	19,8	54
	58	A+	19,3	52
	65	0+	19,8	51

Como mostra o quadro 3 dos quinze CE's disponibilizados oito (8) foram resultantes de dadores do género feminino com idades compreendidas entre os [21;47] anos e sete (7) CE's resultantes de dadores do género masculino com idades compreendidas entre os [32;65]. Apesar do grupo sanguíneo não ser preponderante para a investigação a que nos propusemos, considerámos útil, em termos especulatórios, verificar a determinação de grupo nos sistemas ABO e Rh(D) dos CE's em análise. De referenciar que a Hb média dos CE's do género feminino é de 46 g/unidade e do género masculino se encontra nos 53 g/unidade, cumprindo todas as amostras os requisitos relativos ao controlo de qualidade dos componentes sanguíneos (Decreto-Lei 100/2011, publicado no Diário da República, 1ª série – Nº188 – 29 Setembro de 2011).

Os CE's são dos componentes mais utilizados na medicina transfusional pela sua ampla especificidade de atuação nas mais diversas patologias. Seguindo esta realidade, seria imprudente a utilização de um elevado número de CE's para este estudo.

Todas as amostras foram expostas a fatores standarizados, que desencadeiam a Hemólise (fora dos requisitos de qualidade) de modo a poder fazer-se um correlação entre os vários parâmetros analisados. Os CE's disponibilizados foram armazenados em empilhamento e expostos a temperatura não conforme (superior a 6°C).

### **3.3. Pré-aplicação da Técnica**

#### 3.3.1. Verificação da concentração ideal do eritrócito

Para definir qual a diluição de concentrado eritrocitário a utilizar fizeram-se várias diluições, com amostras aleatórias: 1/100, 1/500 de 1/1000, tendo-se verificado que a diluição ideal seria a de 1/100<sup>x</sup>.

#### 3.3.2. Verificação da concentração ideal do Ionóforo de Cálcio através de Citometria de fluxo.

O Ionóforo de Cálcio é um ionóforo carboxílico móvel para catiões bivalentes, nomeadamente cálcio (Ca<sup>2+</sup>). A utilização de ionóforo de cálcio contribuiu decisivamente para a compreensão do papel do Ca<sup>2+</sup> nos processos celulares. Não é possível injetar cálcio nas células, mas quando recorrendo a este ionóforo o transporte deste ião torna-se possível.<sup>139</sup>

Muitas respostas fisiológicas normalmente accionadas pela ligação de hormonas a receptores membranares de superfície podem ser deduzidas pela utilização de ionóforo de cálcio que faz

---

<sup>x</sup> Bula: "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD", BD logo and all other trademarks are property of becton, Dickinson and Company, 2008 BD

elevar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular<sup>19</sup>. Assim, numa primeira fase foi preponderante verificar a concentração ideal de ionóforo de cálcio que permite aumentar as concentrações intracelulares de cálcio livre que irá estimular a apresentação de Fosfatidilserina no folheto externo da membrana celular.

Para definir qual a concentração de Ionóforo de Cálcio a utilizar, testaram-se diferentes concentrações: 2,5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ .

Em tubos de Citometria (BD) marcaram-se as seguintes concentrações 2,5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , tendo-se adicionado os seguintes volumes de concentrado eritrocitário diluído previamente a 1/100 e Ionóforo de Cálcio a cada tubo:

**Quadro 5 - Concentrações e volumes de CE's diluídos com Ionóforo de Cálcio**

	CEs 1/100	IC
Tubo 1 (2,5 $\mu\text{M}$ )	99 $\mu\text{l}$	0,6 $\mu\text{l}$
<b>Tubo 2 (4 <math>\mu\text{M}</math>)<sup>xi</sup></b>	<b>99<math>\mu\text{l}</math></b>	<b>1<math>\mu\text{l}</math></b>
Tubo 3 (5 $\mu\text{M}$ )	99 $\mu\text{l}$	1,25 $\mu\text{l}$
Tubo 4 (10 $\mu\text{M}$ )	97 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$

Os referidos tubos, foram ao vortex durante 5 segundos e posteriormente os mesmos foram colocados tapados num banho-maria a 37°C durante 45 minutos; a cada tubo foi adicionado 1mL de PBS 1X, previamente filtrado através de um filtro 0,2  $\mu\text{m}$ , e centrifugado a 1500 rpm, durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 100  $\mu\text{l}$  de Tampão Binding Buffer<sup>xii</sup> (BD Biosciences); adicionou-se 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V FITC (BD Biosciences) e 20  $\mu\text{l}$  de Glicoforina A diluída<sup>xiii</sup> (BD Biosciences) a cada tubo, sendo os mesmos incubados durante 15 minutos no escuro. Adicionou-se 400  $\mu\text{l}$  de Tampão Binding Buffer (BD Biosciences) e os tubos foram processados num Citómetro FACSCalibur (BD Biosciences); gravaram-se 50.000 eventos totais que foram posteriormente analisados com o Software CellQuest Pro. Pode-se assim verificar que a concentração ideal de ionóforo de cálcio utilizada foi de 4 $\mu\text{M}$ .

<sup>xi</sup> Concentração ideal para utilizar na técnica.

<sup>xii</sup> Tampão contendo concentração óptima de cálcio, permitindo a ligação da anexina V com a fosfatidilserina.

<sup>xiii</sup> Preparou-se com 20l de Glicoforina e 490l de Albumina a 2% (procedimento aplicado pelo laboratório de controlo de qualidade do CST de Lisboa)

○ **Citómetro de Fluxo**

Os dados foram adquiridos após ter sido verificado a sensibilidade e os ajustes do citómetro de fluxo através da utilização de esferas de calibração (CaliBrites) e posterior leitura no Software Facscomp.

As microesferas CaliBRITE™ da BD são utilizadas para calibrar o Citómetro de fluxo antes de processar as amostras celulares, e que simulam tanto células não marcadas como células marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos. Estas microesferas são utilizadas para ajustar a calibração do instrumento, configurar a compensação entre fluorescências e verificar a sensibilidade.<sup>140</sup>

As microesferas CaliBRITE são constituídas por jogos de duas ou três cores. O jogo de duas cores contém três tipos diferentes de microesferas CaliBRITE: não marcadas, marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e marcadas com ficoeritrina (PE). O jogo de três cores contém além das mesmas microesferas do jogo de duas cores microesferas marcadas com a proteína peridinina clorofila (PerCP).<sup>140</sup>

O quadro 6 ilustra a deteção de sinais luminosos com os PMT:

**Quadro 6 - Deteção de sinais luminosos com os PMT**

<b>PMT</b>	<b>Sinal Primário Detetado</b>
Fluorescência 1 (FL1)	FITC (amarelo – verde)
Fluorescência 2 (FL2)	PE (roxo – laranja)
Fluorescência 3 (FL3)	PerCP (Roxo)

Uma vez determinados os ajustes do equipamento, utiliza-se as microesferas CaliBrite para avaliar a sua sensibilidade. A sensibilidade do instrumento para a dispersão frontal (FSC) e para a dispersão lateral (SSC) determina-se pela separação média de canais entre o sinal de dispersão da luz das microesferas e o sinal de fundo (eletrónica e óptica). A sensibilidade das fluorescências FL1, FL2 e FL3 determina-se medindo a separação entre os sinais das microesferas marcadas e não marcadas. Deve-se ter uma separação mínima entre os canais para os parâmetros de dispersão e de fluorescência, o que permite distinguir as células dos restos celulares e distinguir também entre células marcadas das não marcadas.<sup>140</sup>

### 3.3.3. Implementação dos Controlos

Neste estudo foram realizados três controlos de qualidade no intuito de verificar a aplicabilidade/funcionalidade da técnica. Utilizou-se um controlo positivo e dois controlos negativos, um controlo negativo de marcação e um controlo negativo de estimulação.

- **Controlo Positivo**

O controlo positivo foi realizado com o objectivo de verificar a funcionalidade da técnica (validar). Foi constituído com 99µl de células, 1µl de Ionóforo de Cálcio, 5 µl de Anexina V FITC (BD Biosciences) e 20 µl de Glicoforina A diluída (BD Biosciences).

- **Controlo Negativo**

No controlo negativo foram utilizadas amostras de CE`s com cinco dias de armazenamento, ou seja, CE`s recentemente produzidos no sentido de evitar interferências no que diz respeito à hemólise.

- **Controlo Negativo de Estimulação**

O controlo negativo de estimulação é constituído por 99 µl de células, 5 µl de Anexina V FITC (BD Biosciences) e 20 µl de Glicoforina A diluída (BD Biosciences), não foi adicionado qualquer tipo de estimulação.

- **Controlo Negativo de Marcação**

O controlo negativo de marcação é constituído por 99 µl de células, 1 µl Ionóforo de cálcio, ou seja, não foi adicionado qualquer tipo de marcação.

### 3.4. Aplicação das Técnicas

Para este estudo foi realizada a determinação da apoptose através da Anexina V comparativamente com a determinação do grau de hemólise ao longo do tempo de armazenamento (5<sup>o</sup>,30<sup>o</sup>,35<sup>o</sup>,42<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dias de armazenamento).

3.4.1. Aplicação da técnica por Citometria de Fluxo nas amostras de CE's para determinação de Apoptose através da Anexina V.

A deteção de Fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana celular foi realizada recorrendo ao anticorpo monoclonal Anexina V conjugada com FITC.

Como já foi referido, a Anexina V marcada com fluorocromos é bastante usada para a deteção *in vitro* de células em apoptose<sup>33</sup>. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em Citometria de Fluxo.<sup>141</sup>

Esta técnica foi efetuada após a colheita de amostras dos CE's (disponibilizados pelo armazenamento e distribuição dos componentes sanguíneos do CST Lisboa) ao 5<sup>o</sup>; 30<sup>o</sup>; 35<sup>o</sup>; 42<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dia de armazenamento.

Foram primeiramente obtidas amostras em tubos secos de concentrados eritrocitários, tendo-se utilizado para quantificação da viabilidade celular  $1 \times 10^6$  células.

Para definir qual a diluição de concentrado eritrocitário a utilizar fizeram-se várias diluições, com amostras aleatórias: 1/100, 1/500 de 1/1000, tendo-se verificado que a diluição ideal seria a de 1/100<sup>140</sup>.

