



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica**

**HEMOSTASIA IÔNICA DE CONCENTRADOS DE  
HEMÁCIAS IRRADIADAS: AÇÃO DA  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase**

**Leandro Augusto de Oliveira Barbosa**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica**

**HEMOSTASIA IÔNICA DE CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS  
IRRADIADAS: AÇÃO DA  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase**

**Leandro Augusto de Oliveira Barbosa**

**Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Biológica do Instituto de Bioquímica  
Médica da Universidade Federal do Rio  
de Janeiro como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Orientador: Prof. Carlos Frederico Leite Fontes

Rio de Janeiro

Junho de 2008

# HEMOSTASIA IÔNICA DE CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS IRRADIADAS: AÇÃO DA $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

Leandro Augusto de Oliveira Barbosa

Prof. Carlos Frederico Leite Fontes (Orientador)

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Aprovada por:

---

Prof.<sup>a</sup>. Orlando Costa Ferreira Junior

---

Prof.<sup>o</sup>. Antonio Ferreira Pereira

---

Prof.<sup>a</sup>. Georgia Correa Atella

---

Prof.<sup>o</sup>. Mário Alberto Cardoso da Silva Neto ( Revisor/ Suplente interno)

---

Prof.<sup>o</sup>. Marcelo Alves Ferreira (Suplente externo)

---

Prof.<sup>o</sup>. Carlos Frederico Leite Fontes (Orientador)

Rio de Janeiro  
Junho de 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA**

BARBOSA, Leandro Augusto de Oliveira

Hemostasia Iônica de concentrados de hemácias irradiadas: Ação da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Rio de Janeiro, UFRJ, IBqM, 2008, 102 fls.

Tese: Doutor em Química Biológica

- |  |                          |
|--|--------------------------|
| 1. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase | 2. PMCA                  |
| 3. Irradiação Gama                         | 4. Controle de Qualidade |
| 5. Hemoconcentrados                        |                          |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

A presente tese foi realizada no Laboratório de Estrutura e Regulação de P-ATPases e no Laboratório de Membranas Transportadoras do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, sob orientação do Professor Carlos Frederico Leite Fontes, e contou com o apoio da seguinte entidade: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

Quem me conheceu na faculdade sabia minha opinião sobre fazer mestrado e doutorado: perda de tempo! Tive essa convicção praticamente até o final da minha vida como aluno, até fazer um trabalho sobre biologia celular do câncer. Isso me levou a fazer uma especialização no INCa e aí a ciência acabou virando minha cachaça. Onde meu interesse começou foi justamente onde irá terminar essa jornada: com o Prof. Carlos “Gronzo” Frederico, mais conhecido como Fred. Por estas coincidências da vida, era ele o professor do tal trabalho que desencadeou tudo isso. Quem conhece o Fred sabe o quanto ele é engraçado e cativante. Agradeço por tudo que ele me ensinou e pela orientação e amizade e pelo apoio no pior momento do doutorado que foi justamente a seleção. Acredito que tanto eu quanto ele aprendemos bastante nesta jornada juntos. Espero que após essa tese ele comece a doar sangue (tem medo da agulha!)

A Profa. Helena Maria Scofano. Sem ela seria impossível a realização do doutorado, pelo simples motivo que ela foi quem bancou minha seleção para o doutorado. Eu que achava que ela me olhava com um sorriso no rosto imaginando: “o que esse cara está fazendo aqui”, foi a que me deu a maior prova de confiança. Essa é uma lição de que nunca me esquecerei, nunca duvidar da bondade das pessoas. Helena, se eu for 30% da pessoa maravilhosa que você é já estou no lucro. Obrigado por tudo.

A meus pais que sempre me apoiaram, mesmo sem entender o que eu faço e com a preocupação de ter um filho casado e com dois filhos vivendo de bolsa. Amo vocês.

Minha esposa Camila, que sempre me ouviu reclamar de tudo nestes 4 anos e que quase caiu no “conto da bolsa” (com bolsa não é possível pensar em casamento). Te amo muito

Meus pequenos filhos Nicolas e Manuela que só me ajudaram a querer terminar logo de vez esse doutorado. Amor de pai é realmente algo maravilhoso.

Ao Prof. José Andrez Morgado-Diaz. Mesmo em sua loucura sempre me incentivou a fazer o doutorado. Mesmo não sendo em seu laboratório foi um amigo importante no processo.

Ao Prof Antônio. Nada é mais revelador e encorajador do que ser aluno do Careca. Depois de passar por ele tudo fica mais fácil. Apesar de desententimentos no início hoje ele é um grande amigo e participou de alguma maneira com debates sobre o projeto.

Ao Prof Júlio. Sem suas piadas infames e trocadilhos a vida no laboratório seria muito difícil. Além disso, suas idéias sempre ajudam.

A Dra. Carmen Martins Nogueira e ao serviço de hemoterapia do HUCFF pois é preciso ter muita coragem para financiar um estudo com bolsas de sangue quando vivemos em um país em que o fornecimento de sangue é um problema de saúde pública. Obrigado demais.

A Ângela Pereira Carrano. Minhas madrinhas de casamento me iniciaram na hemoterapia e graças ao emprego no Pró-Cardíaco foi possível pensar em mestrado.

Otacílio e Vanessa Honorato. Sem essas pessoas seria impossível realizar este estudo. A Vanessa já me agüenta desde a faculdade, mas o Otacílio passou a me aturar já no doutorado. Se eu defendo hoje essa tese é graças a vocês.

Aos amigos do laboratório: Elias, Matheus, Manolo (foi importante para encher o saco do Ota), Pablo, Vanessa Cortes, Jorge e tantos outros.

Ao Prof Amir Askari. Minha estada em se laboratório em Toledo abriu minha mente científica. Nada como ter um amigo para lhe patrocinar suas idéias mais insanas em termo de pesquisa. Um exemplo a ser seguido a todos os pesquisadores.

ABREVIACÕES

$\gamma$ ATP	Adenosina trifosfatada marcada com fósforo radiativo
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$	Fósforo marcado radiativamente
$\Delta G^0$	Varição de Energia de Ativação
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase	enzima que hidrolisa ATP
CHIF	Proteína indutora da formação de canais
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EGTA	Ácido [etilenobis (oxietilenonitrila)]tetracético
GVHD	Doença enxerto-versus-hospedeiro
Gy	Dosagem de radiação internacional Gray
IOVs	vesículas inside-out
Kd	Constante de dissociação
$K_m$	Constante de Michales-Menten- concentração de substrato para qual é atingida a metade da velocidade máxima enzimática.
Pi	Fósforo
PKA	Proteína Cinase AMPc dependente
PKC	Proteína Cinase dependente $\text{Ca}^{2+}$
PMCA	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de Membrana Plasmática
SERCA	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de Retículo Endoplasmático
TA-GVHD	Doença enxerto-versus-hospedeiro associada a transfusão sanguínea
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMLO	Transplante de medula óssea

## Índice

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	1
1.1- Histórico da hemoterapia	2
1.2- Doença enxerto-versus-hospedeiro associada à transfusão (TA-GVHD)	4
1.2.1- Mecanismos da GVHD e TA-GVHD	5
1.2.2- Grupos de riscos para TA-GVHD	7
1.2.2.1- TA-GVHD em pacientes imunocomprometidos	7
1.2.2.2- TA-GVHD em pacientes imunocompetentes	11
1.2.3- Fatores de riscos para TA-GVHD	12
1.3- Tratamento da TA-GVHD	14
1.4- Irradiação de hemocomponentes	15
1.5.1- Indicação para irradiação de hemocomponentes	17
1.5.2- Eficácia da irradiação	18
1.6- A família P-ATPase	19
1.7- A $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase	22
1.7.1- A $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e suas subunidades	23
1.7.2- Ciclo catalítico da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase	30
1.7.3- A ouabaína	33
1.7- A $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA)	34
<b>2- OBJETIVOS</b>	39
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	41
3.1- Reagentes utilizados	42
3.2- Obtenção das bolsas de sangue	42
3.3- Preparação da membrana de eritrócitos	42
3.4- Síntese do $[\gamma^{32}\text{P}] \text{ATP}$	43
3.5- Determinação de atividade ATPásica	44
3.6- Preparação das Vesículas Inside-Out (IOVs)	44
3.7- Captação e liberação de cálcio	45
3.8- Dosagem dos níveis plasmáticos de pH, $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ e $\text{Ca}^{2+}$ e LDH	45
3.9- Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	45
3.10- Análise de lipídios	46
<b>4- RESULTADOS</b>	48
4.1- Efeito da Irradiação no pH plasmático	49
4.2- Efeito da irradiação nos níveis de LDH plasmáticos	50
4.3- Efeito da irradiação nos níveis plasmáticos de $\text{K}^+$ e $\text{Na}^+$	51
4.4- Efeito da irradiação nos níveis plasmáticos de $\text{Ca}^{2+}$	53
4.5- Efeito da irradiação na atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	54
4.6- Efeito da irradiação na captação e a liberação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	56
4.7- O tratamento com ouabaína não provoca aumento de potássio plasmático	60
4.8- Efeito da irradiação nos níveis de peroxidação lipídica da membrana plasmática	62
4.9- Os níveis lipídicos da membrana plasmática de eritrócitos após irradiação	63
4.10- Tratamento com Vitamina C preserva a atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase	65
<b>5- DISCUSSÃO</b>	67
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	75
<b>7- ANEXOS</b>	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Modelo tridimensional suposto da estrutura topológica da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.	21
Figura 2- Esquema da regulação da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase por diversos fatores.	29
Figura 3- Ciclo de Reações da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	32
Figura 4- Estrutura secundária da Ca <sup>2+</sup> -ATPase de membrana plasmática	36
Figura 5- Medida do pH plasmático de hemoconcentrados estocados em 4°C até 28 dias.	49
Figura 6: Medida do LDH plasmático de hemoconcentrados estocados em 4°C até 28 dias.	51
Figura 7- Efeitos da radiação $\gamma$ nos níveis plasmáticos de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> de hemoconcentrados estocados em 4°C.	52
Figura 8- Efeitos da radiação $\gamma$ nos níveis plasmáticos de Ca <sup>+2</sup> de hemoconcentrados estocados em 4°C.	53
Figura 9- Atividades Ca <sup>2+</sup> -ATPásica e Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPásica.	55
Figura 10- Captação de Ca <sup>+2</sup> pelas IOV's preparados de ghosts de sangue controle e irradiado.	57
Figura 11- Liberação passiva de Ca <sup>+2</sup> de IOV's.	59
Figura 12- Efeito do tratamento com ouabaína nos níveis plasmáticos de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> de hemoconcentrados estocados em 4°C.	61
Figura 13- Efeito da irradiação na peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos de hemoconcentrados estocados em 4°C.	62
Figura 14- Os níveis lipídicos da membrana de eritrócitos não modificam após a irradiação.	64
Figura 15- O tratamento com vitamina C protege a atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.	66

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Fatores de risco para o desenvolvimento de TA-GVHD	11
--	----

## RESUMO

A irradiação de hemoconcentrados é empregado em bancos de sangue para evitar a doença enxerto-verus-hospedeiro associada com transfusão sanguínea. Como a irradiação pode causar danos de membranas e proteínas de membranas pela geração de espécies reativas de oxigênio, nós investigamos se a permeabilidade de membrana, a Na,K-ATPase e a  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase de membrana plasmática de eritrócitos são alterados pela irradiação gamma. Sangue total foi coletado de doadores saudáveis e fracionado em até 90%. Após 24h de coleta, os concentrados de hemácias foram irradiados em 25 Gy de radiação gamma. Nos dias 1, 7, 14 e 28 pós-irradiação, as frações foram removidas e centrifugadas. A atividade da Na,K-ATPase e  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase de membranas de fantasmas de eritrócitos foram acessados pela hidrólise de gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP. A Na,K-ATPase não foi afetada imediatamente após a irradiação, mas foi inibida em 40% no dia 14 até o dia 28. O tratamento longo com ouabaína não afetou o conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . A  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase permaneceu inalterada pela irradiação. A taxa e a captação máxima de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  de vesículas re-seladas invertidas foram reduzidas, e a liberação passiva de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  foi aumentada. Além disso, o dano da membrana foi acessado pela dosagem de liberação de TBARS nos eritrócitos irradiados, com nenhuma modificação no conteúdo lipídico total da membrana celular. A adição de uma substância antioxidante, como a vitamina C, provocou um efeito preventivo na atividade da Na,K-ATPase. Portanto, a irradiação de concentrados de hemácias aumentou a permeabilidade da membrana para cátions monovalentes e divalentes e poderia mudar a homeostasia iônica e função celular. Nós recomendamos o uso de sangue irradiado em um período menos que 14 dias após irradiação.

## ABSTRACT

Irradiation of blood derivatives is employed in blood banks to avoid transfusion-associated graft-vs-host disease. As irradiation can damage membranes and membrane proteins by generation of reactive oxygen species, we investigated whether the membrane permeability, Na,K-ATPase, and Ca<sup>+2</sup>-ATPase from red blood cell plasma membranes were altered by gamma-irradiation. Whole blood was collected from healthy donors and concentrated to 90% cell fraction. Within 24 h of collection, blood concentrates were irradiated with 25 Gy of gamma-radiation. At days 1, 7, 14, and 28 post-irradiation, fractions were removed and centrifuged. Na,K-ATPase and Ca<sup>+2</sup>-ATPase activities from ghost membranes were assessed by gamma-<sup>32</sup>P-ATP hydrolysis. The Na,K-ATPase was not immediately affected by irradiation, but it was inhibited by 40% by day 14 and until day 28. Long-term ouabain treatment not affected the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content. The Ca<sup>+2</sup>-ATPase was unaltered by irradiation. The rate and the maximal <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> uptake from re-sealed inside-out vesicles were reduced, and the passive efflux of <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> was increased. Furthermore, membrane damage was assessed by TBARS release measurements in irradiated RBCs, without any modification in total lipidic content in cell membranes. The addition of an antioxidant substance, as vitamin C, provoke a preventive effect on Na,K-ATPase activity. Thus, irradiation of blood concentrates increased the plasma membrane permeability to monovalent and divalent cations and would change ion homeostasis and cell function. We recommend the use of irradiated blood within a period shorter than 14 days after irradiation.

## **1 – INTRODUÇÃO-**

### **1.1- História da Hemoterapia**

Experimentos com transfusão sanguínea aconteceram em etapas, inicialmente envolvendo transfusões de um animal para outro e depois de animais para humanos. A primeira evidência escrita de experimentos com transfusões sanguíneas são de Oxford em 1666, onde o clima intelectual foi particularmente favorável para tais experimentos fisiológicos (Giangrande, 2000).

É surpreendente que a transfusão sanguínea foi iniciada com um sucesso considerável sem haver nenhum conhecimento sobre os grupos sanguíneos. Diferença de compatibilidade sanguínea entre as espécies foi reconhecida antes das diferenças em uma mesma espécie. Karl Landsteiner (1826-1943) realizava experimentos para verificar se havia diferenças sanguíneas individuais em humanos. Ele publicou seus resultados em 1901, no qual ele descrevia as reações entre as hemácias e o soro de 22 indivíduos (Landsteiner, 1961). Ele observou que a adição de soro de alguns indivíduos poderia causar aglutinação de hemácias de outros e percebeu que este fenômeno tinha uma base imunológica. Ele identificou três grupos sanguíneos, que ele denominou A, B e C. O soro de sujeitos do grupo C aglutinavam as células dos outros grupos A e B. Decastello e Stürli, dois dos pupilos de Landsteiner em Viena, confirmaram seus achados em um grande estudo com 155 indivíduos e também identificaram 4 indivíduos (2,5%) que não aglutinavam com seu soro mas na qual suas hemácias eram aglutinadas pelo soro de indivíduos com todos os três grupos previamente identificados (grupo AB). A importância do trabalho de Landsteiner, que foi escrito na Alemanha e publicado em uma revista austríaca, não foi reconhecido imediatamente e a tipagem sanguínea não se tornou parte da prática universal até 1920s (Giangrande, 2000).

Um quarto de século se passou até outro grupo sanguíneo ser descoberto. Em 1939, foi publicado um relato de caso de uma hemólise pós-tranfusão de uma mulher com grupo sanguíneo O que recebeu sangue de seu marido que possuía o mesmo grupo sanguíneo (Levine & Stetson, 1939). Este foi o primeiro relato de caso do anticorpo Rhesus. O nome foi derivado a partir de experimentos envolvendo a imunização de coelhos e porcos com sangue de macaco Rhesus (Landsteiner & Wiener, 1940). O anticorpo obtido nestes animais era capaz de aglutinar os eritrócitos de 85% dos humanos testados, que foram classificados como “Rhesus positivo”.

A coagulação rápida e inevitável do sangue impôs um limite natural para a quantidade de sangue fresco que poderia ser transfundida no passado. A utilização de sangue desfibrinado e adição de fosfato foram testadas para encontrar uma alternativa para transfusões, especialmente de grande volume. A utilização de citrato de sódio como anticoagulante é creditada a Richard Lewinsohn. O citrato de sódio a 1% já era utilizado como anticoagulante em laboratório de análises clínicas, mas em altas concentrações era tóxico para humanos, mas Lewinsohn descrevia: “Ninguém nunca pensou em realizar experimentos com dosagens menores para ver se é suficiente como anticoagulante”. Em 1915, ele publicou os resultados de 4 anos de experimentos mostrando que a solução de citrato de sódio a 0,2% era efetiva como anticoagulante para o sangue, e ao mesmo tempo não possuir efeitos tóxicos mesmo quando mais de 2500 mL de sangue com citrato era transfundido (Lewinsohn, 1915). Solução de ácido-citrato-dextrose (ACD) foi adotada na Inglaterra como anticoagulante em sangue de doadores após que uma revisão clínica demonstrou conclusivamente aumento da sobrevivência das hemácias durante o estoque sem ocorrer distúrbios no balanço ácido-base no recipiente (Loutit & Molison, 1943). A

solução de citrato-fosfato-dextrose (CPD) foi adotada subsequente como anticoagulante após estudos clínicos com sangue estocado em até 28 dias (Gibson e cols, 1961).

### **1.2- Doença enxerto-versus-hospedeiro associada à transfusão (TA-GVHD)**

A doença enxerto-versus-hospedeiro associada à transfusão (TA-GVHD) é uma complicação da transfusão sanguínea não muito comum, apesar do alto risco de fatalidade, na maioria dos casos. A doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) foi descrita, primeiramente, em animais como resultado de injeções de células imunologicamente competentes em um hospedeiro que, por razões desconhecidas, não são hábeis a rejeitá-las (Billingham, 1966). Em 1959, esta doença foi descrita em humanos após transplantes de medula óssea (TMO) alogênicos (Mathé e cols, 1959). Desde então, GVHD se tornou uma complicação de TMO bem conhecida, com apresentação clínica de febre, rash cutâneo, disfunção hepática e/ou diarreia. Por volta de 1970 e 1980 a TA-GVHD foi definida como uma doença propriamente dita, primeiro em pacientes imunocomprometidos e depois em pacientes imunocompetentes. Apesar de haver muitas similaridades entre a GVHD secundária ao TMO e transfusão, TA-GVHD é associada à aplasia de medula e, portanto, cursa com evolução mais rápida e fulminante, geralmente resultando em morte do paciente.

A verdadeira incidência desta doença é desconhecida e o seu diagnóstico facilmente confundido por ter outras condições, como infecções virais ou reações a drogas, com aspectos clínicos similares. É desejável que o profissional envolvido na busca do diagnóstico tenha a capacidade técnica capaz de suspeitar e associar a clínica do paciente à uma transfusão recente.

### 1.2.1- Mecanismos da GVHD e TA-GVHD

Billingham (1966) definiu os três principais requisitos para o desenvolvimento da GVHD:

1. O enxerto deve conter células imunologicamente competentes;
2. O hospedeiro deve possuir quantidade suficiente de aloantígenos, de forma que aparente ser estranho para o enxerto e ser capaz de estimulá-lo antigenicamente.
3. O hospedeiro deve ser incapaz de desenvolver uma reação imunológica efetiva contra o enxerto, pelo menos por tempo suficiente para a manifestação da capacidade imunológica deste.

Em transfusões de rotina, os dois primeiros requisitos estão geralmente presentes; a maior variável é o estado imunológico do receptor. Os antígenos leucocitários humanos (HLA) combinados entre doador e o receptor são geralmente incompatíveis porque não são feito testes para combinar com os antígenos do complexo de histocompatibilidade (MHC). Todos os produtos celulares sanguíneos contêm células T maduras - células imunocompetentes que provocam a resposta da GVHD. As células dos doadores são rejeitadas se o receptor não for imunossuprimido. Entretanto, na presença de uma imunodeficiência congênita ou secundária à quimioterapia e/ou radioterapia, o receptor não consegue rejeitar as células T do doador, que ao proliferar resultam em reação GVHD e clínica de TA-GVHD (Holme, 2005).

TA-GVHD pode se desenvolver em indivíduos imunocompetentes se o último requisito - o receptor é “incapaz de provocar uma reação imunológica efetiva contra o enxerto” - não for alcançado. Isto ocorre quando o doador e receptor compartilham HLA's ou halotipos. O receptor desconhece as células transfundidas do doador como estranhas e

não consegue rejeitá-las. As células T viáveis transfundidas são capazes de provocar uma resposta GVHD; elas reagem contra o segundo haplótipo ou HLAs que não são compartilhados, com um resultado clínico de TA-GVHD.

O desenvolvimento da GVHD aguda pós TMO pode ser dividida em três fases:

1 - Regime de condicionamento - dano tecidual e ativação do tecido do hospedeiro que resulta na produção de citocinas inflamatórias;

2 - Fase aferente - ativação das células T;

3 - Fase eferente - liberação de citocinas inflamatórias.

A fase aferente consiste em três etapas: apresentação de antígenos resultando na ativação das células T, proliferação e diferenciação das células T ativadas em células que são citolíticas ou que secretam citocinas.

A fase eferente parece ser mediada primariamente por citocinas que atacam diretamente o tecido do hospedeiro ou recrutam células hematopoiéticas como as *natural killer* (NK), macrófagos ou células T, resultando em morte celular e destruição do tecidual do hospedeiro (Ferrara & Deeg, 1991; Ferrara & Antin, 1999).

O mecanismo da TA-GVHD aparenta ser o mesmo. Nishimura e cols (1997) caracterizaram clones de células T de pacientes que desenvolveram TA-GVHD pós-operatória em transfusão de hemácias estocadas e plaquetas frescas de seu filho e filha. O diagnóstico de TA-GVHD foi confirmado pela análise de polimorfismo de DNA microsatélite e por tipagem HLA. O filho foi confirmado como o doador responsável. O genótipo HLA do paciente era: A\*2402, B\*4002, B\*52011, DRB1\*1502 e DRB1\*0901 (sorologicamente A24, B61, B52, DR15 e DR9). O filho foi tipado sorologicamente como A24, B38, B61 e DR9. O HLA B52 e DR15 foram os dois antígenos paternos não

compartilhados com o do filho. Os autores estabeleceram nove clones de células T de leucócitos do sangue periférico do paciente no qual, através de análise de microsatélite, foram demonstradas ser originárias do filho. Três tipos de clones de células T foram identificados: tipo I era CD8<sup>+</sup> e lisavam as células do paciente HLA B52-positivas; clones tipo II expressavam CD4, proliferavam em resposta e lisavam células expressando DR15; tipo III, um clone CD4<sup>+</sup> não-citotóxico, que produzia e secretava fator de necrose tumoral  $\beta$  após estimulação por antígenos. Dois dos clones, o CD8<sup>+</sup> e o CD4<sup>+</sup>, eram citolítico, enquanto o terceiro, um clone CD4<sup>+</sup>, secretava linfocinas citotóxica (Nishimura e cols, 1997). Estes estudos ajudaram a confirmar que as fases de desenvolvimento da GVHD após transfusão são similares àquelas vistas em GVHD pós TMO.

### **1.2.2- Grupos de riscos para TA-GVHD**

Existem muitos relatos de casos e revisões descrevendo a doença em ambos pacientes: imunocomprometidos e imunocompetentes (Anderson & Weinstein, 1990; Greenbaum, 1991; Ohto & Anderson, 1996a,b; Strauss, 2000).

#### **1.2.2.1- TA-GVHD em pacientes imunocomprometidos**

1. Síndromes de imunodeficiência congênitas: Estas crianças têm elevada chance de desenvolver a doença pela possibilidade de receberem transfusão antes do diagnóstico da imunodeficiência ser feito. TA-GVHD tem sido reportada não em crianças apenas com síndrome de imunodeficiência congênita, como revisado por Strauss (2000), mas também em algumas síndromes de imunodeficiência variáveis como Síndrome de Wiskott-Aldrich

(Douglas & Fudenberg, 1969) e deficiência da purina nucleosídeo fosforilase (Strobel e cols, 1989).

2. Fetos e recém-nascidos: Neonatos têm um sistema imune imaturo, entretanto, o grau de risco para TA-GVHD que isto representa mantêm-se controverso. Bebês pré-termo possuem um sistema imune mais imaturo que os nascidos à termo. Sua imaturidade é futuramente comprometida por outros fatores como transfusões, cirurgias e estado nutricional. Este grupo de pacientes de alto risco, geralmente, recebem transfusões dos membros da família, do tipo doações diretas. TA-GVHD nesta população de pacientes é geralmente associada à doações diretas (Ohto & Anderson, 1996a; Strauss, 2000).

- Transfusões intrauterina representam um grande volume de sangue fresco transfundido para um hospedeiro relativamente imaturo. Apesar de pouco freqüente, TA-GVHD já foi descrita após transfusões intrauterinas em recém-nascidos com eritroblastose fetal (Naiman e cols, 1969; Hentschel e cols, 1995).

- Apesar de infantes pré-termo serem freqüentemente transfundidos, apenas sete casos de TA-GVHD (três no Japão) foram descritos em infantes pré-termo que receberam transfusões de doadores de sangue randômicos (Seemayer & Bolande, 1980; Wise & Lawrence, 1990; Ohto & Anderson, 1996a; Strauss, 2000). Todos os outros casos ocorreram após transfusões de membros da família (Berger & Dixon, 1989; Ohto & Anderson, 1996a). O risco de TA-GVHD é muito pequeno em infantes pré-termo que são transfundidos de doadores randômicos.

- Infantes à termo não aparentam risco de TA-GVHD aumentado através de transfusões de doadores randômicos, apesar de parecerem mais suscetíveis à esta complicação.

3. Pacientes com doenças hematológicas: A maioria dos casos de TA-GVHD foram descritas em pacientes com doenças hematológicas (Kessinger e cols, 1987). Pacientes com doença de Hodgkin, associada à imunodeficiência, são os que possuem maiores riscos de desenvolver a doença (Dinsmore e cols, 1980; von Fliedner e cols, 1982; Burns e cols, 1984; Decoste e cols, 1990). Pacientes com outras doenças, como as leucemias agudas, tratados com quimioterapia intensiva foram relatadas como tendo desenvolvimento de TA-GVHD (Lowenthal e cols, 1981; Nikoskelainen e cols, 1983). Em parte, o risco pode ser maior nestes pacientes pela necessidade de suporte intensivo em transfusões de plaquetas. Pacientes com linfoma não-Hodgkin parecem ter um risco menor, mas casos de TA-GVHD foram descritos (Saab e cols, 1983; Mutasim e cols, 1984; Gelly e cols 2000). A TA-GVHD tem sido descrita mais recentemente em pacientes com leucemia linfocítica crônica tratados com análogos de purinas altamente imunossupresivos (Maung e cols, 1994; Williamson e cols, 1996).