Para cada tubo seco pipetou-se 100µl de células (amostra) com a diluição de 1/100, foi adicionada 5µl de Anexina V FITC (BD Biosciences) e 20µl de Glicoforina A diluída (BD Biosciences), sendo os mesmos incubados durante 15 minutos no escuro. Adicionou-se 400 µl de Tampão Binding Buffer (BD Biosciences) e os tubos foram adquiridos num Citómetro FACSCalibur (BD Biosciences); gravaram-se 50.000 eventos totais que foram posteriormente analisados com o Software CellQuest Pro.

### 3.4.2. Aplicação da técnica por Grau de Hemólise nas amostras de CE's

A técnica por grau de hemólise foi efectuada, seguindo os mesmos requisitos referidos a seguir.

Após a colheita das amostras, foi executado o hemograma de cada amostra no contador hematológico LH 750 Beckman Coulter (Izasa), com o objectivo de determinar o hematócrito e a hemoglobina total de cada CE, para posteriormente se poder calcular o grau de hemólise.

De seguida, as amostras foram centrifugadas a 4500rpm durante 7 minutos de modo a se separar o plasma residual do concentrado de hemácias, retirou-se o plasma sobrenadante para um novo tubo seco, sendo este centrifugado sob as mesmas condições (4500 rpm durante 7 minutos). O plasma sobrenadante deste segundo tubo foi retirado para um terceiro tubo seco, tubo final a ser analisado no fotómetro Hemocue Plasma Low de modo a se quantificar a hemoglobina livre de cada amostra.

Para calcular o Grau de Hemólise foi utilizada a seguinte fórmula:

$$GH (\%) = \frac{(100 - Hct) \times Hbl}{Hbt}$$

Em que:

GH(%) - Grau de hemólise (%)

Hct - Hematócrito (%)

Hbl - Hemoglobina livre (g/dL)

Hbt - Hemoglobina total (g/dL)



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

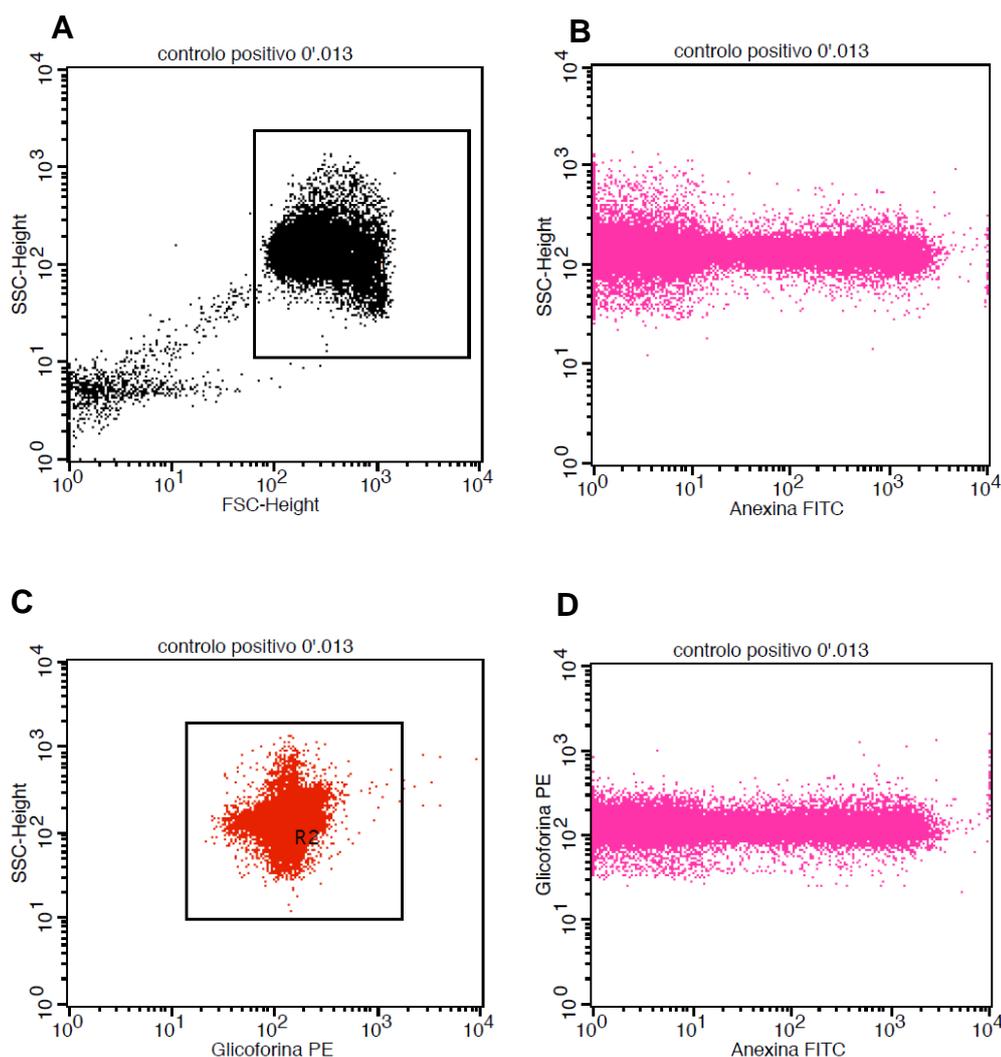
### 4.1. Controlo de Qualidade

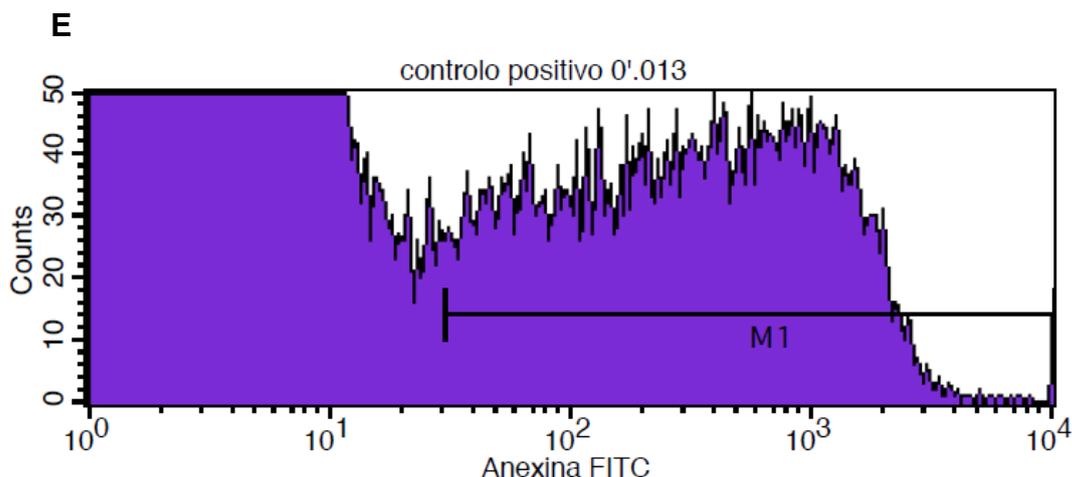
#### ➤ *Controlo Positivo*

Para a validação e execução da técnica, os resultados do gráfico 1, foram expressos com gráficos de dispersão de fluorescências (histogramas), obtidos por Citometria de fluxo e pelo Software CELLQUEST (BD).

De acordo com o gráfico 1 verificou-se que ao conjugar o ionóforo de cálcio com a Anexina V, ocorre um aumento de células apoptóticas e conseqüentemente um aumento da intensidade de fluorescência marcada com Anexina V.

**Gráfico 1 - Citometria de Fluxo do Controlo Positivo**





**E'**

Histogram Statistics

File: controlo positivo 0'.013  
 Sample ID: controlo positivo 0'  
 Tube: tube #1  
 Acquisition Date: 12-Oct-12  
 Gated Events: 48799  
 X Parameter: Anexina FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: ANEXINA  
 Gate: G3  
 Total Events: 50000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	48799	100.00	97.60	174.51	11.36	273.58	4.78	1
M1	30, 9910	15164	31.07	30.33	552.05	287.66	131.46	305.05	378

(A) Gráfico de dispersão, presença de eritrócitos; (B) Marcação da Anexina FITC; (C) Marcação com Glicoforina A; (D) Comparação da Anexina FITC (FL1) com Glicoforina A (FL2); (E) Marcações da Anexina FITC ligada a Ionóforo de Cálcio A23187 (M1); (E') 31% das células expressam fosfatidilserina na membrana do eritrócito.