4. Pacientes com tumores sólidos: A TA-GVHD foi descrita em pacientes com tumores sólidos, incluindo neuroblastomas (Woods & Lubin, 1981), rabdomyosarcoma (Labotka & Radvany, 1985), câncer de bexiga (Saito e cols, 1983) e câncer de pulmão (Spector, 1995) entre outros. A terapia para pacientes com tumores sólidos foi modificada com doses maiores, mais imunossupressoras e mielobláticas. Estes pacientes necessitam de mais transfusões e portanto apresentam um alto risco de desenvolver TA-GVHD.

5. Pacientes submetidos ao TMO: Para o TMO autólogo, a irradiação de hemocomponentes não tem sido rotina em muitos centros. Portanto, a TA-GVHD tem sido descrita (Postmus e cols, 1988).

6. Pacientes após transplante de órgãos sólidos: A TA-GVHD é uma complicação rara em pacientes transplantados, mesmos naqueles altamente imunossuprimidos e com múltiplas transfusões. Nesta população de pacientes, GVHD é geralmente causada pela proliferação de linfócitos do órgão transplantado e não resultado da transfusão (Triulzi & Nalesnik, 2001). Entretanto, TA-GVHD foi descrita após transplante de coração (Sola e cols, 1995) e fígado (Wisecarver e cols, 1994). A origem dos linfócitos do doador do órgão ou do doador do sangue, determina a diferenciação entre os dois tipos de GVHD.

7. Pacientes com síndrome da imuno deficiência adquirida (AIDS): AIDS não é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de TA-GVHD (Mayer, 1990; Anderson e cols, 1991). Existe apenas um relato de caso de uma criança com AIDS que desenvolveu TA-GVHD, na qual foi recuperada (Klein e cols, 1996). A razão para isto é provavelmente multifatorial:

- O diagnóstico de TA-GVHD é facilmente perdido, especialmente para pacientes que possuem sintomas similares, como rash, diarreia, disfunção hepática ou pancitopenia, que são relacionadas com o curso da doença e/ou tratamento;

- Muitos destes pacientes estão recebendo sangue irradiado. A prática da irradiação nos Estados Unidos em 1991, revelou que 15,9% das instituições disponibilizam hemocomponentes irradiados para pacientes com este diagnóstico (Anderson e cols, 1991). Esta prática é provavelmente mais comum hoje em dia.

- TA-GVHD pode não se desenvolver porque os linfócitos do doador se tornam infectados com o HIV; portanto sendo incapazes de desenvolver a resposta GVH.

Os grupos de riscos para o desenvolvimento da TA-GVHD está sumarizado na tabela

1.

---

Tabela 1. Fatores de risco para o desenvolvimento de TA-GVHD

---

**Risco aumentado significativamente**

Síndrome de imunodeficiência congênita  
Transplante de medula óssea  
Transfusão de hemocomponentes  
Transfusões intrauterinas  
Transfusões de plaquetas HLA combinadas  
Doença de Hodgkin  
Pacientes tratados com análogos de purinas

**Risco aumentado minimamente**

Leucemia aguda  
Limfoma não-Hodgkin  
Tumores sólidos tratados com quimioterapia intensiva ou radioterapia  
Infantes pré-termo  
Transplantados de órgãos sólidos

**Risco aumentado mas não reportado**

Recém-nascidos saudáveis  
Pacientes com AIDS

---

**1.2.2.2- TA-GVHD em pacientes imunocompetentes**

O primeiro relato de caso de TA-GVHD em indivíduo imunocompetente foi no Japão (Aoki e cols, 1984); o paciente desenvolveu febre, rash cutâneo, diarreia e pancitopenia

após cirurgia cardíaca e evoluiu à óbito. Esta doença foi reconhecida como a mesma relatada décadas atrás por Shimoda (1955), que foi chamada “eritroderma pós-operatória”. Era semelhante tanto clinica quanto patologicamente à GVHD.

O eritroderma pós-operatório foi confirmado, posteriormente, como TA-GVHD através da demonstração de mudança do fenótipo HLA do receptor para a do doador de sangue. A mudança foi deduzida nos primeiros dois casos determinando que o fenótipo HLA do paciente não era consistente com a tipagem da família (Sakakibara e cols, 1989). O relato de Thaler e cols (1989) ajudaram a elucidar o mecanismo da TA-GVHD em receptores imunocompetentes. Os autores descreveram dois casos de TA-GVHD fatal em indivíduos imunocompetentes após cirurgia cardíaca. Ambos os pacientes receberam sangue total fresco e não-irradiado de seus filhos. Em cada caso, um dos doadores era homozigoto HLA e compartilhava um haplótipo com o receptor que não podia rejeitar as células homozigotas HLA não reconhecidas como estranhas. Os linfócitos viáveis transfundidos do doador, entretanto, reconheceram o hospedeiro como estranho, proliferando e induzindo uma resposta enxerto-versus-hospedeiro.

A literatura científica é ampla com relatos de TA-GVHD em pacientes imunocompetentes, a maioria proveniente do Japão ou em pacientes transfundidos de membros da família (Petz e cols, 1993; Ohto & Anderson, 1996b).

### **1.2.3- Fatores de riscos para TA-GVHD**

A incidência de TA-GVHD parece ser maior no Japão. Ohto & Anderson (1996b) revisaram alguns casos de TA-GVHD em pacientes imunocompetentes no Japão tentando elucidar fatores que poderiam estar relacionados à doença. Eles discutiram 122 casos

detalhadamente e dividiram em três diferentes grupos, de acordo com sua doença: (1) pacientes cirúrgicos cardiovascular (56 pacientes), (2) pacientes com tumores sólidos tratados apenas cirurgicamente (39 pacientes), e (3) grupo de pacientes necessitando de transfusões com os seguintes diagnósticos: úlcera péptica, fraturas, colecistite e trauma (25 pacientes). Em todos os grupos a síndrome clínica, o tempo médio de aparecimento e desfecho clínico foram semelhantes, com apenas dois sobreviventes, todos no grupo 3. Dos 30 pacientes nos quais a TA-GVHD foi confirmada por tipagem HLA, doadores e pacientes compartilhavam pelo menos um haplotipo: 28 (93%) desses doadores eram homocigoto HLA para o haplotipo compartilhado, com os haplotipos A24 B52 implicados em mais de metade dos casos. A alta frequência (9,2%) para este haplotipo na população japonesa pode ser a chave para a alta incidência da TA-GVHD. O risco de receber uma doação homocigota na população japonesa é de 1 em 874, um risco que aumenta 8-30 vezes se for usado um familiar como doador de sangue. Este risco é comparado com 1 em 7174 para indivíduos não pertencentes à família e de 1 em 475 para familiares em primeiro grau nos Estados Unidos (Ohto e cols, 1992). Além disso, a análise de risco para TA-GVHD devido a haplotipos HLA homocigoto para transfusões randômicas são de 1 em 17700-39000 em brancos americanos, 1 em 6900-48500 em alemães e 1 em 1160-7900 em japoneses. Com doações direcionadas o risco aumenta 21 vezes para os americanos, 18 vezes para os alemães e 18 vezes para os japoneses (Wagner & Flegel, 1995). A homogeneidade genética da população japonesa coloca-os significativamente em posição de alto risco de desenvolvimento de TA-GVHD.

Diferentes práticas de transfusão podem estar envolvidas nos relatos do aumento da prevalência da TA-GVHD no Japão comparadas à outros países como os Estados Unidos.

No Japão, o sangue fresco que pode ser “quente”, significa que nunca foi refrigerado, ou < 24h de colhido, assim como a doação direcionada, que é comumente utilizada em transfusões de pacientes de cirurgias cardíacas. Isto contrasta com a prática da América do Norte no qual o sangue estocado é, normalmente, usado e doações direcionadas são reportadas como < 2% para esta população de pacientes (Goodnough e cols, 1990). Em sua revisão de casos japoneses, Ohto & Anderson (1996b) relataram que 62% dos pacientes com TA-GVHD receberam sangue fresco, ou seja, < 72h de colhido. Petz e cols (1993) relataram que similarmente, em cerca de 90% dos casos de TA-GVHD nos Estados Unidos, o sangue transfundido tinha < 4 dias de colhido. O uso de “sangue fresco” é um fator adicional de risco para desenvolvimento de TA-GVHD.

Estes relatos levaram os pesquisadores a estudar as possíveis mudanças ocorridas nos leucócitos dos doadores durante a estocagem e que diminuíram os riscos de desenvolvimento de TA-GVHD. Mincheff (1998) demonstrou que, após duas semanas de estocagem, os leucócitos progressivamente entram em apoptose e falham em estimular e responder em uma cultura mista de leucócitos. Chang e cols (2000) demonstraram que, após 3 dias de estocagem, as células são menos responsivas na cultura mista de leucócitos. Estes achados são consistentes com os relatos de que a maioria dos casos de TA-GVHD são vistos em pacientes transfundidos com sangue fresco. Existem, entretanto, exceções, e, mesmo rara, a TA-GVHD foi descrita em pacientes transfundidos com sangue estocado por mais de 7 dias.

### **1.3- Tratamento da TA-GVHD**

Tentativa de tratamento para a TA-GVHD é geralmente ineficaz. Em contraste com a

GVHD pós TMO, estes pacientes não respondem à corticóides, ciclosporina e/ou fatores de crescimento. Entretanto, existe alguns relatos na literatura de resolução espontânea da doença (Mori e cols, 1995) e de tratamento eficaz com combinação de ciclosporina e anticorpo monoclonal anti-CD3 OKT3 (Yasukawa e cols, 1994) ou globulina antitimócito e esteróides (Prince e cols, 1991). Mesilato de nafmostato, um inibidor de serina protease que inibe células T citotóxicas, foi utilizado com melhora transiente (Ryo e cols, 1999). Cloroquina, outro inibidor de serina protease que inibe células T citotóxicas *in vitro*, é considerado como uma forma de terapia (Nishimura e cols, 1998). O aparecimento rápido e fulminante da TA-GVHD associada à pancitopenia e resultando em infecção contribuem para a alta mortalidade vista na TA-GVHD (Brubaker, 1986).

#### **1.4. Irradiação de hemocomponentes**

A prevenção da TA-GVHD é de suma importância, uma vez que o tratamento não é efetivo. Pacientes com riscos devem ser identificados e transfundidos com hemocomponentes irradiados, uma vez que a irradiação inibe a proliferação dos linfócitos do doador e, portanto, o início da GVHD.

A dose de irradiação deve ser escolhida para que não ocorra efeito adverso significativo sobre a função das hemácias, plaquetas e granulócitos, e ao mesmo tempo abolir a resposta dos linfócitos. Vários testes foram utilizados para determinar a dose ótima de radiação para inibir a proliferação dos linfócitos. Estes incluem: a resposta *in vitro* de linfócitos a mitógenos, de células alogênicas em cultura mista de leucócito, e o uso do ensaio de diluição limitante. Na dose de 1500 cGy, 90% da resposta mitogênica é inibida, e em 5000 cGy a resposta mitogênica é diminuída em 97% (Valerius e cols, 1981). Portanto,

em 5000 cGy, cerca de 3% dos linfócitos sobrevivem à irradiação e são capazes de responder à mitógenos. Entretanto, células alogênicas são mais radiosensíveis. Com menos de 500 cGy pode-se abolir a resposta de linfócitos em cultura mista de leucócitos (Sprent e cols, 1974; Leitman & Holland, 1985). Uma das limitações da cultura mista de leucócitos em determinar a dosagem ótima de irradiação é que esta detecta apenas o decréscimo de 1-2 log (90-99%) das células T funcionais e portanto não é um teste confiável para a detecção de um número pequeno de células T imunocompetentes. Uma diminuição de células T de > 2 log é necessária para prevenir GVHD. Estudos usando ensaio de diluição limitante, que é mais sensível que cultura mista de leucócito, demonstraram que doses de irradiação de 2500-3000 cGy inibiram completamente a proliferação de células T (Pelsynski e cols, 1994). A dose de 2500 cGy foi recomendada pelo FDA como necessária para irradiação de hemocomponentes (Menitove, 1999).

Os efeitos da irradiação nos diferentes constituintes sanguíneos foram estudados visando assegurar a eficácia e a segurança dos produtos após exposição da dose ótima de radiação e prevenir a TA-GVHD (Holland, 1989). Além disso, a eficácia clínica das hemácias, plaquetas e granulócitos não parece ser significativamente afetada com doses até 5000 cGy (Button e cols, 1981; Valerius e cols, 1981). Entretanto, algumas mudanças foram observadas em doses de 3000-3500 cGy.

A sobrevivência das hemácias é diminuída no sangue irradiado no dia 0 com 3000 cGy e estocado por 42 dias; a recuperação média após 24h das hemácias estocadas com solução aditiva preservante (AS-1) é de 68% versus 78% no sangue estocado não-irradiado (Davey e cols, 1992). A irradiação afeta a membrana das hemácias com um aumento da perda de potássio das células e a hemoglobina plasmática aumenta significativamente após 35 dias

de estocagem de qualquer produto irradiado (Ramirez e cols, 1987; Morrof e cols, 1999). A concentração do potássio em hemácias estocadas apresenta-se entre 55 e 100 mmol/L. A segurança de grandes volumes de transfusão para neonatos destes produtos estocados e irradiados com alta concentração de potássio não foi testada (Strauss, 2000).

Estes efeitos da irradiação nos produtos celulares resultaram em recomendação pela Associação Americana de Banco de Sangue (AABB) de que hemácias não podem ser estocadas por mais de 28 dias após irradiação, com o tempo total de estocagem não excedendo aquele da hemácia não-irradiada. Hemácias para transfusões intrauterinas, neonatal e pediátrica devem ser irradiadas imediatamente antes do uso (Menitove, 1999).

A dosagem, o equipamento e as condições de irradiação devem ser verificadas para assegurar que o irradiador funciona corretamente. Mapeamento da dose deve ser realizada anualmente. Deve existir um método para confirmar que a irradiação esteja funcionando, como o uso de marcadores sensíveis à irradiação e que, após exposição à irradiação, ocorra mudança visível (Morrof e cols, 1997). Apesar da irradiação ser o melhor método para minimizar os riscos de desenvolvimento de TA-GVHD em pacientes susceptíveis, falhas já foram descritas. Estas incluem o desenvolvimento de TA-GVHD em três pacientes transfundidos com sangue irradiado, dois com doses de 2000 cGy e um com 1500 cGy (Drobyski e cols, 1989; Lowenthal e cols, 1993). Não é sabido, entretanto, se estes casos representam falhas no processo da irradiação.

### **1.5.1- Indicação para irradiação de hemocomponentes**

A indicação para irradiação mudou após o aumento da consciência e relatos sobre TA-GVHD. O protocolo da AABB recomenda irradiação para pacientes com riscos de TA-

GVHD (definido pelo serviço de transfusão), transfusões intrauterinas, doações direcionadas de membros da família e doações de indivíduos selecionados por compatibilidade HLA (Menitove, 1999). Em nenhum país a irradiação de hemocomponentes é mandatória para pacientes de cirurgia cardíaca ou para infantes pré-termo.

A publicação de diretrizes para a irradiação de sangue e hemocomponentes no Japão reflete os diferentes fatores de risco para este país (Asai e cols, 2000). Suas indicações para irradiação são muito maiores; eles recomendam a transfusão de sangue irradiado para cirurgias cardiovasculares desde 1992. Em 1995, eles expandiram suas recomendações para o uso de sangue irradiado para pacientes de cirurgia de câncer. Eles também recomendam a irradiação de todo sangue fresco (< 72h de colhido). O mais recente *guideline* estende suas recomendações para pacientes idosos (> 65 anos), pacientes com perda de sangue severa ou trauma severo. O sangue estocado por mais de 14 dias deve ser irradiado e eles agora advertem que “transfusão de sangue de familiares devem ser evitadas”, uma grande mudança em suas práticas de 10 anos atrás (Ohto & Anderson, 1996a,b).

No Brasil a legislação que rege os serviços de hemoterapia, a Portaria RDC nº 153 de 14 de junho de 2004 (ANVISA, 2004), especifica as condições necessárias para a irradiação de hemoconcentrados. A irradiação é obrigatória para pacientes recém-natos com peso até 3200 kg, pacientes com câncer e transplantados. Além disso, a validade dos hemoconcentrados irradiados foi estipulada em 28 dias após a irradiação.

### **1.5.2- Eficácia da irradiação**

A eficácia na introdução da irradiação como prevenção de TA-GVHD é melhor

observada no Japão. Juji e cols (1989) observaram 340 hospitais no Japão, revendo os casos de cirurgia cardíacas entre 1981 e 1986. Mais de 60000 procedimentos cirúrgicos foram realizados; 96 pacientes desenvolveram TA-GVHD, uma incidência de 1 em 658 casos ou 0,15%. O número de casos continuou a aumentar até 1990 e teve um leve declínio após este período. O aumento dos relatos de TA-GVHD podem estar relacionados ao aumento da consciência da doença, reconhecimento da clínica e diagnóstico. A diminuição da incidência foi atribuída à implementação de protocolos, incluindo o uso da irradiação de hemocomponentes e sua filtração, e uma diminuição do uso de sangue fresco e doações direcionadas (Hato e cols, 1994). Como um grande número de mudanças foram introduzidas ao mesmo tempo, não foi possível determinar quais destes fatores foram responsáveis pela diminuição da TA-GVHD.

Com a introdução de diretrizes mais restritas houve uma nova diminuição de TA-GVHD no Japão, com o número anual de casos relatados entre 9 e 14 de 1993 a 1997. Nos últimos 4 anos, o número de casos diminuiu para 2 em 1998, 4 em 1999 e nenhum em 2000 e 2001. Aproximadamente 18 milhões de hemocomponentes são fornecidos por hospitais no Japão, sendo mais de 95% irradiados antes do uso (Schoreder, 2002). Estes resultados demonstram que a TA-GVHD pode ser prevenida para os grupos relacionados com o desenvolvimento da doença.

### **1.6- A família P-ATPase**

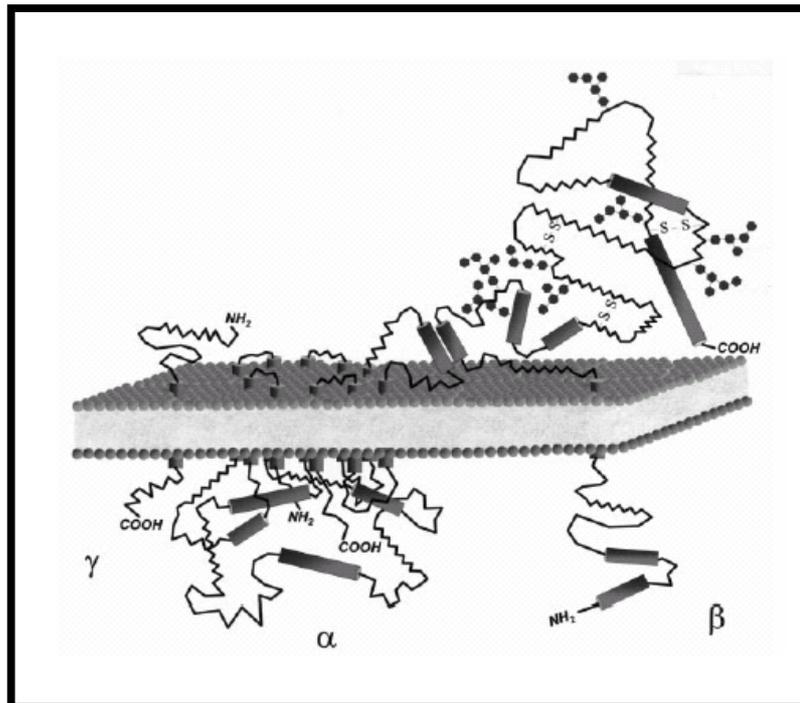
As ATPases do tipo P são uma família de proteínas, com atividade enzimática, que estão relacionadas com o transporte de íons através da membranas. Essas enzimas são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, uma vez que são responsáveis

pelo balanço osmótico e composição de íons intracelular (Apell, 2003; Donnet e cols., 2001).

A atividade destas enzimas depende basicamente da hidrólise da molécula de ATP para a formação de gradientes eletroquímicos que existem em todos os tipos celulares e através deste mecanismo conseguem efetuar o transporte de diversos íons como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , e  $\text{Cd}^{2+}$  (Fagan e Saier, 1994).

De acordo com o modelo proposto por Post e Albers (1965) estas ATPases adquirem diferentes conformações para realizar o transporte de íons através de membrana, passando por duas conformações principais, denominadas E1 e E2, conforme mostrado na figura 1. Inclui-se ainda etapas de oclusão/declusão de íons, e fosforilação/defosforilação da ATPase.

Em geral estas enzimas são inibidas por vanadato, um análogo de fosfato, e este composto ajuda a distinguir uma P-ATPase de uma V-ATPase ou F-ATPase. Algumas proteínas que compõem esta família são a  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA e SERCA) (Carafoli, 1991), a  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase não gástrica, a  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática de plantas e fungos (Serrano, 1989), a  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase gástrica (Lorentzon e cols, 1988), e a  $\text{Cl}^-$ -ATPase (Gereneser & Puroshothan, 1996). Fagan & Saier (1994) ao analisar a seqüência de aminoácidos de 47 P-ATPases, chegaram a conclusão de que todas elas vieram de um ancestral comum.



**Figura 1- Modelo tridimensional suposto da estrutura topológica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.** A figura representa os 10 segmentos transmembrana da subunidade  $\alpha$  e subunidade  $\beta$  com um segmento transmembrana, 3 pontes dissulfeto e as glicosilações indicadas pelos hexâmeros, na porção extracelular. A subunidade  $\gamma$  (FXVD2) também está representada com um único segmento transmembrana, que interage com a subunidade  $\alpha$  (Mobasher e cols, 2000).

Dentre as proteínas da família P-ATPase as mais estudadas são: a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (que mantém o gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo endoplasmático (SERCA), que bombeia o  $\text{Ca}^{2+}$  do lúmen para o retículo sarcoplasmático, e a  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase, que é expressa pelas células parietais da mucosa gástrica que direciona a secreção de ácido clorídrico para o lúmen estomacal. (Apell, 2004).

A estrutura cristalográfica com alta resolução está disponível apenas para a SERCA, H<sup>+</sup>-ATPase e V-ATPase, para outros membros da família existem apenas estruturas cristalizadas com baixa resolução (8Å) (Herbert e cols, 2001; Kuhlbrandt, 1998; Scarbrough, 1999).

A porção enzimática destas P-ATPases é formada basicamente pelos loops citoplasmáticos compreendidos entre L2-3, L4-5 e o N-terminal. Estas seqüências são conservadas em diversas espécies estudadas. A maioria das ATPases do tipo P possuem 10 segmentos transmembrana com seqüência de aminoácidos muito preservadas. As mudanças dizem respeito a mudança de carga e polaridade, o que determina as diferentes propriedades funcionais destas enzimas.

### **1.7- A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi descoberta por J.C. Skou em 1957, e tem sido amplamente estudada desde então. Atualmente é de conhecimento que esta enzima desempenha participação fundamental em inúmeros processos fisiológicos celulares vitais, principalmente em relação à manutenção da homeostase.

Também conhecida por "Bomba de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>", esta enzima regula as concentrações citoplasmáticas de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, utilizando a energia proveniente do metabolismo para subsidiar o antiporte destes íons contra gradientes de concentração desfavoráveis. O transporte ativo destes cátions é possível a partir da hidrólise de uma molécula de ATP com estequiometria de 3:2:1 (Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:ATP) (Glynn, 1993). A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é uma proteína integral de membrana plasmática, largamente difundida e encontrada em plantas superiores,

artrópodes, moluscos, e vertebrados sem grandes diferenças estruturais em sua seqüência primária (Bonting, 1970).

Atribui-se a esta enzima um grande número de funções cuja importância fisiológica é indiscutível. Entre estas funções podemos listar: manutenção do potencial de repouso em membranas biológicas; fornecimento da energia necessária ao potencial de ação de células excitáveis; transporte secundário de sais em tecidos onde este transporte é intenso, como na alça de Henle, brânquias de peixes ou glândulas de sal nas aves marinhas; transporte de água nos túbulos renais proximais, peles de anfíbios, bexigas de peixes; manutenção de um meio intracelular rico em  $K^+$ , indispensável para a atividade plena de diversas enzimas intracelulares; geração do gradiente eletroquímico que é utilizado pelas células para acoplar o transporte de substâncias vitais como: hexoses, aminoácidos, íons  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$  ou íons  $H^+$  e, por fim, geração de calor, já que a bomba responde por 20% de toda a taxa metabólica basal nos mamíferos (Albers, 1975; Robinson & Flashner, 1979; Glynn, 1985). No rim, esta enzima desempenha um papel primário na reabsorção de  $Na^+$  e água. Então, esta enzima é essencial para a manutenção do fluido corporal e homeostase eletrolítica (Jorgensen, 1990).

### **1.7.1- A $Na^+,K^+$ -ATPase e suas subunidades**

A  $Na^+,K^+$ -ATPase é um oligômero composto estequiometricamente por dois polipeptídeos. Um peptídeo maior ( $\alpha$ ) com o peso molecular estimado em torno de 100 - 110 kDa, um glicopeptídeo ( $\beta$ ) com peso molecular em torno de 50 kDa, e no caso do rim

uma terceira subunidade ( $\gamma$ ) em torno de 7,5 KDa, como podemos observar na figura 1. Peters *e cols* (1981) demonstraram uma estequiometria de 1:1 entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . No tecido renal, está atualmente bem caracterizada a presença de uma terceira subunidade ( $\gamma$ ), de baixo peso molecular aparente, resistente a proteólise e capaz de interagir com derivados fotoativados da ouabaína (Forbush, 1978; Mercer, 1993).

Até o momento são descritas 4 isoformas de  $\alpha$  ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  e  $\alpha 4$ ) e 3 isoformas de  $\beta$  ( $\beta 1, \beta 2$  e  $\beta 3$ ) que exibem 85 e 45 % de identidade de suas seqüências, respectivamente, e que mostram uma distribuição tecido específica, sendo a isoforma  $\alpha 1$  amplamente distribuída.

Evidências bioquímicas e estudos de transfecção sugerem que as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  podem se arranjar em diferentes combinações, em formas potencialmente funcionais. A isoforma  $\alpha 1$ , por ser amplamente distribuída, pode assumir uma função de manutenção em todas as células. Em ratos adultos a isoforma  $\alpha 2$  é expressa predominantemente em cérebro, músculo esquelético e coração, enquanto  $\alpha 3$  é expressa somente no cérebro. Comparando as diferentes isoformas,  $\alpha 3$  é a que possui uma menor afinidade por  $\text{Na}^+$ , e pode se tornar ativa apenas após um aumento dos níveis intracelulares deste íon. De modo similar a  $\alpha 1$ , a isoforma  $\beta 1$  é largamente expressa. Em rato a isoforma  $\beta 2$  é expressa em músculo e cérebro, onde parece ter um papel complementar na adesão de moléculas. A isoforma  $\beta 3$  tem sua expressão mais abundante em testículos e está presente em níveis mais baixos em cérebro, rim, baço, pulmão, estômago, cólon e fígado, não sendo detectada no coração (Malik, 1996). Alguns autores relatam que as isoformas de  $\beta$  podem influenciar diferentemente as propriedades enzimáticas e de transporte das isoenzimas de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -

ATPase, mas os efeitos são menos pronunciados comparando com os das isoformas de  $\alpha$ . (Blanco & Mercer, 1998; Schmalzing & cols, 1997; Mobasher, 2000; Gloor & cols, 1990). Através de dados obtidos a partir da análise de espalhamento de nêutrons e inativação por bombardeio radioativo foi mostrado que o peso molecular obtido para o conjunto funcional da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase purificada de rim de porco atingia valores entre 381 - 420 kDa (Paschence e cols., 1983). Este fato sugere que, na maioria dos tecidos, a enzima se organiza como um heterodímero ( $\alpha_2\beta_2$ ) funcional após a sua montagem na membrana plasmática.