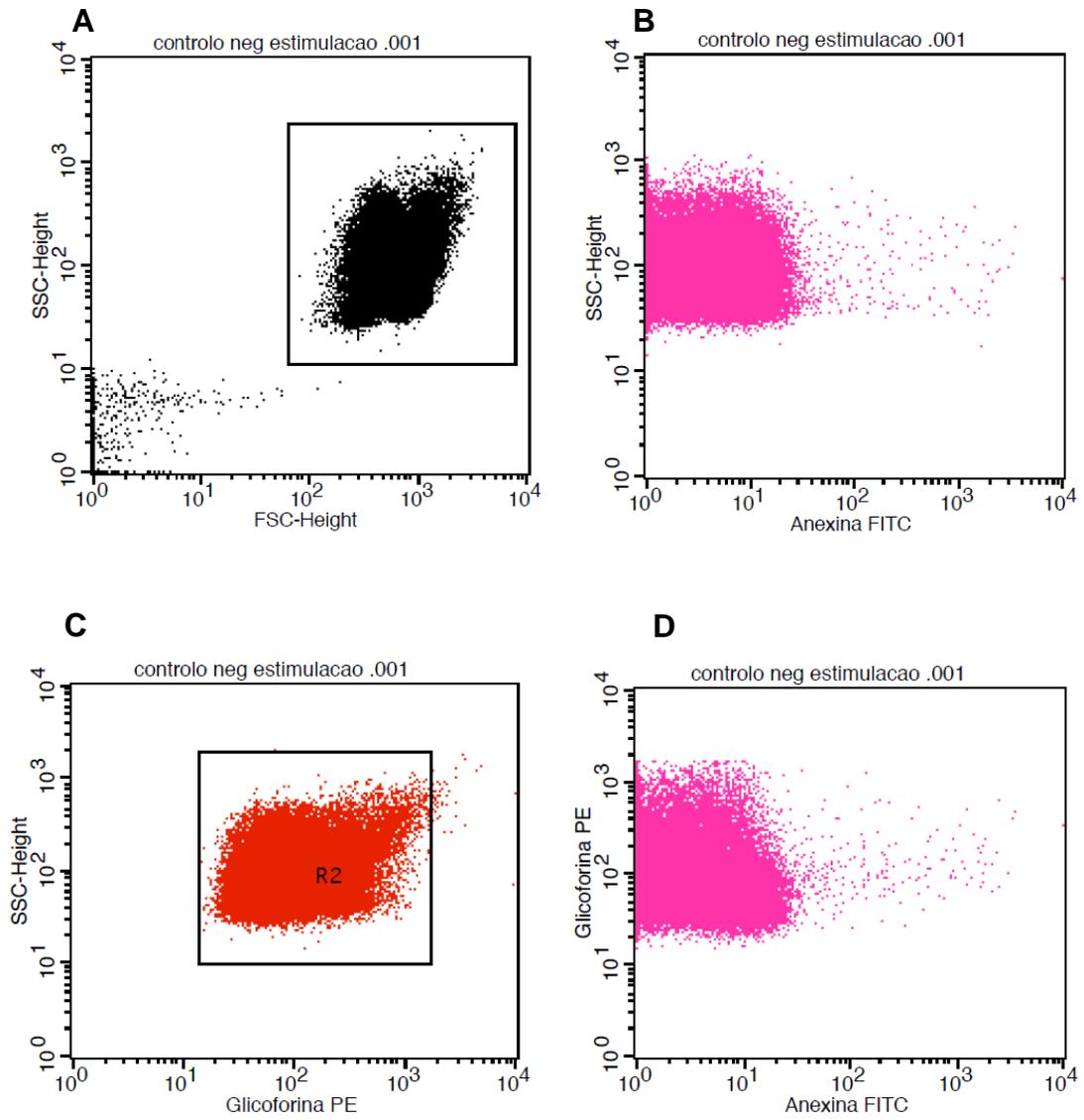
➤ **Controlo Negativo**

- Controlo Negativo de Estimulação

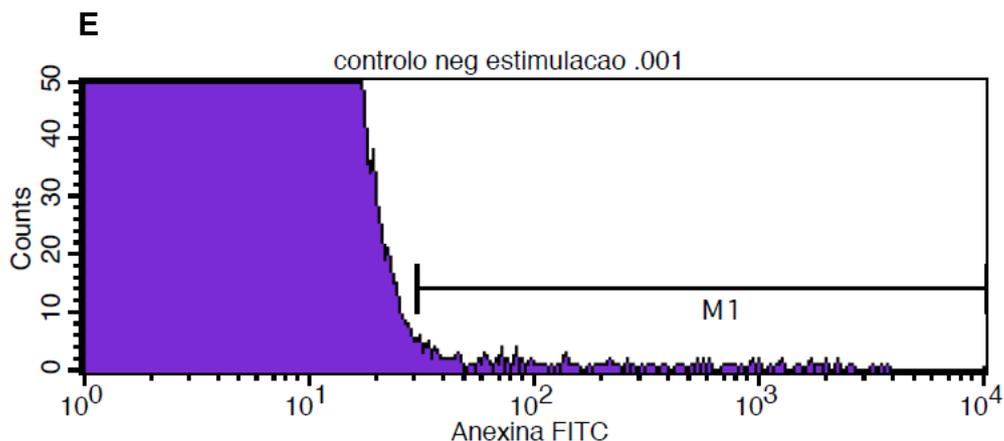
Para a validação e execução da técnica, os resultados do gráfico 2, foram expressos com gráficos de dispersão de fluorescência (histograma), obtidos por Citometria de fluxo e acompanhado pelo Software CELLQUEST (BD).

De acordo com o gráfico 2 pode-se verificar que ao não aplicar qualquer tipo de estimulação, a percentagem de células que sofreram apoptose é inferior aos valores apresentados no gráfico 1 e conseqüentemente a intensidade de fluorescência marcada com Anexina V é inferior.

Gráfico 2 - Citometria de Fluxo do Controlo Negativo de Estimulação



Maria Joana Damásio Galhardas



**E'**

Histogram Statistics

File: controlo neg estimulacao .001      Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: controlo neg estimulacao      Patient ID:  
 Tube: tube #1      Panel: ANEXINA  
 Acquisition Date: 12-Oct-12      Gate: G3  
 Gated Events: 49168      Total Events: 50000  
 X Parameter: Anexina FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	49168	100.00	98.34	6.56	3.24	995.30	3.16	1
M1	30, 9910	233	0.47	0.47	380.95	125.40	228.69	79.15	31

**(A)** Gráfico de dispersão, presença de eritrócitos; **(B)** Marcação da Anexina FITC; **(C)** Marcação com Glicoforina A; **(D)** Comparação da Anexina FITC (FL1) com Glicoforina A (FL2); **(E)** Marcações da Anexina FITC; **(E')** as células não estimuladas apresentam 0,47% de células marcadas com Anexina FITC.

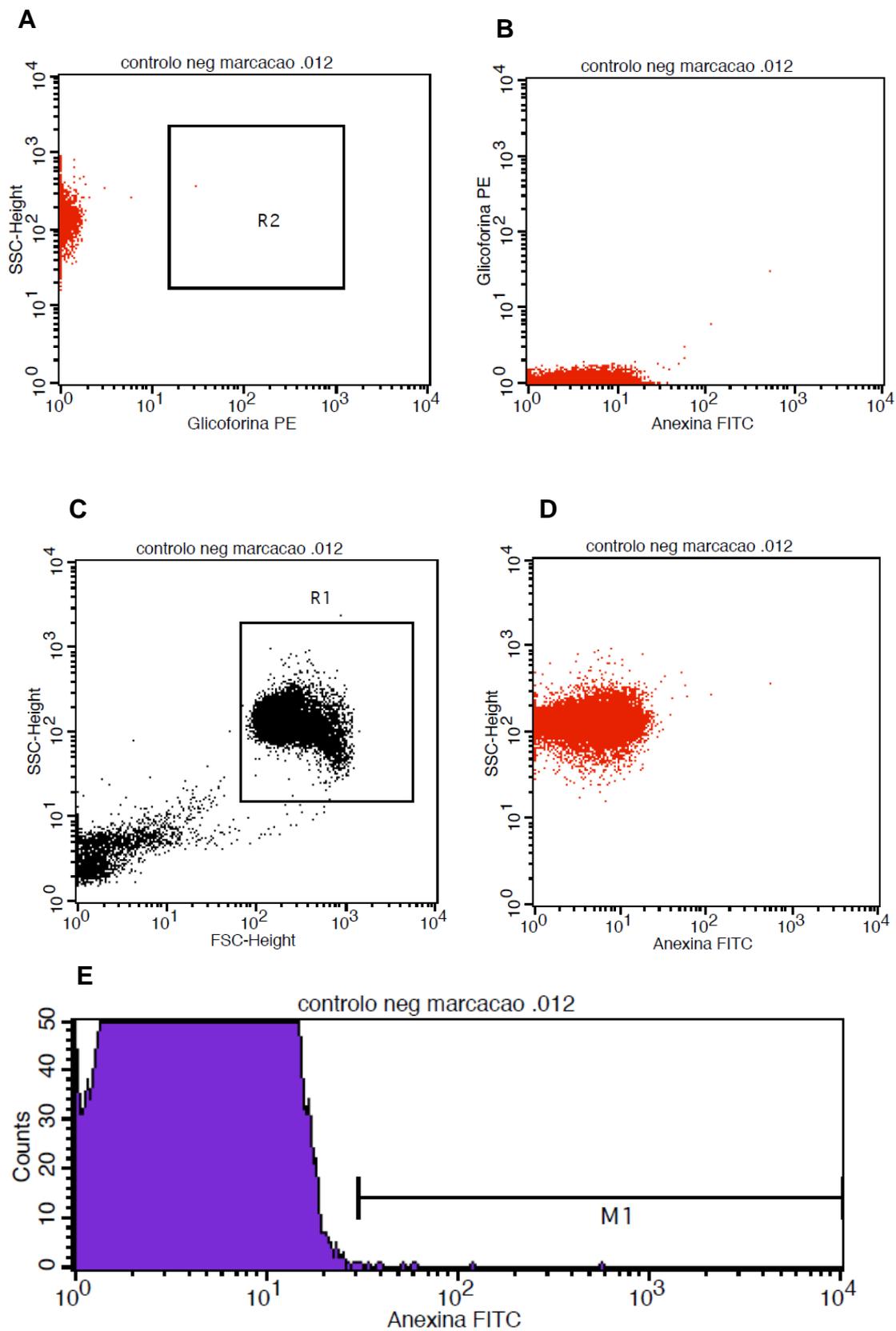
- Controlo Negativo de Marcação

Para a validação e execução da técnica, os resultados do gráfico 3, foram expressos com gráficos de dispersão, obtidos por Citometria de fluxo e acompanhado pelo Software CELLQUEST (BD).

De acordo com o gráfico 3 observou-se que ao não adicionar qualquer tipo de marcação a intensidade de fluorescência marcada com Anexina V é nula.

Maria Joana Damásio Galhardas

Gráfico 3 - Controlo negativo de marcação



**Maria Joana Damásio Galhardas**

**E'**

Histogram Statistics

File: controlo neg marcacao .012      Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: controlo neg marcacao      Patient ID:  
 Tube: tube #1      Panel: ANEXINA  
 Acquisition Date: 12-Oct-12      Gate: G1  
 Gated Events: 46877      Total Events: 50000  
 X Parameter: Anexina FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	46877	100.00	93.75	5.96	4.95	71.46	5.42	1
M1	30, 9910	9	0.02	0.02	107.22	63.08	154.12	50.94	30

(A) Slide de dispersão, presença de eritrócitos; (B) Marcação da Anexina FITC, sem qualquer tipo de marcação; (C) Marcação com Glicoforina A, sem marcação; (D) Comparação da Anexina FITC (FL1) com Glicoforina A (FL2); (E) Marcações da Anexina FITC; (E') as células não marcadas apresentam 0,02%, ou seja, sem qualquer tipo de fluorescência.

**4.2. Aplicação da técnica por Citometria de Fluxo nas amostras de CE's para determinação de Apoptose através da Anexina V**

No quadro 7 estão pautados os valores medios e respetivo desvio padrão aquando da utilização da tecnica por Citometria de Fluxo, ao 5º; 30º; 35º; 42º e 45º dias de armazenamento dos CE's. Os resultados são expressos em percentagem de células identificadas com base na positividade de marcação para a Anexina V FITC. Verifica-se assim que nos primeiros cinco dias a média de fosfatidilserina marcada com Anexina V, presente no folheto externo da membrana dos eritrócitos, não ultrapassa os 0,31% tendo um desvio padrão de  $\pm 0,2$ . Verifica-se que ao longo dos dias os valores médios de fosfatilserina nos eritrócitos aumenta e consequentemente o desvio padrao sofre a mesma alteração. De salientar que no quadragésimo quinto dia a média não ultrapassa os 0,78% e o desvio padrão de  $\pm 0,4$ .

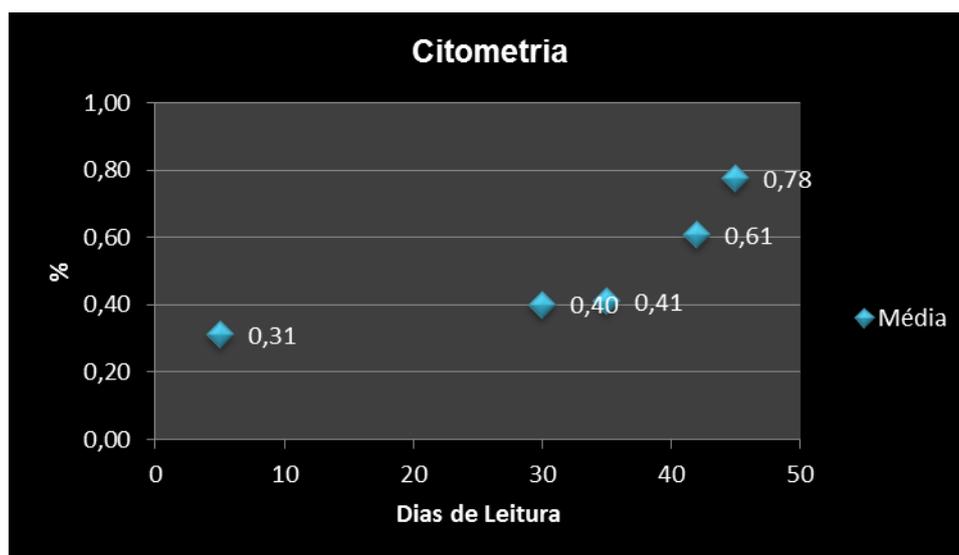
Verificou-se que durante o armazenamento dos CE's, os eritrócitos tornam-se cada vez mais suscetíveis à perda da assimetria de fosfolípidos, a percentagem de PS exposta nos eritrócitos aumentou de 0,31% para 0,78% após 45 dias de armazenamento.

**Quadro 7** - Média e Desvio Padrão da leitura da apoptose dos eritrócitos por Citometria de Fluxo

Dias	5	30	35	42	45
Média	0,31	0,40	0,41	0,61	0,78
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4

No gráfico 4 apresenta a variação dos valores médios da percentagem da fosfatidilserina marcada com a Anexina V nos Ce's armazenados do 5º ao 45º dia.

**Gráfico 4** - Média e Desvio Padrão da leitura da apoptose dos eritrócitos por Citometria de Fluxo



De acordo com o quadro 7 e gráfico 4 verificou-se que os eritrócitos, ao longo dos dias de armazenamento, vão sofrendo apoptose e conseqüentemente podemos afirmar que os CE's diminuem a viabilidade.

#### 4.3. Aplicação da técnica por Grau de Hemólise nas amostras de CE's

A hemólise é definida na literatura, como já referido anteriormente, como um rompimento da membrana da hemácia, o que provoca a libertação da hemoglobina e outros componentes internos para o plasma.

O quadro 8 e gráfico 5 mostram os valores médios do grau de hemólise dos eritrócitos avaliados no 5º; 30º; 35º; 42º e 45º dia de armazenamento dos CE´s.

O grau de hemólise foi avaliado de acordo com os parâmetros em vigor pela legislação:

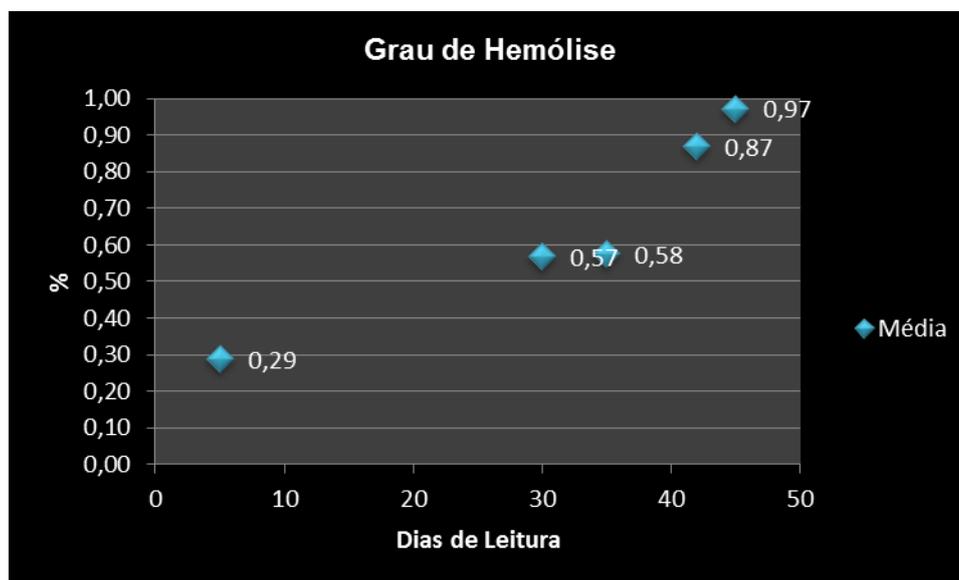
- Hemoglobina Livre (g/dl) no plasma dos CE´s,
- Hematócrito (%)
- Hemoglobina Total (g/dl).

Em valores normais o grau de hemólise não pode ultrapassar 0,8% da massa eritrocitária (Diário da República, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011- Decreto-Lei n.º 100/2011, que veio atualizar *DL 267/2007, 24 Julho de 2007*)

**Quadro 8** - Média e desvio Padrão da leitura da Hemólise dos eritrócitos pelo método Grau de Hemólise

Dias	5	30	35	42	45
Média	0,29	0,57	0,58	0,87	0,97
Desvio Padrão	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4

**Gráfico 5** - Média das leituras da Hemólise dos eritrócitos pelo método Grau de Hemólise



O gráfico acima apresentado mostra a média da percentagem de eritrócitos que sofreram hemólise no 5º, 30º, 35º, 42º, 45º dias de armazenamento, através da técnica Grau de Hemólise. Poderemos afirmar que a hemólise dos eritrócitos vai aumentando ao longo dos dias de armazenamento confirmando, desta forma, a investigação realizada por Gkoumassi, E. e coautores que referem que a “taxa de hemólise aumenta durante o armazenamento dos CE’s”.

Ao 5º dia, a média de hemólise é de 0,29% ± 0,1 enquanto que ao 42º dia (limite máximo de armazenamento dos CE’s para posterior transfusão – requisito de qualidade definido no guia “Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components” do Conselho da Europa) apresenta um valor de 0,87% ± 0,4. Considerando que em Portugal o valor médio da hemólise do CE’s não pode ser superior a 0,8% (Diário da República, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011- Decreto-Lei n.º 100/2011, que veio atualizar DL 267/2007, 24 Julho de 2007) para garantir a qualidade e segurança do componente sanguíneo e do receptor da transfusão, salientamos que o valor aumentado deveu-se ao facto dos CE’s terem sido tratados de forma a que a hemólise se acentuasse. Assim, verificamos que, apesar da manipulação incorreta dos CE’s, o valor médio da destruição celular (hemólise) não chega aos 0,9%, até ao 42º dia.

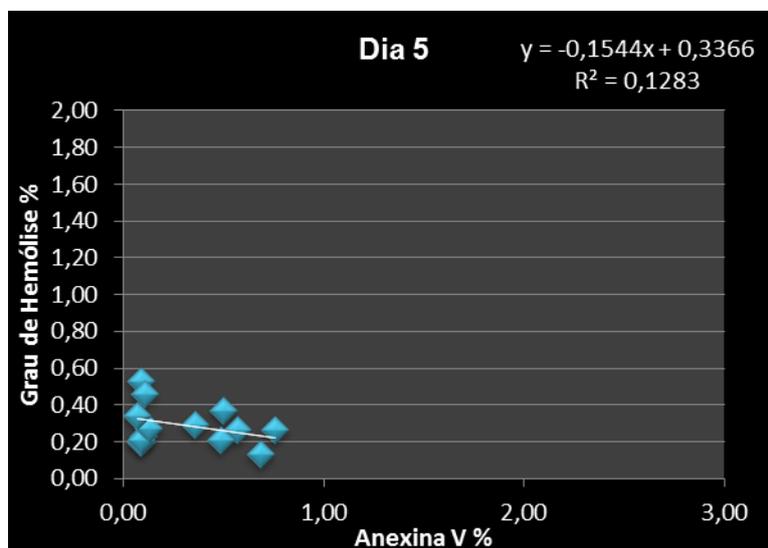
#### 4.4. Correlação dos dois métodos Anexina V vs Grau de Hemólise

Para fazermos a correlação dos dois métodos estudados, utilizámos um gráfico de dispersão com linha de tendência linear estatística<sup>xii</sup> e o Coeficiente de correlação de Pearson<sup>142;143;144</sup>.

- Gráficos de Dispersão com Linha de Tendência Linear Estatística

Nos gráficos abaixo apresentados representam a correlação entre a aplicação da Anexina V, por citometria de fluxo, com o grau de Hemólise dos CE's armazenados ao 5º; 30º; 35º; 42º e 45º dias.

**Gráfico 6** - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 5º dia de armazenamento dos CE's



---

<sup>xii</sup> Uma linha de tendência é mais fiável quando o respetivo valor de  $R^2$  é ou está próximo de 1.

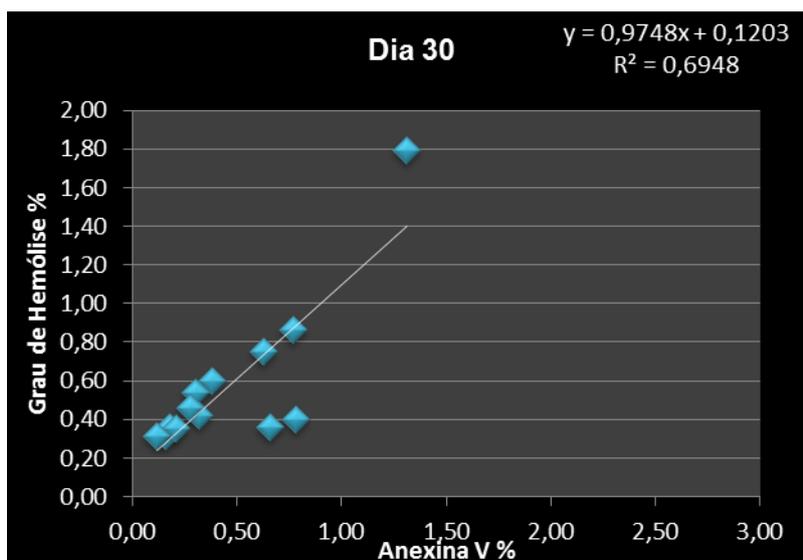
**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

De acordo com o gráfico 6 podemos verificar que até ao 5º dia de armazenamento, os CE's não apresentam correlação entre a Anexina V e o grau de hemólise. Sabendo que uma linha de tendência é mais fiável quando o respetivo valor de "R<sup>2</sup>" é ou está próximo de 1 verificamos que o mesmo apresenta um valor de 0,1283, podemos considerar que os CE's armazenados até ao 5º dia apresentam um grau de hemólise insignificante do ponto de vista da terapeutico, apesar da manipulação inadequada.