Os eventos catalíticos e os sítios de ligação de substrato, de cátions, de ouabaína, são atribuídos à subunidade  $\alpha$ . Modelos recentes da topologia desta subunidade pressupõem a existência de 10 segmentos transmembranares (H1-H10), que exibem cinco ligações na forma de hélices extracelulares (“loops”) (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). A afinidade por glicosídeos cardíacos, por exemplo, a ouabaína, é determinada pela porção extracelular da subunidade  $\alpha$  em sua, mais precisamente nos segmentos H5-H6 (Shamraj e cols, 1993 e Palasis e cols, 1996). Nesta subunidade encontram-se ainda os sítios de ligação para ATP, ADP ou Mg-ATP, sendo os resíduos Arg-544, do segmento Arg-544 – Asp-567 os mais relevantes para afinidade (Jacobsen e cols, 2002). A Asp-369 também é parte do sítio de ligação e fosforilação catalítica pelo ATP e é o resíduo que forma um aspartil-fosfato durante o ciclo catalítico da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Lingrel & Kuntzweiler, 1994).

O resíduo intracelular Glu-781 da subunidade  $\alpha$  tem sido envolvido como de grande importância para o processo de ligação e/ou oclusão de cátions. Experimentos de mutações sítio dirigidas na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, onde o Glu-781 foi substituído por aspartato, lisina, ou

alanina, todos os mutantes mostraram um aumento da afinidade aparente por ATP, comparado à enzima nativa. Os mutantes Glu-781 – Asp e Glu-781 – Ala apresentaram uma redução na afinidade aparente por  $K^+$ . Os mutantes Glu-781 – Asp e Glu-781 – Ala apresentaram uma redução na afinidade aparente por  $Na^+$ , enquanto no mutante Glu-781 - Lys observou-se um pequeno aumento na afinidade por este cátion (Koster e cols., 1996). As isoformas de  $\alpha$  são codificadas por genes separados e exibem uma expressão tecido específica (Lingrel e cols, 1990).

O verdadeiro papel e funcionamento da subunidade  $\beta$  ainda não foi plenamente elucidado, e ainda não se sabe muita coisa sobre o seu real papel na atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase. Contudo, trabalhos sugerem que ela é de suma importância no ajuste conformacional do complexo entre  $\alpha$  e  $\beta$  em relação à sua posição na membrana após a expressão (Gueereing e cols, 1996). Hamrick *e cols*, (1993) mostraram que mutantes da subunidade- $\beta$  sem a porção citoplasmática eram capazes de se associar plenamente com a subunidade catalítica.

Quimeras contendo porções transmembranares da subunidade  $\beta$  de outras ATPases ( $H^+$ -ATPase) de membrana, fusionadas com um segmento extracelular de 100 aminoácidos adjacente ao domínio transmembrana original da subunidade- $\beta$ , também eram capazes de associação e de geração de dímeros da  $Na^+,K^+$ -ATPase funcionais. Estes dados sugerem que esta porção extracelular é aparentemente decisiva para a associação com a subunidade- $\alpha$ . Soma-se a estes dados que os domínios H7 e H8 da subunidade  $\alpha$  estão envolvidos na interação com a subunidade  $\beta$  no espaço extracelular, e os resíduos compreendidos entre Asn-894 – Ala-919 do domínio extracelular são suficientes para que esta interação ocorra

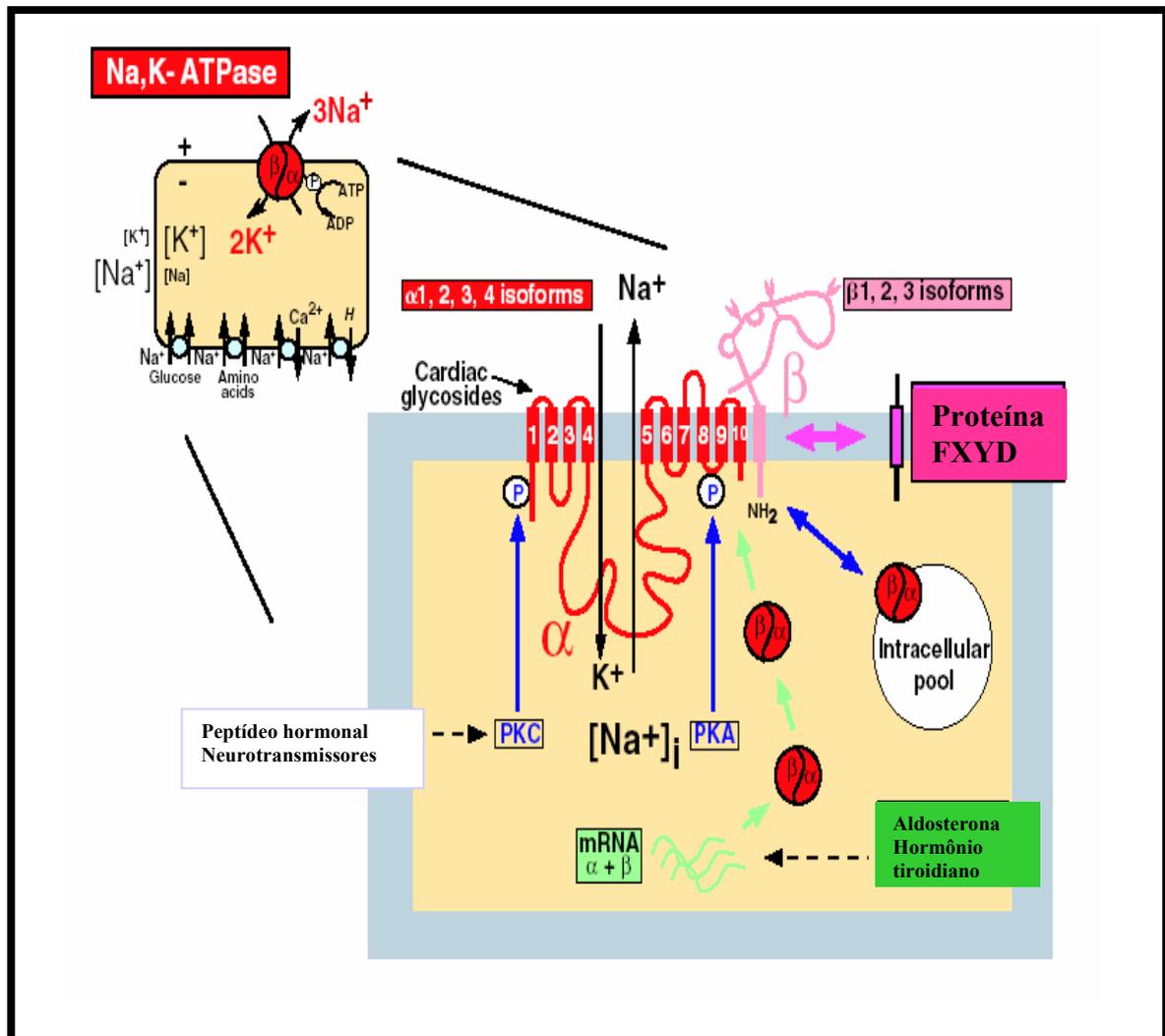
(Lemas e cols., 1994). Sabe-se que a subunidade- $\beta$  é imprescindível para a atividade da enzima (Chow & Forte, 1995). Foi mostrado que os 34 últimos aminoácidos da subunidade  $\beta$ , que se encontram no domínio citoplasmático, quando truncados induzem uma diminuição significativa da afinidade aparente por  $K^+$  extracelular, sendo proposto que a porção N-terminal não estaria diretamente envolvida com o efeito observado, e sim o truncamento dos aminoácidos que perturbam o ectodomínio e/ou o domínio transmembrana desta subunidade (Geering e cols., 1996; Hasler e cols., 1998). A interação da subunidade  $\beta$  com a subunidade  $\alpha$  é relativamente forte, permanecendo estável após tratamento com diversos detergentes não iônicos (Horisberger e cols., 1991). A subunidade  $\beta$  é altamente glicosilada em sua porção extracelular e existem variações significantes no número de sítios de glicosilação entre as diferentes isoformas de subunidade  $\beta$ . A isoforma  $\beta 1$  possui três sítios de glicosilação e todos os três sítios consensuais são glicosilados. A isoforma  $\beta 2$  de galinha possui quatro sítios potenciais de glicosilação, enquanto a de rato possui oito sítios potenciais de glicosilação (Tamkum & Frambrough., 1986; Miller e Farley., 1988; Treuheit e cols., 1993). Todas essas variações de glicosilações sugerem que os carboidratos não são essenciais para o transporte primário. Experimentos com  $Na^+K^+$ -ATPase sem as glicosilações ou incompletas mantinham sua capacidade de hidrolisar ATP e ligar ouabaína, entretanto, eram mais sensíveis à tripsinização, sugerindo que a glicosilação pode desempenhar um papel no processamento da proteína (Zamofing e cols., 1986 e Schmalzing e cols., 1992).

Em suma, 4 isoformas de  $\alpha$  e 3 isoformas de  $\beta$  são descritas até o momento. Entretanto, outras isoformas podem existir. Muitos estudos têm mostrado a existência de

outras isoformas de  $\beta$ . Estudos moleculares com a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de peixe sugerem a existência de outras isoformas da subunidade  $\beta$  (Mobasher e cols, 2000).

A expressão das múltiplas isoformas de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, que exibem diferentes afinidades por  $\text{Na}^+$ , pode ser fisiologicamente importante para o controle da concentração intracelular deste íon. Vale lembrar que o nível de  $\text{Na}^+$  intracelular tem efeitos em diversas funções celulares, como a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Pequenos aumentos na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular favorecem o seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, e o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante regulador da contração do músculo cardíaco e esquelético e também da excitabilidade das células neuronais. (Blaustein, 1993)

Diversos mecanismos regulam a expressão e função da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A figura 2 representa alguns fatores que de alguma forma regulam esta enzima.



**Figura 2- Esquema da regulação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase por diversos fatores.** Alguns hormônios e neurotransmissores estimulam PKA e PKC provocando uma fosforilação da subunidade α da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, que afeta as propriedades de transporte e ou redistribuição através da membrana ou estoques intracelulares. A figura também representa a subunidade β e proteínas FXYP, que podem participar da regulação desta ATPase. Figura adaptada de Crambert G e Geering K (2003) *Sci. STKE* 166: 1-9.

### 1.7.2- Ciclo catalítico da $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

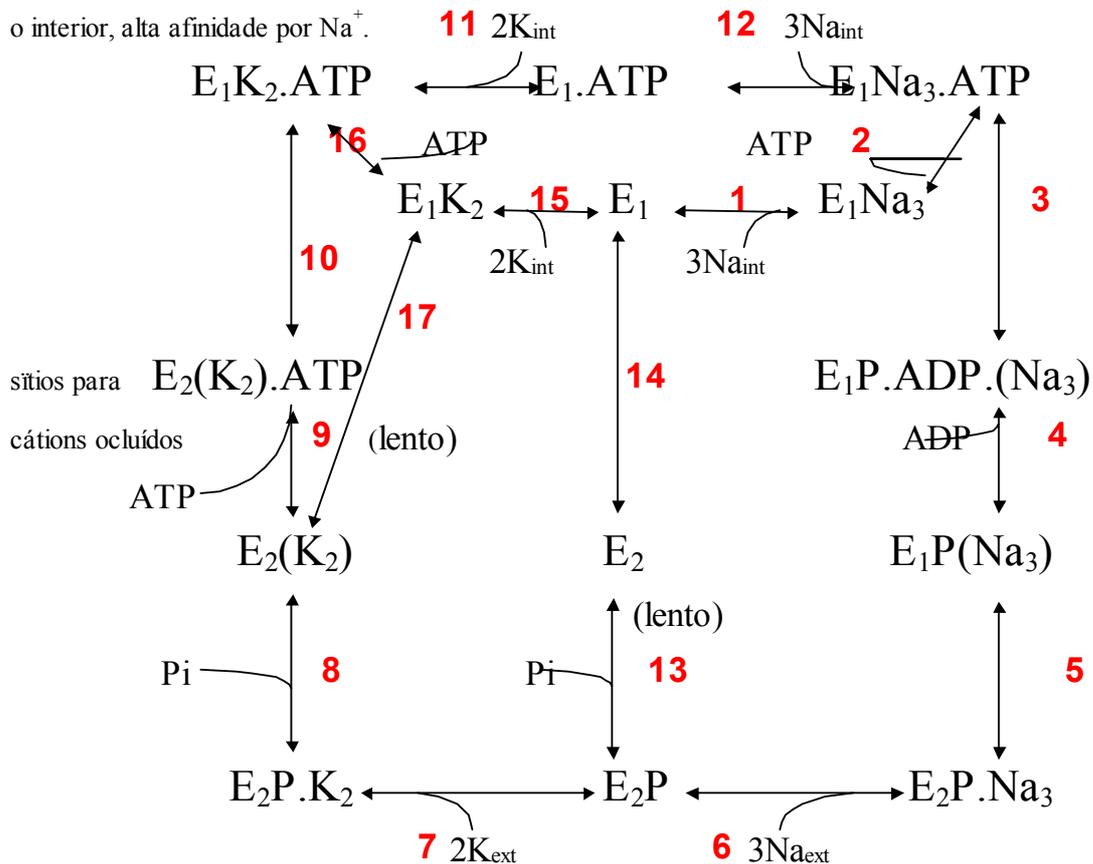
Dentre os muitos esquemas de reação propostos para a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, um dos mais aceitos é o mecanismo de Post-Albers (Post e cols., 1965), que preconiza a existência de pelo menos duas conformações da enzima que acoplariam a fosforilação por ATP ao transporte de íons. Post e cols., 1972 propuseram a existência de duas isoformas principais ( $E_1$  e  $E_2$ ) que se reciclariam em eventos químicos que envolvem a oclusão e o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , a hidrólise de ATP e a fosforilação da enzima em um resíduo  $\beta$ -aspartil de seu centro ativo. Atualmente é aceito que o domínio de fosforilação fica situado na porção citoplasmática da enzima, no aminoácido Asp-369 (Ellis-Davis & Kaplan, 1990) e que este resíduo é o sítio comum para a fosforilação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase por  $\text{P}_i$  e por ATP (Schuurmans-Stekhoven e cols., 1980).

Jorgensen e cols., 1975 faz uma adaptação do ciclo catalítico proposto por Post e Albers (figura 3) e descreve que o passo inicial do ciclo de reação é a ligação de ATP com baixa afinidade em  $E_2(\text{K}^+)$ , acelerando a velocidade de deocclusão deste íon e acelerando a transição de  $E_2$  para  $E_1$  nesta enzima (passos 9, 10 e 11). O passo 14 (transição de  $E_2$  para  $E_1$  na ausência de ATP) normalmente é o passo limitante deste ciclo de reações. As medidas de deocclusão de íons são realizadas pelo uso de  $\text{Rb}^{86}$  que é um análogo do íon  $\text{K}^+$  (Glynn, 1993). Estes autores, demonstraram que a velocidade de saída de  $^{86}\text{Rb}$  da enzima com  $\text{Rb}^+$  ocluído não era alterada pela adição de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ , mas era acelerada pela adição de ATP (passo 11). O ATP é ligado com alta afinidade na conformação  $E_1$  ( $K_d \sim 0.1 - 0.2 \mu\text{M}$ ) e o aumento da energia de ligação do ATP é associado com a transição  $E_2(2\text{K}^+) - E_1$ .  $2\text{K}^+$  é que constitui a força para direcionar o transporte de  $\text{K}^+$  através da membrana. A

próxima etapa de transdução de energia é a transferência dependente da ligação de  $\text{Na}^+$  na forma  $\text{E}_1$  (passo 1), entre o  $\gamma$ -fosfato do ATP para o grupamento acil do Asp-369 da subunidade  $\alpha$  e isomerização e a oclusão das fosfoformas ( $\text{E}_1\text{P}$  ( $3 \text{ Na}^+$ ) -  $\text{E}_2\text{P}$  ( $2 \text{ Na}^+$ )), de forma acoplada a reorientação dos sítios de cátions e liberação sequencial dos íons  $\text{Na}^+$  no meio extracelular (passos 2,3,4 e 5) (Jorgensen e cols., 1998). Neste contexto, foi mostrado que durante o transporte, os 3 íons  $\text{Na}^+$  são liberados em duas etapas: primeiro um íon  $\text{Na}^+$  é liberado (formando subsequentemente  $\text{E}^*\text{-P}$  que apresenta dois íons  $\text{Na}^+$  ligados), e somente após esta liberação a bomba desliga os outros dois (Glynn & Karlsh, 1990). A fosforilação por ATP é dependente de  $\text{Mg}^{2+}$  (Blaustein e cols., 1988) sendo que alguns outros cátions divalentes como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  entre outros, podem substituir o  $\text{Mg}^{2+}$  para ativação da fosforilação, mas são incapazes de suportar a hidrólise de ATP e o ciclo normal da bomba (Fukushima e Post, 1978; Askari e Huang, 1981). Durante o movimento transmembrana, a interconversão é acompanhada pela liberação da molécula de ADP e perda da afinidade pelo  $\text{Na}^+$  (passo 5), que precede a liberação de 3 íons  $\text{Na}^+$  para fora da célula (passo 6). O  $\text{K}^+$  ao se ligar em alta afinidade a  $\text{E}_2\text{-P}$  (passo 7), acelera a hidrólise desta fosfoenzima (passo 8), gerando novamente a forma de enzima que mantém os íons  $\text{K}^+$  ocluídos (Hobbs e cols., 1979). A forma  $\text{E}_2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é capaz de ocluir íons  $^{86}\text{Rb}$ , em substituição aos íons  $\text{K}^+$  (passo 8). Forbush, (1988) demonstrou que 2 íons  $\text{K}^+$  seriam então ocluídos durante o ciclo de reação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, fato que concorda com uma estequiometria assimétrica na troca de 3  $\text{Na}^+$  por 2  $\text{K}^+$  a cada molécula de ATP hidrolisada, inicialmente proposta por Yamaguchi & Tonomura (1979) e posteriormente determinada em medidas dos fluxos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  mediados pela bomba.

sítios de ligação de cátions voltados para

o interior, alta afinidade por  $\text{Na}^+$ .



sítios de ligação de cátions voltados para

o exterior, alta afinidade por  $\text{K}^+$

**Figura 3- Ciclo de Reações da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase proposto por Jorgensen e colaboradores (1975).** A figura mostra as etapas do ciclo evidenciando a entrada e saída dos íons, bem como as duas conformações principais da enzima ( $\text{E}_1$  e  $\text{E}_2$ )

### 1.7.3- A ouabaína

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco conhecido há mais de dois séculos por seus efeitos cardiotônicos; este composto, quando em doses terapêuticas, provoca um aumento da força de contração do coração. Este efeito foi relacionado a uma inibição parcial da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase acoplada a uma modificação da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , o que induz a um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que dispara a contração cardíaca (Hansen, 1984; Heller, 1990).

Yoda e Yoda (1982) demonstraram que a ouabaína liga preferencialmente à conformação  $\text{E}_2\text{-P}$ , exibindo uma única classe de sítios e produzindo um complexo estável e que se decompunha muito lentamente.

Uma forma bem conhecida de diferenciar entre as isoformas de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é a presença de diferentes afinidades por ouabaína entre estas isoformas. Neste contexto,  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  exibem maior afinidade pelo glicosídeo que  $\alpha 2$  (todas na faixa nanomolar) enquanto que a isoforma  $\alpha 1$  de rim de rato exibiria especificamente a pior afinidade aparente (na faixa de micromolar) (Mercer, 1993).

Xie (2002), em uma revisão recente, destacam diversos eventos fisiológicos onde a ouabaína tem sido implicada, tais como: aumento de cálcio intracelular, ativação de Ras e p42/44 MAPKs (proteína cinase ativadora de mitogênese) em miócitos cardíacos, estímulo à produção intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio), entre outros. Xie e cols (2001) e Askari e cols. (1996) tem realizado estudos implicando a ouabaína em várias rotas de sinalização celular onde a inibição parcial da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase desencadearia respostas

celulares ligadas a ativação de vias  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes, ativação de SRC-quinasas e MAP-kinases que regulam a proliferação e diferenciação em miócitos.

Atualmente estudos têm mostrado a existência de um fator denominado “Ouabain like Factor” (OLF), ou seja, um fator com ampla identidade a ouabaína e que é sintetizado pela adrenal. É relevante ressaltar que o OLF é encontrado em concentrações elevadas no plasma de pacientes hipertensos. Este fator é capaz de inibir a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mimetizando os efeitos dos glicosídeos cardíacos (Hamlyn e cols., 1991).

### **1.8- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana Plasmática (PMCA)**

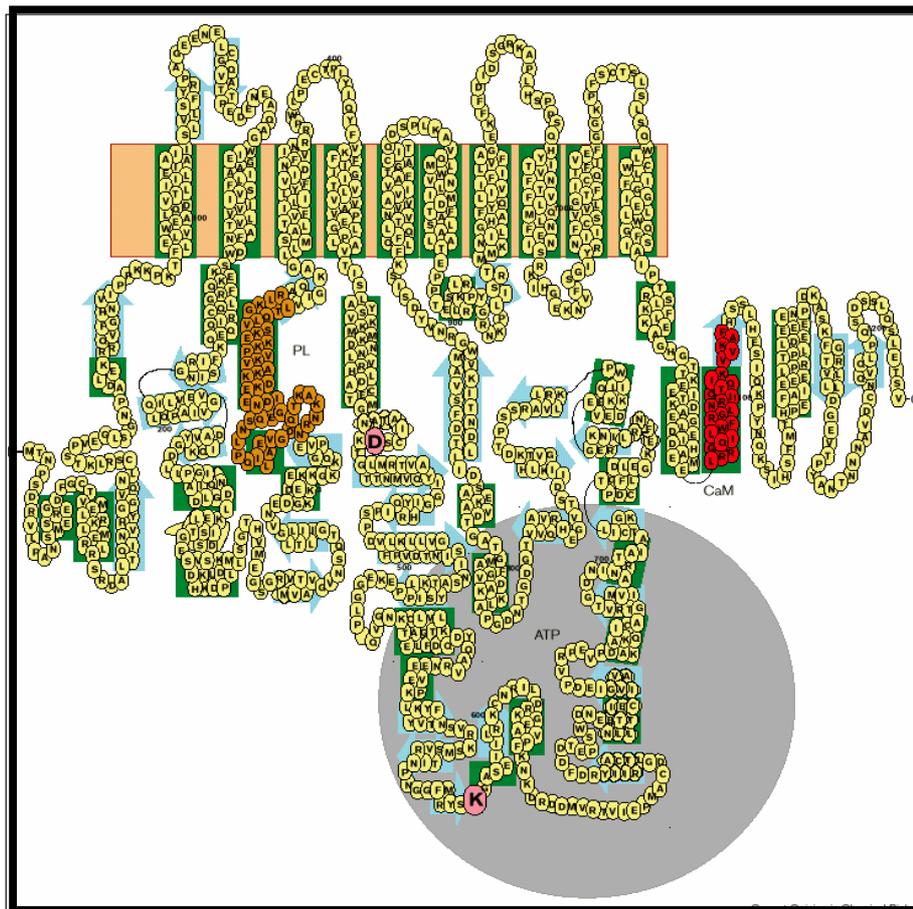
O  $\text{Ca}^{2+}$  livre citoplasmático é um importante segundo mensageiro, sendo um agente sinalizador para um grande número de funções celulares, incluindo a regulação de vias metabólicas, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores, regulação hormonal, apoptose, divisão celular, expressão gênica e contração muscular (Carafoli, 1987, 1991, 1992; Meyer & Stryer, 1991, Berridge e cols., 2000). Para manter a funcionalidade da célula os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares devem ser mantidos extremamente baixos, cerca de 1000 vezes menores do que no meio extracelular. Caso as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular sejam mantidas em níveis mais altos do que os seus limites normais, pode haver danos irreversíveis à célula, como apoptose ou morte por necrose (Yu e cols., 2001). Os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  podem diminuir pelo armazenamento deste íon em estoques intracelulares (que ocorre via  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo endoplasmático – SERCA) ou pelo efluxo de cálcio via PMCA. A saída do cálcio é mediada principalmente pela PMCA e pelo trocador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (Blaustein, 1988; Carafoli, 1987; Reeves, 1994).

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática de eritrócitos é uma proteína de 140kDa (Schatzmann, 1996), que possui cerca de 1200 aminoácidos (Verma e cols., 1988). Cerca de 10% das proteínas de membranas plasmáticas de eritrócitos correspondem à PMCA (Knauf e cols, 1974).

A primeira região citoplasmática (domínio A) corresponde à porção transdutora, que acopla a hidrólise de ATP com o transporte de cálcio e localiza-se entre as hélices M2-M3. O domínio N situa-se entre as hélices M4-M5, que contém o sítio de ligação do nucleotídeo; também se localiza nessas hélices o domínio P, onde se situa o ácido aspártico que é fosforilado por ATP (Asp-465). A partir de M10 encontra-se a última porção citoplasmática, onde se localiza o domínio de ligação à calmodulina, seqüências consensos de fosforilação por proteína cinase C e proteína cinase A, e sítios de regulação alostérica por cálcio. (Hofmann e cols., 1993; Wang, 1991).

Todas as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de membrana plasmática são ativadas por concentrações nanomolares de calmodulina, na presença de concentrações micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Entretanto, concentrações altas de  $\text{Ca}^{2+}$  inibem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática e de retículo sarcoplasmático (Carafoli, 1994; de Meis, 1981). A calmodulina atua de duas formas na ativação da PMCA, aumentando a afinidade por cálcio em torno de 20 vezes e a velocidade máxima de 4 -10 vezes. (Wuytack & Raymaekers, 1992).

É proposto que a estrutura da PMCA possuiria assim como a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e outras ATPases tipo do P, 10 segmentos transmembranares, designados como M1 a M10, que conectam 3 regiões citoplasmáticas (Penniston & Enyedi, 1998; Carafoli & Brini, 2000). A figura 4 representa as semelhanças entre a PMCA e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.