Consideramos pois, que apesar da indução da hemólise, os CE's aquando armazenados, de acordo com as normas de qualidade referenciadas (2 a 6º) e acondicionados a sua viabilidade é garantida.

**Gráfico 7** - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 30º dia de armazenamento dos CE's

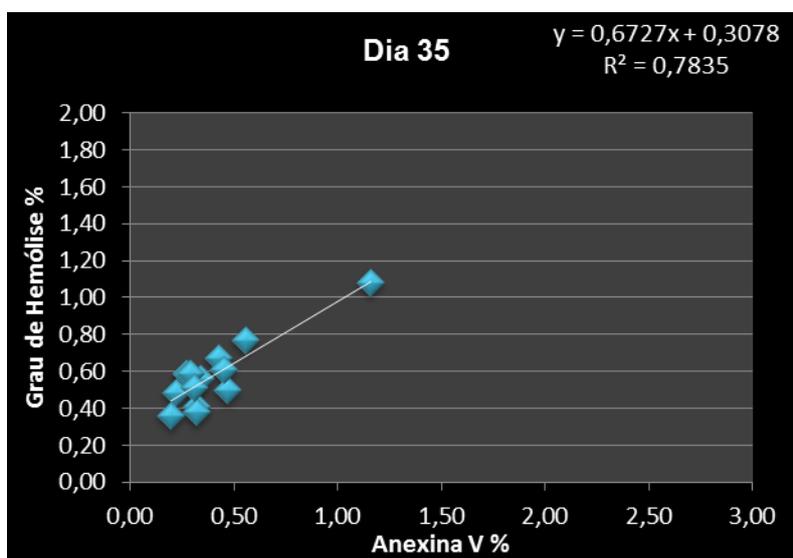


**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

Ao 30º dia verificamos uma subida abrupta do “R<sup>2</sup>” (0,6948) verificando assim uma correlação entre os dois métodos. Podemos afirmar e, de acordo com o gráfico 7, ao 30º dia de armazenamento os Ce’s apresentam um aumento significativo da hemólise dos componentes eritrócitários, confirmando assim a tendência da instabilidade deste produto ao longo do tempo de armazenamento.

**Gráfico 8** - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 35º dia de armazenamento dos CE's

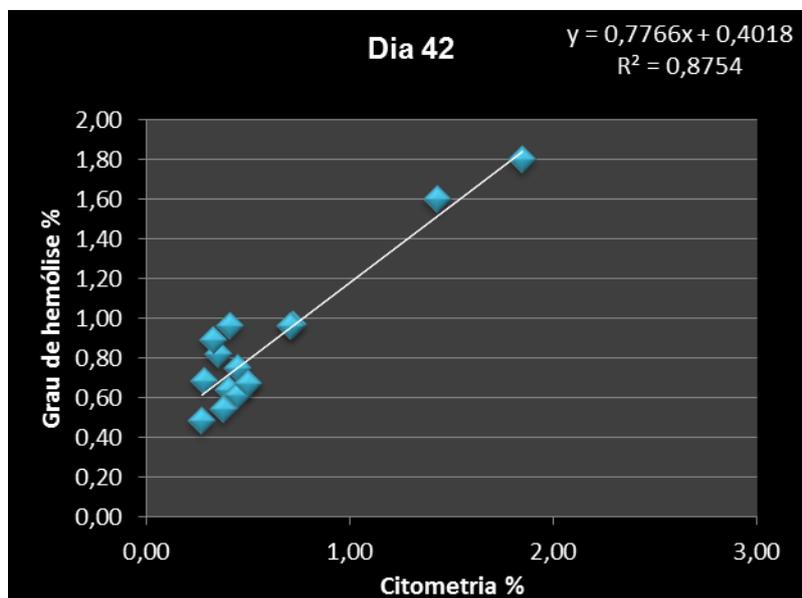


O gráfico 8 apresenta os valores correlacionais da Anexina V e o grau de hemólise dos Ce's armazenados ao 35º dia. De acordo com os dados apresentados verifica-se um aumento da correlação destes dois métodos. Enquanto que ao 5º dia a Anexina V e o grau de Hemolise não ultrapassavam os 0,09% – 0,19% respetivamente, ao 35º dia, o valor mais baixo da correlação destes dois métodos, não é inferior a 0,20% – 0,36%.

Maria Joana Damásio Galhardas

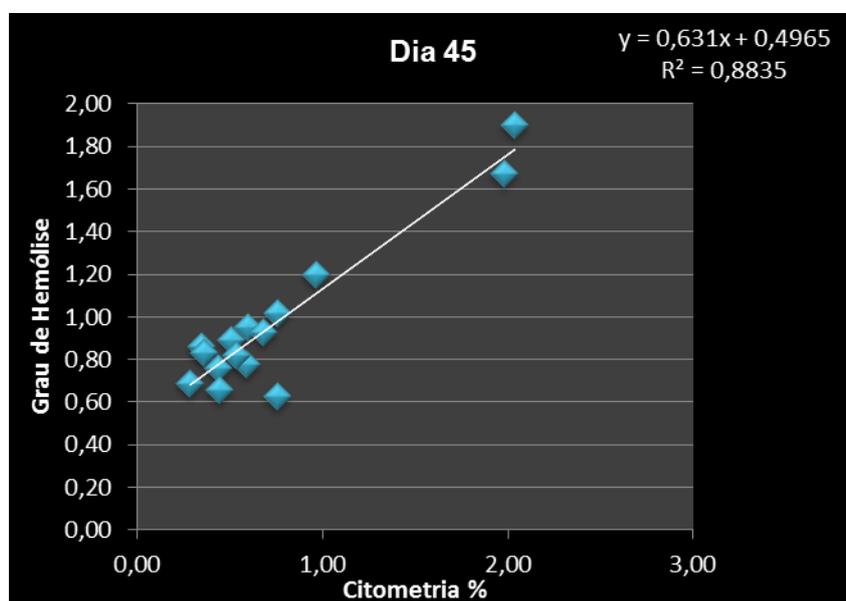
---

**Gráfico 9** - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 42º dia de armazenamento dos CE's



De acordo com o gráfico 9, referente à correlação dos valores da Anexina V e o grau de hemólise dos eritrocitos no 42º dia de armazenamento, verifica-se que os valores mantêm a tendência confirmada nos gráficos anteriores. De salientar que o "R<sup>2</sup>" apresenta um valor de 0,8754. Considerando os valores do 5º dia de armazenamento (primeiro valor a ser analisado) com o 42º verificamos um aumento do "R<sup>2</sup>" de 0,7471.

**Gráfico 10** - Correlação da Anexina V, por Citometria de Fluxo, com o Grau de Hemólise no 45º dia de armazenamento dos CE's



No 45º e último dia de armazenamento as amostras de CE's manipuladas para a indução da hemólise verificou-se que apesar de um aumento, pouco significativo do  $R^2$  relativamente ao 42º dia, o facto é que este valor, tendencialmente vai aumentando chegando ao 0,8835 – valor muito aproximado de 1.

Neste tipo de correlação estamos a avaliar a apoptose dos eritrócitos através da avaliação da Anexina V por Citometria de Fluxo com a percentagem de Hemólise que os eritrócitos sofrem ao longo do prazo de armazenamento, desde o 5º ao 45º dia.

Assim vejamos:

**Quadro 9** - Valores do  $R^2$  avaliados durante os 45 dias de armazenamento na correlação dos dois métodos

Avaliação dos CE's armazenados	Valor do $R^2$
5º dia	0,1283%
30º dia	0,6948%
35º dia	0,7835%
42º dia	0,8754%
45º dia	0,8835%

Tendo em conta os gráficos de correlação entre os métodos da Anexina V e Grau de Hemólise dos CE's armazenados, desde o 5º até ao 45º dias, e os valores do  $R^2$  expressos na tabela 3 observou-se que no início do armazenamento (5º dia) os valores são baixos inviabilizando a correlação entre as técnicas. Com o decorrer do tempo de armazenamento verifica-se um aumento do  $R^2$  possibilitando, desta forma, fazer a correlação das duas técnicas e concluir que o  $R^2$ , tendencialmente, aumenta chegando a um valor muito próximo do 1.

Desta forma, poderemos afirmar que, e num âmbito geral, os CE's ao longo do tempo de armazenamento, vão sofrendo apoptose e a degradação celular é evidente tornando-se num produto pouco viável para transfundir quando ultrapassado o prazo de armazenamento preconizado (42 dias).

Makroo e coautores em 2011, assumem que o armazenamento de CE's provoca um aumento progressivo da degradação celular e que, apesar de o uso de soluções aditivas para armazenamento e filtros para leucoredução, a hemólise é inevitável. A extensão da hemólise, no entanto, não deve exceder o limite permitido mesmo no dia 42 de armazenamento (*Diário da República*, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011- Decreto-Lei n.º 100/2011, que veio transpor *DL 267/2007, 24 Julho de 2007*).

- **Coeficiente de Correlação de Pearson**<sup>142;143;144</sup>

No que diz respeito ao Coeficiente de Correlação de Person sabemos que (r) varia de -1 a 1. O sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o total de uma variável pode ser determinado exatamente ao se saber o total da outra. No outro oposto, uma correlação de valor zero indica que não há relação linear entre as variáveis.

**Quadro 10 - Coeficiente de Correlação de Pearson**

<b>Coeficiente de Correlação</b>	<b>Correlação</b>
$r = 1$	Perfeita positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva
$0 < r < 0,1$	Infima positiva

**Maria Joana Damásio Galhardas**

---

0	Nula
$-0,1 < r < 0$	Infima negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$r = -1$	Perfeita negativa

Assim, e de acordo com os valores de (r) encontrados na correlação do grau de hémolise e Anexina V, e tendo em conta os valores referenciados do Coeficiente de Correlação inseridos no quadro 8, podemos afirmar que existe uma forte correlação positiva entre os valores das duas técnicas aplicadas (  $r = 0,96$ ).