**Figura 4- Estrutura secundária da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática.** Os retângulos verdes representam a parte da enzima que possui a estrutura de  $\alpha$ -hélice e as setas azuis, estruturas em folha  $\beta$ -pregueada. O ácido aspártico que forma o intermediário fosforilado e a lisina, que é marcada por FITC no domínio de ligação de ATP são representados pelas suas letras símbolos em um círculo rosa, K para lisina e D para ácido aspártico. O domínio de ligação da Calmodulina (CaM), e o domínio de ligação dos fosfolípidos ácidos (PL) são mostrados em vermelho e marrom claro, respectivamente. O sítio de ligação do ATP está envolto por um círculo cinza. As extremidades C-terminal e N-terminal estão marcadas por C e N respectivamente. Este modelo é baseado na sequência da PMCA4. (Reproduzido de Carafoli & Brini, 2000)

Até o momento foram identificados 4 genes que codificam para  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática. Em humanos e ratos, a isoforma PMCA 1 é amplamente distribuída, enquanto a PMCA 2 e 3 são menos freqüentes. As isoformas 1 e 4 são expressas em muitos tipos celulares e assumem um papel de manutenção da homeostase. A PMCA 4 é expressa abundantemente em eritrócitos, útero, estômago e certas regiões do cérebro. Eritrócitos humanos contêm as isoformas PMCA 1 e PMCA 4 (Grover & Khan, 1992; Keeton & Shull, 1995; Stauffer e cols., 1995).

Ainda não foram descritos na literatura inibidores específicos da PMCA, como são a ouabaina para a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ou a thapsigargina para SERCA. Para inibir estas enzimas são utilizados inibidores gerais de ATPases do tipo-P, como lantânio e ortovanadato ou antagonistas de calmodulina como calmidazolium.

A grande variabilidade no carboxi-terminal entre as isoformas tem sugerido a existência de diferentes sítios de fosforilação por PKC, e conseqüentemente diferentes efeitos em suas atividades. Enyedi e colaboradores (1997) mostraram que as isoformas 2b e 3b não são fosforiladas significativamente por PKC, ao contrário das isoformas 2a e 3a. Verma e cols (1999), relata que a fosforilação da PMCA 4 a humana por PKC ocorre no domínio de ligação da calmodulina, mas não afeta substancialmente a afinidade por calmodulina ou a atividade basal da enzima.

A importância da PMCA para a sinalização celular depende principalmente do tipo celular. Em células neuronais e cardíacas, o principal caminho para o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é via

trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Reeves e cols., 1994), enquanto em eritrócitos o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é mediado pela PMCA (Wright e cols., 1993). Em outros tipos celulares funcionam efetivamente os dois mecanismos de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$ , onde o mecanismo predominante dependerá da concentração de cálcio intracelular. A PMCA possui uma grande afinidade pelo cálcio, no entanto o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  é mais eficaz no efluxo deste cálcio (Furukawa e cols., 1988).

A PMCA, assim como outras proteínas sinalizadoras, também podem se localizar dentro de cavéolas, que são pequenas invaginações na membrana plasmática. As cavéolas fechadas no interstício são incapazes de ejetar o cálcio, no entanto isto pode ser uma forma eficiente da célula bloquear o efluxo de cálcio e controlar o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . É proposto que o  $\text{Ca}^{2+}$  fique sequestrado dentro da cavéola, quase como uma vesícula na superfície celular, sendo liberado quando requisitado. A composição lipídica da membrana parece regular a morfologia da caveola, de acordo com a fluidez dos lipídeos envolvidos em sua composição, e interessante a PMCA também é sensibilizada pelos lipídeos que a envolvem (Anderson, 1993).

A PMCA é uma importante controladora da homeostasia de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo ativada por uma série de reguladores, onde alguns ainda possuem mecanismos desconhecidos. O fato da PMCA também estar localizada em cavéolas tem sugerido um importante mecanismo de controle dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula.

**2- OBJETIVOS -**

Para tentar esclarecer melhor os mecanismos do aumento do potássio plasmático após a irradiação de hemoconcentrado traçamos os seguintes objetivos:

- Verificar o aumento dos íons potássio, sódio e cálcio após a irradiação através do tempo de estocagem.
- Avaliar parâmetros de viabilidade celular como LDH, pH e fragilidade osmótica dos eritrócitos irradiados através do tempo de estocagem.
- Verificar se a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e da PMCA estão afetadas pela irradiação e tempo de estocagem.
- Determinar se a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase esta diretamente envolvida no aumento de potássio plasmático provocado pela irradiação.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS-**

### **3.1- Reagentes utilizados:**

Todos os sais e tampões utilizados nesta tese são de grau analítico e foram fornecidos em sua maioria pela Sigma Chemical Co (MO, Estados Unidos).

O  $^{32}\text{P}$  foi fornecido pelo Instituto Brasileiro de Pesquisas Nucleares na forma de ácido fosfórico livre de carreador e foi sempre utilizado após uma purificação prévia em coluna de troca iônica de acordo com o método descrito por Kessler e cols. (1986) e o  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  também foi fornecido pelo Instituto Brasileiro de Pesquisas Nucleares. As enzimas utilizadas na marcação de ATP foram fornecidas pela Boehringer-Mannheim (Alemanha).

### **3.2- Obtenção das bolsas de sangue:**

Bolsas de sangue frescas (até 1 dia após a coleta), obtidas de doadores voluntários e saudáveis do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) através de sua alíquota de controle de qualidade obrigatória por lei, foram separadas em duas frações iguais de 150 mL e acondicionadas da mesma maneira em bolsas plásticas. Uma das frações foi irradiada com 25Gy e a segunda alíquota não foi tratada (controle). As bolsas de sangue foram estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por diferentes tempos (1, 7, 14 e 28 dias), em condições idênticas as de outras bolsas usadas na clínica.

### **3.3- Preparação de fantasmas de eritrócitos:**

A preparação de membrana plasmática de eritrócitos humano (ghost) provenientes de bolsas de sangue irradiadas e controles, foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rega e colaboradores (1979). As hemácias foram separadas do plasma e dos leucócitos por centrifugação a  $5000 \times g$  por 10 min., ressuspensas em tampão contendo 20 mM de

Tris-HCl pH 7.4, 130 mM de KCl e 0.6 mg/ml de PMSF, sendo em seguida centrifugadas a 5000 x g por 10 min. O precipitado foi submetido a congelamento em N<sub>2</sub> líquido e posterior descongelamento em temperatura ambiente, para a lise das células e em seguida ressuspensão em tampão contendo: 5 mM de Hepes pH 7.4, 1mM de EDTA e 0.6 mg/mg de PMSF, sendo centrifugado, posteriormente, a 7000 x g por 10 min. Este passo foi repetido 4 vezes, sendo a última lavagem feita na ausência de PMSF e de EDTA. O precipitado foi novamente ressuspensão em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 130 mM de HCl, 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50µM de CaCl<sub>2</sub>; e centrifugado a 7000 x g por 10 min. Essa etapa foi repetida 1 vez e o precipitado ressuspensão no mesmo tampão e estocado em N<sub>2</sub>. A concentração de proteínas totais foi dosada pelo método de Lowry e cols. (1951).

### **3.4- Síntese do [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP:**

O ATP radioativo foi sintetizado através de uma seqüência de reações enzimáticas, envolvendo algumas enzimas da via glicolítica, descrita por Maia e cols. (1983) e purificado através de cromatografia em microcoluna (0.5 cm x 1 cm) de resina DOWEX - AG-100, (trocadora de ânions). Na coluna, o fosfato radioativo não incorporado, além de cátions indesejáveis, são removidos por lavagens sucessivas com água e 20 mM de HCl. Logo após, é realizada uma eluição específica do ATP marcado com 0,25 M de HCl, e as amostras são neutralizadas, em banho de gelo, pela adição de aproximadamente 10% do volume total do eluído com Mes-Tris 50mM (pH 6,0) , corrigindo-se o pH final com Tris-base até pH 7,0 para posterior uso. Os índices de Pi contaminante observados após o procedimento de marcação do ATP estiveram abaixo de um limite de 1-2 %.

### **3.5- Determinações da Atividade ATPásica:**

A atividade das diversas ATPases tipo P utilizadas nesta tese foi medida pela quantidade de [ $^{32}\text{P}$ ] liberado por hidrólise do [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP. A atividade foi determinada de acordo com Grubmeyer e Penefsky (1981). Com a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, a reação foi iniciada com a adição de 3 mM de Na-ATP em meio contendo 130 mM de NaCl, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM de EGTA, 20 mM de KCl, 10 mM de HEPES/Tris pH 7,4, a 37°C. Com a PMCA a reação foi iniciada com a adição de 1 mM ou 20  $\mu\text{M}$  de Na-ATP em um meio contendo 20 mM de BTP-HCl pH 7,0, 80 mM de KCl, 0,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de EGTA, 1 mM de ouabaína e 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, a 37°C. A atividade ATPásica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi medida em meio contendo 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mg/ml de ghost e na presença ou ausência de 30  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  e 1  $\mu\text{g/ml}$  calmodulina. A reação foi iniciada pela adição de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]Na-ATP 1 mM (0,2-0,3Ci/mol) e interrompida após hidrólise de 5 % - 10 % do ATP com adição de HCl (0,1N) ao meio de reação.

### **3.6- Preparação das vesículas Inside out (IOVs) :**

As vesículas foram preparadas a partir de 1,5 mg de ghost que foi centrifugado a 12500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspense em um tampão contendo 12,5 $\mu\text{l}$  de HEPES 0,2 M pH 7,5 e 10  $\mu\text{l}$  EDTA-Tris 0,2 mM em um volume final de 1 ml. Depois a suspensão foi centrifugada a 12500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente, e o pellet foi incubado a 37°C por 60 minutos.

Feito isto o pellet é passado 7 vezes em uma agulha de insulina e foi ressuspenso em um tampão contendo 300 µl de HEPES 2,5 mM pH 7,5.

### **3.7- Captação e Liberação de cálcio:**

As IOVs (85 µg/ml) foram adicionadas em um meio contendo: Tris-HCl 20 mM a pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaATP 2mM, KCl 100mM, calmodulina 2µg/ml, 100 µM [<sup>45</sup> Ca] CaCl<sub>2</sub> (2.22 x 10<sup>6</sup> com/nmol). A suspensão foi filtrada em filtros Millipore (HAWP 0,45 µm) e lavado 3 vezes com um tampão contendo LaCl<sub>3</sub> 2 mM, MOPS 20mM, KCl 100 mM. Os filtros radiotativos foram contados por cintilação líquida. Um controle com triton X-100 0,01% foi realizado.

### **3.8- Dosagem dos níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, LDH e pH:**

Amostras das bolsas de sangue foram centrifugadas a 5000 x g e o plasma residual contendo citrato como anticoagulante (aproximadamente 10 % do volume total da amostra) foi removido para dosagem dos íons, pH e LDH plasmática. A dosagem dos íons foi feita por espectrometria de chama e do LDH pela técnica de , seguindo os protocolos usados no serviço de análises clínicas do HUCFF. A dosagem de plasma foi realizada manualmente através de potenciômetro de bancada.

### **3.9- Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):**

Para a dosagem de TBARS foram utilizadas 200 µg de ghost de hemácias que ficaram em incubação por 1 hora a 37 °C, em PBS pH 7,4. Em seguida, a peroxidação

lipídica foi medida pela adição de TCA 1% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) e incubação a 95 °C (banho seco) por 30 minutos seguido por resfriamento em gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos em 14000 rpm e o sobrenadante foi retirado para leitura em espectrofotômetro a 532 nm.

### **3.10. Análise de lipídeos**

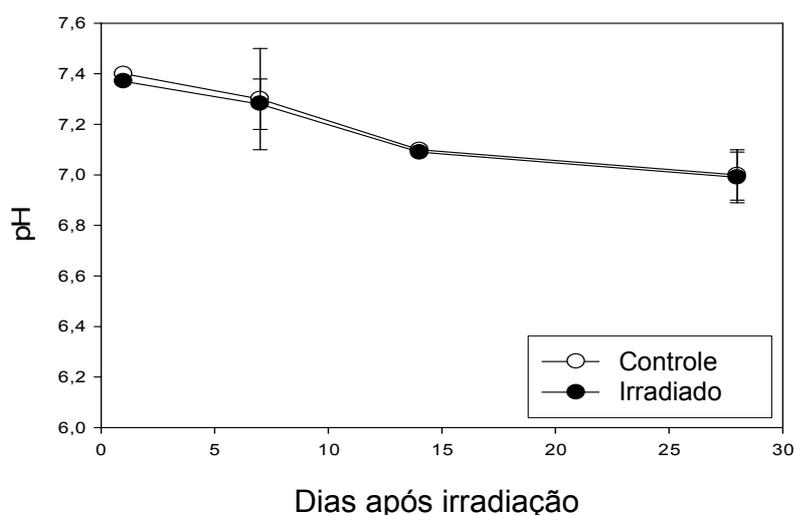
Em uma amostra de 300 µg de proteína dos fantasmas de eritrócitos, aproximadamente, adicionou-se 4,0 mL de uma mistura de metanol:clorofórmio:água (2:1:0,8). Após agitação intermitente durante 1 hora, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000rpm em uma centrífuga clínica, e o sobrenadante contendo os lipídios, separado do precipitado. Ao precipitado foram adicionados outros 4,0 mL da mesma mistura, seguindo-se agitação intermitente por mais 1 hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram combinados e a eles adicionados 1,0 mL de água e 1,0 mL de clorofórmio. Após agitação o material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 3000rpm. A fase inferior (orgânica), contendo os lipídios foi então coletada. Todo o clorofórmio foi evaporado em atmosfera de nitrogênio. Após o tubo esfriar foi adicionado 1 mL de água e 2 mL de hexano, formando 2 fases. A fase superior foi retirada com uma seringa e o hexano foi evaporado em atmosfera de nitrogênio. Os lipídios extraídos foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC) em placa de sílica (60F254, Merck). A fase orgânica foi seca em atmosfera de nitrogênio e ressuspensa em um volume apropriado de clorofórmio. Para a TLC unidimensional de lipídios neutros foi utilizado o seguinte sistema de solventes: hexano:éter etílico:ácido acético 60:40:1 v/v; (Kawooya e Law, 1988). Após a corrida, as placas secas, eram imersas em uma solução de CuSO<sub>4</sub> 10%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8%, e aquecidas a 170 °C por 5 a 10 minutos,

permitindo a visualização quantitativa dos lipídeos presentes. Cada lipídeo foi assinalado comparando-se com a migração de padrões aplicados paralelamente.