## **5. CONCLUSÃO**

Em Portugal, o Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST) é a maior organização de colheita e produção de componentes sanguíneos, fornecendo mais de 60 por cento dos produtos de sangue utilizados no País.

Um processo moroso e de grande responsabilidade daqueles que assumem a posição e têm competência de o efetivar.

O Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa, Organismo Público da responsabilidade do IPST, cumpre padrões de qualidade e segurança no que diz respeito ao processamento e tratamento dos componentes sanguíneos, através de procedimentos que garantem uma produção segura e eficaz. Todos os componentes produzidos são validados após um controlo de qualidade na salvaguarda dos requisitos de segurança e qualidade do produto a transfundir.

A ciência transfusional preconiza a adequada e correta manipulação e armazenamento de unidades de sangue no sentido de salvaguardar a vitalidade de cada componente no maior tempo possível (42 dias para os eritrócitos). No intuito de validar, ou não, este paradigma usámos 15 CE's de uma amostra aleatória a partir dos cinco dias de armazenamento. Estes componentes foram manipulados e sujeitos a uma indução de hemólise.

A hemólise foi induzida para conseguirmos comparar a fiabilidade de dois métodos:

- 1- Grau de Hemólise;
- 2- Apoptose dos eritrócitos usando a Anexina V.

Por um lado, a avaliação do grau de hemólise, procedimento amplamente usado pelos Centros de Sangue, para verificar a viabilidade dos Ce's durante o seu período de armazenamento, por outro com a avaliação da apoptose pela Anexina V, de acordo com os autores Sawant, R. B., S. K. Jathar, S. K., Rajadhyaksha, S. B. e Kadam, P. T.<sup>130</sup>

É resultado do conhecimento científico que ao longo dos dias de armazenamento, a hemólise dos eritrócitos vai aumentando exponencialmente. Usando a Anexina V para verificar a apoptose das referidas células observamos o mesmo comportamento de degradação, ou seja, quando aumenta a hemólise dos eritrócitos aumenta a apoptose celular configurando assim que os dois métodos se correlacionam de forma eficaz e paralela.

De acordo com os gráficos acima apresentados, é de considerar que tanto o grau de hemólise como a verificação da apoptose pela Anexina V é similar. O primeiro método mostra que o aumento significativo da destruição celular deu-se ao 35º dia de armazenamento. Paralelamente, a apoptose validada pela Anexina V, tem um aumento significativo ao 35º dia

de armazenamento, pelo que se pode considerar que os dois métodos são eficazes na determinação da inviabilidade eritrócitária ao longo do tempo de armazenamento.

Ivo Borges<sup>145</sup>, no seu estudo a respeito à expedição de CE's do CST de Lisboa para os Hospitais, constata que, em média, o armazenamento de CE's, no CST de Lisboa, não ultrapassa os 29 dias. Assim sendo, a investigação referida serviu de suporte para especularmos que os CE's exportados para os Hospitais não sofreram de hemólise/apoptose considerável na medida em que concluímos que estas alterações se evidenciam de forma mais pronunciada no 35º dia.

Esta intercepção de estudos abre caminho para novas propostas de investigação de forma a confirmar e demarcar o que se pretende com a imunohemoterapia – os CE's expedidos para os Hospitais são seguros e de qualidade pelo cumprimento dos requisitos de qualidade aos procedimentos de produção, manipulação e armazenamento.

Com este estudo constatámos que a utilização da Anexina V para determinação da apoptose eritrócitária é um método seguro e eficaz, paralelo aos resultados obtidos pelo Grau de Hemólise. No entanto, o uso da Anexina V é substancialmente mais dispendioso. Assim apurámos que a utilização do método do Grau de Hemólise aplicado aos CE's, como controlo de qualidade/vitalidade é uma técnica segura, eficaz e com custos reduzidos. Em virtude do exposto poderemos afirmar que a utilização deste método é mais vantajoso tendo em conta a dualidade preço/qualidade.

Em suma, apesar da utilização da Anexina V como método rotineiro de controlo de qualidade das unidades de sangue ser desvantajoso em termos económicos salientamos a importância desta técnica servir de base e referência de um controlo de qualidade da técnica de grau de hemólise.

Este projeto de investigação mostrou-se frutífero no que diz respeito ao conhecimento adquirido sobre a abordagem que a Anexina V assume perante a apoptose dos eritrocitos armazenados, sob refrigeração.

Tendo em conta o objetivo geral e os objetivos específicos a que nos propusemos é seguro afirmar-se que foram alcançados na medida em que validámos as conjecturas à priori definidas.

À partida, esta investigação não teria impacto se se cingisse apenas à constatação dos factos apurados após a recolha dos dados. No entanto, apesar da reduzida amostragem, confirma-se que o incumprimento dos requisitos de qualidade na manipulação, temperatura e armazenamento dos CE's, induzem alterações irreversíveis.

O grau aceitável de alterações metabólicas constitui uma parte importante das diretrizes de qualidade dos bancos de sangue e, como está claramente demonstrado por vários estudos publicados, durante o armazenamento, os eritrócitos sofrem várias alterações metabólicas, estruturais e morfológicas, globalmente denominada lesão de armazenamento.<sup>57</sup>

Apesar do saber adquirido com esta pesquisa, foram surgindo novos focos de interesse, lacunas do conhecimento científico de forma a que a hemoterapia seja uma prática sem riscos, menos dispendiosa e seriamente eficaz. Falamos pois do armazenamento dos CE's.

Ao longo de décadas de pesquisas sobre o efeito do armazenamento de CE's verifica-se uma ausência considerável do entendimento sobre questões várias, nomeadamente:

- a) Os dias de armazenamento de CE's são factores preponderantes para a eficácia da transfusão?
- b) Quando ocorrem as alterações dos CE's durante o armazenamento?
- c) Como reagem as células do doente transfundido a um CE que sofreu da denominada "lesão de armazenamento"?
- d) Será possível melhorar as condições de armazenamento de forma a evitar a lesão dos CE's?

Estas e outras questões levantam-se e seria de interesse a elaboração de novos projectos de investigação forma a dar resposta a todas estas lacunas de forma a garantir maior rentabilidade, eficácia e segurança transfusional.

A verdade absoluta não está ao alcance da Ciência. Novas dúvidas se levantarão, novos saberes surgirão e o caminho da verdade científica será sempre o conjunto de conhecimentos fundados sobre princípios certos.

A ciência apenas permitiu ao Homem que se distanciasse dos outros animais possibilitando-lhe uma vida com autoconhecimento, autocontrolo e dignidade. É sempre uma possibilidade — mas nem sempre uma realidade.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 Covas, D.T.; Ubiali, E.M.A.; De Santis, G.C. (2009). *Manual de Medicina Transfusional*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu.
- 2 Organização Mundial da Saúde. (2008). *Segurança de Transfusões de Sangue, Departamento de Tecnologias de Saúde Essenciais*. Disponível em: [www.who.int/bloodsafety](http://www.who.int/bloodsafety)
- 3 Red Gold: *The Epic Story of Blood*. (2002). Public Broadcasting Service. 15 Oct. Disponível em: <http://www.pbs.org/wnet/redgold/basics/redcross2.html>
- 4 Diário da República, 1.ª série — N.º 188 — 29 de Setembro de 2011- Decreto-Lei n.º 100/2011
- 5 Bennett-Guerrero, E.; Veldman, T.H.; Doctor, A.; Telen, M.J.; Ortel, T.L., Reid, T.S.; Mulherin, M.A.; Zhu, H.; Buck, R.D.; Califf, R.M.; McMahon, T.J. (2007). *Evolution of adverse changes in stored RBCs*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2007, Oct 23;104(43):17063-8. Epub 2007 Oct 11
- 6 Ciesla, B. (2009) *Hematologia na Prática Clínica*. Loures: Lusodidacta
- 7 Sturm, V. E., Levenson, R. W., Rosen, H. J., Allison, S. C., & Miller, B. L. (2006). *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*. Sep 1;313(5791):1287-90. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/>
- 8 Mintz, P. D. (2011). *Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practices*. 3rd edition. Bethesda, MD: AABB Press
- 9 AABB Homepage. (11/04/14). American Association of Blood Banks. Disponível em: <http://www.aabb.org>
- 10 AB0, Revista de Medicina Transfusional, Suplemento, nº18 Junho 2004
- 11 Instituto Português de Sangue e Transplantação,IP. Breve História. Disponível em: <http://ipsangue.org>
- 12 Moura, A.S.; Moreira, C.T.; Machado, C.A.; Neto, J.A.V.; Machado, M.F.A.S. (2006). *Doador de Sangue Habitual e Fidelizado: fatores motivacionais de adesão ao programa*. Revista Brasileira em Promoção da Saúde, Fortaleza, v. 19, n. 2, pag.61

- 13 Greenwalt, T.J.; Gajewski, M.; Mckenna, J.L. (1962). *Transfusion: A new method for preparing buffy coat-poor blood*. V. 2; pps 221-9
- 14 Salmon C, Cartron JP, Rouger P. (1984). *The human blood groups part1*. New York: Masson Publishing USA; cap. 4, pps.44–53.
- 15 Albuquerque, M. A., Mendonça, M.C., Almeida Neto C., et al. *Investigação de Hemólise em Concentrados de Hémácias*. Relatório Serviço de Hemoterapia, São Paulo.
- 16 Braga, G.W., Bordin, J.O., Moreira Jr, G., Kuroda, A. (1998). Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: *características do teste manual direto do Polybrene*. Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.44, n.1, pps16-20. São Paulo
- 17 Carvalho, E.B.; Borges, E.L.; Carlos, L.M.B.; Silva, M.A.M.; Magalhães, S.M.M.; Gomes, F.V.B.A.; Carvalho, M.J.C. (2007) Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. *Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias*. Versão Bras. Hematol. Hemoter: vol.29, nº.2, pp149-152. São José do Rio Preto.  
Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=1516-8484&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1516-8484&lng=en&nrm=iso)
- 18 Discher D.E., Carl P. (2001). *New insights into red cell network structure, elasticity, and spectrin unfolding - a current review*. Cell Mol Biol Lett. Vol.6, cap.3, pps593-606.
- 19 Wajcman H, Lantz B, Girot R. (1984) *Les Maladies du globule rouge*. Paris: Les editions INSERM. Médecine–Sciences Flammarion. cap. 3, pps.31–44.
- 20 Cooper, G.M. (1997) *The cell surface In: The cel: A molecular approach*. Washington: ASM Press. pps.467-517.
- 21 Chandar N, Viselli, S. (2010). *Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- 22 Singer S J And Nicolson G. L. (1972). *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, vol175, pps720-31.
- 23 Coelho, T.H. (2001). *Fisiologia das Membranas Celulares*. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Ano lectivo 2001/2002

24 Murador, P.; Deffune, E. (2007). *Aspectos estruturais da membrana eritrocitária*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.29 no.2, pps168-179. São José do Rio Preto, **Print version** ISSN 1516-8484.

Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842007000200016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000200016)

25 Daleke, D. L. (2003). *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. J Lipid Res. Vol.44, pps233–242

26 Alberts, B. *et al.* (2006). *Fundamentos da Biologia Celular*. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed

27 Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer. Vol.26, cap4, pps 239–257

28 Storry, J. (2000). *A review: modification of red blood membrane and its application in blood groups serology*. Immunology. 16(3):3–5

29 Salmon, C. Cartron, J. P.; Rouger, P. (1984). *The human blood groups part1*. New York: Masson Publishing USA; 1984. cap. 4. p.44–53

30 Wajcman, H. e Lantz, B. Giro, R. (1984). *Les Maladies du globule rouge*. Paris: Les editions INSERM. Médecine-Sciences Flammarion. cap. 3, p.31-44.

31 Alberts B. *et al.* (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science Publishing

32 Lahorte, C. M., Vanderheyden, J. L., Steinmetz, N., Van de Wiele, C., Dierckx, R. A., e Slegers, G. (2004). *Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 4 Jun;31(6):887-919. Epub 2004 May 12.

33 Kenis, H., Van Genderen, H., Deckers, N. M., Lux, P. A., Hofstra, L., Narula, J. *et al.* (2006). *Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches*. Exp Cell Res. 2006 Apr 1;312(6):719-26. Epub 2005 Dec 27

34 Hail, N., Jr., Carter, B. Z., Konopleva, M., e Andreeff, M. (2006). *Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys*. Apoptosis. Jun;11(6):889-904

- 35 Kim, R. (2005). *Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy*. *Cancer*. Apr 15;103(8):1551-60
- 36 Subbarayan, M., Hafeli, U. O., Feyes, D. K., Unnithan, J., Emancipator, S. N., e Mukhtar, H. (2003). *A simplified method for preparation of 99mTc-annexin V and its biologic evaluation for in vivo imaging of apoptosis after photodynamic therapy*. *J Nucl Med*. 44: 650—656. 153
- 37 Blankenberg, F. G. (2009). *Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V*. *Proc Am Thorac Soc*. **2009** August 15; 6(5): 469—476
- 38 Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. e Currie, A. R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. *Br. J. Cancer*. 26, 239
- 39 Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *ToxicolPathol*. Jun;35(4):495-516
- 40 Mirzaie-Joniani, H., Eriksson, D., Sheikholvaezin, A., Johansson, A., Lofroth, P. O., Johansson, L., *et al.* (2002). *Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation*. *Cancer*. 94(4 Suppl):1210—4. 161
- 41 Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., e Irimie, A. (2009). *Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets*. *Acta Oncol*. 48(6):811-21
- 42 Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., e Kelekar, A. (2007). *Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage*. *Cell Death Differ* 14:500—510
- 43 Broker, L. E., Kruyt, F. A., e Giaccone, G. (2005). *Cell death independent of caspases: a review*. *Clin Cancer Res* 11(9):3155-62
- 44 Tait, J. F. (2008). *Imaging of apoptosis*. *J Nucl Med* 49:1573—1576
- 45 Strasser, A., O'Connor, L., e Dixit, V. M. (2000). *Apoptosis signaling*. *Annu Rev Biochem* 69:217-45
- 46 Mirzaie-Joniani, H., Eriksson, D., Sheikholvaezin, A., Johansson, A., Lofroth, P. O., Johansson, L., *et al.* (2002). *Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation*. *Cancer* 94(4 Suppl):1210—4

47 Koornstra, J. J., Jong, S., Hollema, H., Vries, E. G., e Kleibeuker, J. H. (2003). *Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature*. Crit Rev Oncol Hematol Jan;45(1):37-53

48 Ring, J.; Sommer, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ruckstuhl, C.; Eisenberg, T.; Madeo, F. (2012). *The metabolism beyond programmed cell death in yeast*. Experimental Cell Research v. 318, n. 11 July 1; **318(11)**: 1193–1200

49 Grivicich, I.; Regner, A.; Da Rocha, A. B. (2007). *Morte Celular por Apoptose*. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53, n. 3 **53(3)**: 335-343

50 Kromer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; et al. (2009). *Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death and Differentiation, v. 16, n. 1 Jan;16(1):3-11

51 Kreuzaler, P.; Watson, C. J. (2012). *Killing a cancer: what are the alternatives?* Nature Reviews Cancer, v. 12 **12** (6), 411-424, 63

52 Remijnen, Q.; Kuijpers, T. W.; Wirawan, E.; Lippens, S.; Vandenabeele, P.; Vanden Berghe, T. (2011). *Dying for a cause: Netosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality*. Cell Death and Differentiation, v. 18 **2011** Vol: **18(4)**:581-588

53 Buchheit, C. L.; Rayavarapu, R. R.; Schafer, Z. T. (2012). *The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment*. Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 24, n. 4 **24**:3–8

54 Golstein, P.; Kroemer, G. (2007). *Cell death by necrosis: towards a muscular definition*. Trends in Biochemical Sciences, v. 32, n. 1

55 Wyllie, A.H. (2010). *Where, O Death, Is Thy Sting? A Brief Review of Apoptosis Biology*. Molecular Neurobiology, v. 42, n. 1

56 Hail N, Jr., Carter B. Z., Konopleva M, e Andreeff, M. (2006). *Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys*. Apoptosis v11, n6, pp 889-904

57 Bosman, G.J.; Cluitmans, J. C., Groenen, Y. A., Werre, J. M., Willekens, F.L., e Novotný, V. M. (2011). *Transfusion: Susceptibility to hyperosmotic stress-induced phosphatidylserine exposure increases during red blood cell storage*. Department of Biochemistry and Nijmegen

Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands. Transfusion 51, pp 1072-1078

58 Cotter, T. G. (2009). *Apoptosis and cancer: the genesis of a research field*. Nat Rev Cancer. v9, pp 501-507

59 Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology, v. 35, n. 4, pp 495-516

60 Rubin, E.; Gorstein, F.; Rubin, R.; Schwarting, R.; Strayer, D. (2010). *Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina*. 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro

61 Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. (2010). *Robbins: patologia estrutural e funcional*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan

62 Bjelakovic, G.; Nagomi, A.; Bjelakovic, M.; Stamenkovic, I.; Arsic, R.; Katic, V. (2005). *Apoptosis: Programmed Cell Death and its Clinical Implications*. Medicine and Biology, v. 12, n. 1

63 Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., e Adjei, A. A. (2005). *Targeting apoptosis pathways in cancer therapy*. C. A. Cancer J Clin. 5:178-94

64 Ricci, M. e El-Deiry, W. S. (2007). *The Extrinsic Pathway of Apoptosis*. In: Apoptosis, Senescence, and Cancer (DA Gewirtz, SE Holt, and S Grant eds), ed., pp 31-54, Humana Press

65 Hector, S. e Prehn, J. H. (2009). *Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review*. Biochim Biophys Acta. v1795. n2, pp117-29

66 Fadeel, B. e Orrenius, S. (2005). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease*. J Intern Med v 258, n6, pp 479-517

67 Boersma, H. H., Kietselaer, B. L., Stolk, L. M., Bennaghmouch, A., Hofstra, L., Narula, J. et al. (2005). *Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications*. J Nucl Med v 46, n12, pp2035-50

68 Kaufmann, S. (2007). *The Intrinsic Pathway of Apoptosis*. In: Apoptosis, Senescence, and Cancer (DA Gewirtz, SE Holt, and S Grant eds), ed., pp 3-30, Humana Press

- 69 Wu, G. S. (2009). *TRAIL as a target in anti-cancer therapy*. Cancer Lett v 285,n1, pps1-5
- 70 Krakstad, C.; Chekenya, M. (2010). *Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics*. Molecular Cancer, v.9
- 71 Bauer, K. D., Duque, R. E., Shankey, T. V. (1993) *In: Clinical Flow Cytometry Principles and Application*. Part 1- Section B. Technical Aspects. Library of Congress pps 71-177
- 72 Mccloskey, Tw., Oyaizu, N., Coronese, M. et al. (1994). *Use a flow cytometric assay to quantitative apoptosis in human lymphocytes*. Clin Immunol Immunopathol 7, pps14-18
- 73 Telford, Wg., King, Le., Fraker, P. J. (1992). *Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry*. Cytometry 13(2) pps137-43
- 75 Homburg, Che., Haas, M., Borne, A. G. et al. (1995). *Human neutrophil lose their surface FcgRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro*. Blood 85, pps532-540
- 76 Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., et al. (1995). *A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J. Immunol Meth Jul 17; v184, n1, pp39-51
- 77 Vance, J. E. e Steenbergen, R. (2005). *Metabolism and functions of phosphatidylserine*. Prog Lipid Res 44, pps 207-234
- 78 Chaurio, R. A., Janko, C., Munoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M. e Gaipf, U. S. (2009). *Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation*. Molecules 14, pp 4892-914. 2009
- 79 Reutelingsperger, C. P., Hornstra, G., Hemkerhcl. (1985). *Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of umbilical cord*. Eur J Biochem. Published online Feb 28, 2013. doi: 10.1155/2013/939810.  
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603377/>
- 80 Tait, J. F., Gibson, D. (1992). *Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content*. Arch BiochemBiophys. Oct, v298, n1, pp:187-91

- 81 Thiagarajan, P., Tait, J. F. (1991). *Collagen induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles*. J Biol Chem Dec 25; v266, n36, pp 24302-7
- 82 Pfäffle, M., Ruggiero, F., Hofmann, H., Fernandez, M. P., Selmin, O., Yamada, Y. *et al.* (1988). *Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family*. EMBO J Aug; v7, n8, pp:2335-42
- 83 Rojas, E., Pollard, H. B., Haigler, H. T., Parra, C., Burns, A. L. (1990). *Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes*. J Biol Chem. Dec 5; v265, n34, pp:21207-15
- 84 Pepinsky, R. B., Tizard, R., Mattaliano, R. J., Sinclair, L. K., Miller, G. T., Browning, J. L. *et al.* (1988). *Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I*. J Biol Chem Aug5;v263, n22, pp:10799-811
- 85 Schlaepfer, D. D., Jones, J., Haigler, H. T. (1992). *Inhibition of protein kinase C by annexin V*. Biochemistry. Feb 18;v31, n6, pp1886-91
- 86 Cookson, B. T., Engelhardt, S., Smith, C., Barnford, H. A., Prochazka, Tait, J. F. (1994). *Organization of the Human Annexin V (ANX5) Gene*. Genomics Apr, v20, n3, pp:463-7
- 87 National Center For Biotechnology Information, U.S. *National Library of Medicine*. Gene ID: 308. pp254-257
- 88 Sarda-Mantel, L., Coutard, M., Rouzet, F., Raguin, O., Vrigneaud, J. M., Hervatin, F. *et al.* (2006). *<sup>99m</sup>Tc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms*. Arterioscler Thromb Vasc Biol pp1022-1030
- 89 Vriens, P. W., Blankenberg, F. G., Stoot, J. H., Ohtsuki, K., Berry, G. J., Tait, J. F. *et al.* (1998). *The use of technetium Tc <sup>99m</sup> annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection*. J Thorac Cardiovasc Surg pp 844-853
- 90 Brumatti, G., Sheridan, C., e Martin, S. J. (2008). *Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells*. Methods, v44, n3, pp 235-240
- 91 Niu, G., Chen, X. (2010). *Apoptosis Imaging: Beyond Annexin V*. J Nucl Med., v13, pp 183-191

- 92 Tait, J. F. (2008). *Imaging of apoptosis*. J Nucl Med. v49, pp1573-1576
- 93 Koopman, G., et al. (1994). *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, New York, v.84, pp1415-1420
- 94 Cotton, M. F., et al. (1997). *Apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells isolated immediately ex vivo correlates with disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Pediatr. Res., Baltimore, v.42, n.5, pp656-664
- 95 Badley, A. D., Dockrell, D., Paya, C. V. (1997). *Apoptosis in AIDS*. Adv. Pharmacol., New York, v. 41, pp271-294
- 96 Schimid, I., et al. (1992). *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, New York, v.13, pp204-208
- 97 Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V., Kolb, H. (1991). *Analysis of TNF- $\alpha$ -induced DNA strand breaks at the single cell level*. Am. J. Pathol., Philadelphia, v.139, pp251-4
- 98 Gold, R., et al. (1993). *Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections*. J.Histochem. Cytochem., Baltimore,v.41, pp 1023-1030
- 99 Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z. (1993). *Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays*. Cancer Res., Chicago, v.53 (8), pp1945-1951
- 100 Cohen, G. M. (1997). *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem. J., London, v.326, pp1-16
- 101 Falcieri, E., et al. (1993). *The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v.193, pp19-25
- 102 Nicoletti, I., et al. (1991). *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v.139; pp 271-279

102 Brown, D. G., Sun, X. M., Cohen, G. M. (1993). *Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation*. J. Biochem. Chem., Baltimore, v.268, pp 3037-3039

103 Gatti, R., et al. (1998). *Comparison of annexin V and calceina-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy*. J. Histochem. Cytochem., Baltimore, v.46, pp895-900

104 Willingham, M.C. (1999). *Cytochemical methods for the detection of apoptosis*. J. Histochem. Cytochem., Baltimore, v.47, n.9, , pp 1101-1109

105 VanEngeland, M., et al. (1997). *Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis*. Exp. Cell. Res., New York, v. 235, pps 421-430

106 Walker L.H. Technical manual 11th Edition. Arlington, VA: American Association of Blood Banks; 1993

107 AABB. *Standards for blood bank transfusion services*. In. Washington, DC: American Association of Blood Banks; 1997

108 Sparrow, R. L. (2010). Blood Transfus: Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation. Articles from Blood Transfusion are provided here courtesy of SIMTI Servizi, 8(Suppl 3), pps26-30

109 Katerina Pavenski, Elianna Saidenberg, Marianne Lavoie, Melanie Tokessy, and Donald R. Branch. (2012). Red Blood Cell Storage Lesions and Related Transfusion Issues: A Canadian Blood Services Research and Development Symposium. Transfusion Medicine Reviews, Vol 26, No 1 (January)

110 Schechter AN, Gladwin MT. (2003). Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. N Engl J Med. Apr 10; v348, n15, pp:1483-5

111 Valeri C.R., Hirsch N.M. (1969). *Restoration in vivo of erythrocyte adenosine triphosphate, diphosphoglycerate, potassium ion, and sodium ion concentrations following the transfusion of acidcitrate-dextrose-stored human red blood cells*. J. Lab. Clin. Med. May; v73, n5, pp: 722-33

112 Valtis D.J. (1954). *Defective gas-transport function of stored red bloodcells*. Lancet

113 Dern R.J., Brewer G.J., Wiorkowski J.J. (1967). *Studies on the preservation of human blood*. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *J. Lab. Clin. Med.*

114 Raat N.J., Verhoeven A.J., Mik E.G. et al. (2005). *The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model*. *Crit. Care Med.* Jan; v33, n1, pp: 39-45; discussion 238-9

115 Almac E., Ince C. (2007). *The impact of storage on red cell function in blood transfusion*. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* Jun;v21, n2, pp:195-208

116 d'Almeida M.S., Gray D., Martin C., Ellis C.G., Chin-Yee I.H. (2001). Effect of prophylactic transfusion of stored RBCs on oxygen reserve in response to acute isovolemic hemorrhage in a rodent model. *Transfusion.* Jul;v41, n7, pp: 950-6

117 Heaton A., Keegan T., Holme S.(1989). In vivo regeneration of red cell diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br. J. Haematol.* Jan; v71, n1, pp: 131-6

118 Mohandas N., Chasis J.A. (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin. Hematol.* Jul; v30, n3, pp:171-92

119 Marik P.E., Sibbald W.J.(1993). Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis. *JAMA.* June 16, 1993, Vol 269, No.23

120 Luk C.S., Gray-Statchuk L.A. Cepinkas G., Chin-Yee I.H.(2003) WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow in vitro. *Transfusion.* Feb; v43, n2, pp:151-6

121 Brunauer L.S., Moxness M.S., Huestis W.H. (1994). Hydrogen peroxide oxidation induces the transfer of phospholipids from the membrane into the cytosol of human erythrocytes. *Biochemistry.* Apr 19; v33, n15, pp:4527-32

122 Verhoeven A.J., Hilarius P.M., Dekkers D.W., Lagerberg J.W., de Korte D. (2006). Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang.* Oct; v91, n3, pp:244-51

123 Karon B.S., Hoyer J.D., Stubbs J.R., Thomas D.D. (2009). Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion* Jul;v49, n7, pp:1435-42

124 Messana I., Ferroni L., Misiti F. et al. (2004). *Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation*. *Transfusion* Mar;v40, n3, pp:353-60

125 Bosman G.J, Lasonder E., Lutten M. et al. (2009). *The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions*. *Transfusion* May; v48, n5, pp:857-35

126 Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, et al. (1973). Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc* Mar, v5, n1, pp:253-9

127 Juran, J.M.; A. Blanton Godfrey. (1998). *Juran's quality handbook: Quality control handbook*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 5th ed.

128 Shigeru Mizuno (1988). *Company-Wide Total Quality Control*. Edit Asian Productivity Organization

129 Controlo de qualidade (08/06/2014). Disponível em: <http://controle-de-qualidade.info/>

130 Sawant, R.B.; Jathar, S.K., Rajadhyaksha, S.B., Kadam, P.T. (2007). *Red cell hemolysis during processing and storage*. *Asian J. Transfus Sci* Jul, v1, n2, pp:47-51

131 Silva, T. R., Alberto; Hewitt, Christopher; Roseiro, Jose (2004). *Citometria de Fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos*. *Boletim de Biotecnologia* 77 (Métodos em Biotecnologia – Citometria de Fluxo II) pp 32-40

132 Riley, R. (2005). *Principles and Applications of Flow Cytometry*. Retrieved 26 June 2008, Pp 10-11  
Disponível em: <http://www.pathology.vcu.edu/education/lymph/documents/Flow.pdf>

133 Tavares, A. A., João (2009). *Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante*. (Relatório Interno; Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto), pp 15-23

134 Melamed M.R., Mullaney P.F., Mendelson M.L.. (1979). *Flow cytometry and sorting*. John Willy&sons, 1979, pp 90

135 Almeida, J. F.; Pinto, J. M. (2003). *Da teoria à investigação empírica*. Problemas metodológicos gerais. In Augusto Santos Silva e José Madureira Pinto (org.), *Metodologia das Ciências Sociais*. Porto: Edições Afrontamento.

136 Fortin, Marie Fabiene. (2000). *O Processo de Investigação: da Concepção à Realização*. Lusociência: Loures

137 Fortin, Marie Fabiene. (1999). *O Processo de Investigação: da Concepção à Realização*. Lusociência: Loures

138 Polit, Denise; Hungler, Bernadette. (1991). *Investigacion Cientifica en Ciencias de la Salud*. México: Interamericana Mc. Graw-Hill. 3ª Ed.

138' Creswell, J.W. (2002). *Research Design: qualitative and quantitative approaches*. London: Sage, 2002

139 Ionóforo de Cálcio (17/05/2014). Disponível em: [http://files.pedagogia-em-biologia-fct-uc.webnode.com.pt/200000049-4b55a4c949/Fisiologia%20Celular%20\(Parte%202\).pdf](http://files.pedagogia-em-biologia-fct-uc.webnode.com.pt/200000049-4b55a4c949/Fisiologia%20Celular%20(Parte%202).pdf).

140 Bula: “*Microesferas CaliBRITE, BD*”, BD logo and all other trademarks are property of becton, Dickinson and Company, 2011 BD.

141 Inga, Rodrigo, Sandra, Susan. Monitores BMP201 ano 2010. Glossário para leitura do artigo “*Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*” de Saturnm et al. (2006).

142 Daniel, W. W. (1978). *Applied nonparametric statistics*. Boston: Houghton-Mifflin

143 Siegel, S. (1975). *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil

144 Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River – NJ: Prentice-Hall, 4ªedition

145 Borges, Ivo (2013). Dissertação da Tese de Mestrado: *Caraterização estatística dos valores percentuais de sangue do grupo ABO colhido pelo centro regional de sangue de lisboa e respetivo emparelhamento com a distribuição ao nível hospitalar*. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Atlântica. Lisboa