## **4- RESULTADOS-**

#### 4.1- Efeito da Irradiação no pH plasmático

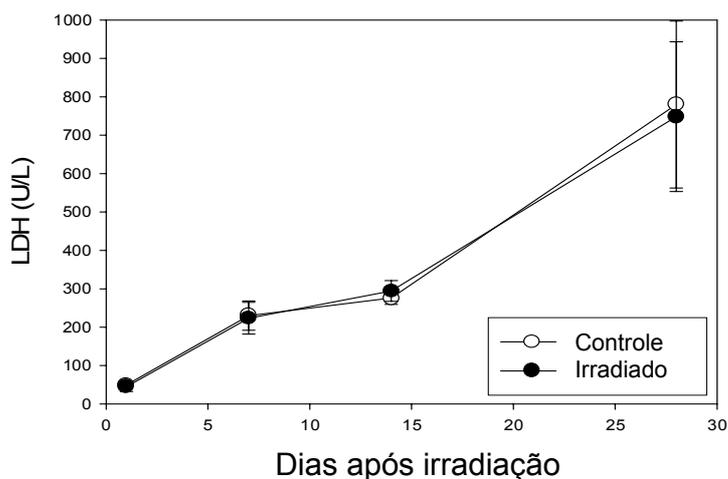
Para o tratamento com a radiação- $\gamma$ , bolsas de sangue foram fracionadas em duas alíquotas idênticas. Uma alíquota foi mantida como controle e outra foi tratada com uma dose de 25 Gy com radiação- $\gamma$ . Após a irradiação, as bolsas foram armazenadas por 1, 7, 14 ou 28 dias. Nestes períodos de tempo, amostras de sangue foram retiradas das bolsas, centrifugadas, e o plasma removido foi utilizado para a dosagem de pH para avaliar a viabilidade dos eritrócitos. A figura 5 mostra os resultados obtidos nos diferentes dias após a irradiação. A radiação gama não afetou diretamente o pH nas amostras irradiadas, como pode ser observado, comparando-se as curvas controle com as irradiadas.



**Figura 5- Medida do pH plasmático de hemoconcentrados estocados em 4°C até 28 dias.** Em cada dia mostrado, a bolsa de sangue foi aberta após homogeneização do conteúdo e centrifugada a 6000 x g por 10 min, em 4°C, e os parâmetros medidos no plasma sobrenadante. Os valores do controle (círculos abertos) e amostras irradiadas (círculos fechados) são mostrados. (n=3  $\pm$  S.E.)

#### **4.2- Efeito da irradiação nos níveis de LDH plasmáticos**

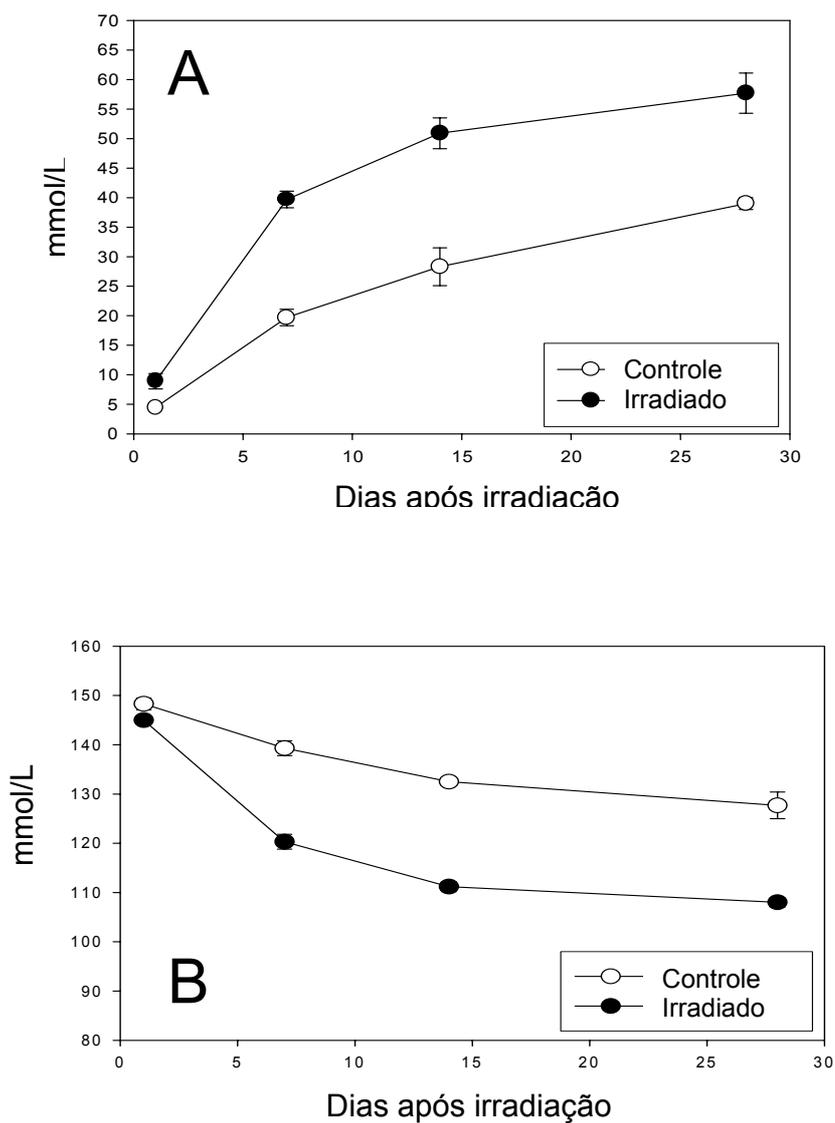
Após a irradiação, as bolsas foram armazenadas por 1, 7, 14 ou 28 dias. Nestes períodos de tempo, amostras de sangue foram retiradas das bolsas, centrifugadas, e o plasma removido foi utilizado para a dosagem de LDH para avaliar a viabilidade dos eritrócitos, uma vez que altos níveis de LDH indicam lise celular, já que o teste de fragilidade osmótica não demonstrou diferença entre os eritrócitos irradiados e controle (dados não mostrados). A figura 6 mostra os resultados obtidos nos diferentes dias após a irradiação. A radiação gama não afetou diretamente a liberação de LDH no plasma nas amostras irradiadas, como pode ser observado, comparando-se as curvas controle com as irradiadas. O aumento nos níveis de LDH plasmático observados ao longo do tempo de armazenamento sugerem um processo natural de lise por envelhecimento celular.



**Figura 6- Medida do LDH plasmático de hemoconcentrados estocados em 4°C até 28 dias.** Em cada dia mostrado, bolsas de sangue foram abertas após homogeneização do conteúdo e os concentrados foram centrifugados a 6000 x g por 10 min, em 4°C, e os parâmetros medidos no plasma sobrenadante. Os valores do controle (círculos abertos) e amostras irradiadas (círculos fechados) são mostrados. (n=3 ± S.E.)

#### 4.3- Efeito da irradiação nos níveis plasmáticos de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>

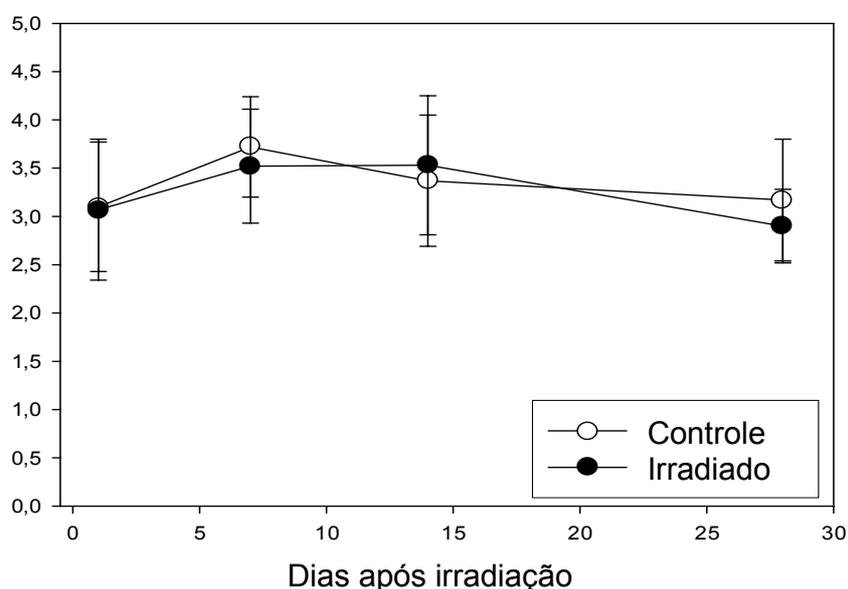
Como descrito anteriormente na literatura (Ramirez e cols, 1987; Brugnara e cols, 1992), a radiação- $\gamma$  provoca um extravasamento de K<sup>+</sup> para o meio extracelular. De acordo com nossos dados, este efeito já pode ser visualizado no primeiro dia de irradiação (10 mM na amostra irradiada vs 5 mM na amostra controle), como mostra a figura 7A. Os níveis de Na<sup>+</sup> plasmático, por sua vez, diminuem na bolsa irradiada, embora não seja observada uma queda tão acentuada quanto ao aumento para os níveis de K<sup>+</sup> (Fig. 7B). Após o tratamento de irradiação ocorre uma queda gradual dos níveis de Na<sup>+</sup> até se alcançar o equilíbrio após 14 dias de irradiação.



**Figura 7.** Efeitos da radiação  $\gamma$  nos níveis plasmáticos de  $K^+$ ,  $Na^+$  de hemoconcentrados estocados em  $4^\circ C$ . Em cada dia mostrado, bolsas de sangue foram abertas após homogeneização do conteúdo, e os concentrados foram centrifugados a  $6000 \times g$  por 10 min, em  $4^\circ C$ , e os parâmetros medidos no plasma sobrenadante. Os valores plasmáticos para  $K^+$  (A),  $Na^+$  (B) representando o controle (círculos aberto) e amostras irradiadas (círculos fechados) são mostrados. ( $n=3 \pm S.E.$ )

#### 4.4- Efeito da irradiação nos níveis plasmáticos de $\text{Ca}^{+2}$

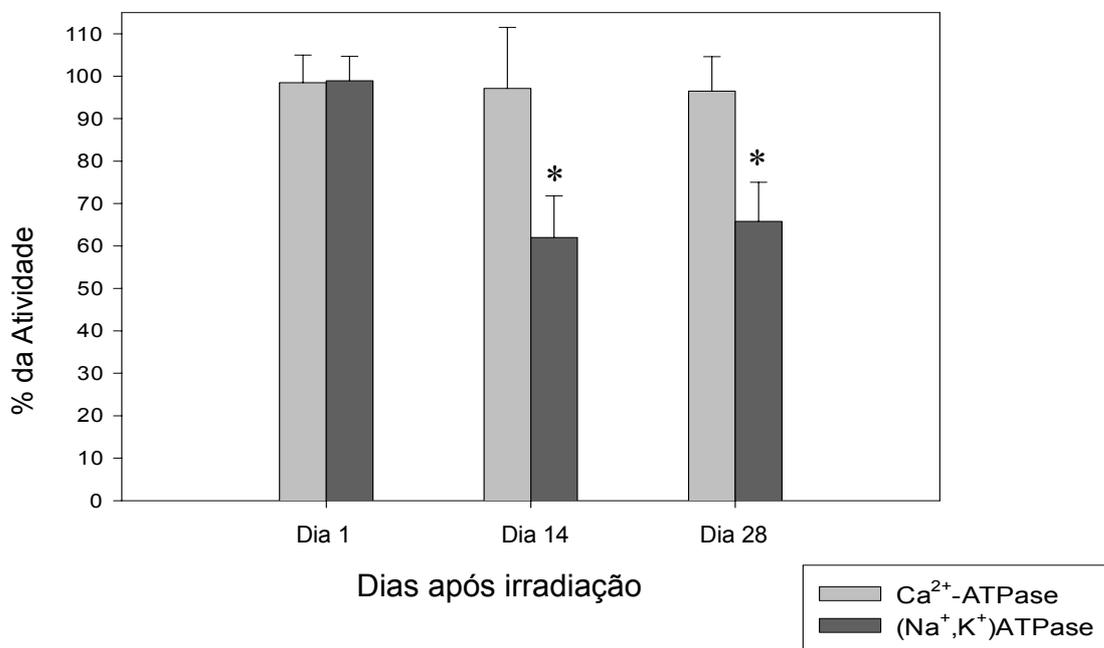
Uma vez que os níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  se apresentaram alterados após a irradiação, seria importante visualizar se os níveis  $\text{Ca}^{+2}$  estariam sendo modulados pelo processo de irradiação. Os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  plasmáticos se mantiveram praticamente constantes e idênticos durante todo o período de armazenamento tanto nas amostras controle quanto nas amostras irradiadas (Figura 8).



**Figura 8. Efeitos da radiação  $\gamma$  nos níveis plasmáticos de  $\text{Ca}^{+2}$  de hemoconcentrados estocados em  $4^{\circ}\text{C}$ .** Em cada dia mostrado, bolsas de sangue foram abertas após homogeneização do conteúdo, e os concentrados foram centrifugados a  $6000 \times \text{g}$  por 10 min, em  $4^{\circ}\text{C}$ , e os parâmetros medidos no plasma sobrenadante. Os valores plasmáticos representando o controle (círculos abertos) e amostras irradiadas (círculos fechados) são mostrados. ( $n=3 \pm \text{S.E.}$ )

#### **4.5- Efeito da irradiação n atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e Ca<sup>2+</sup>-ATPase**

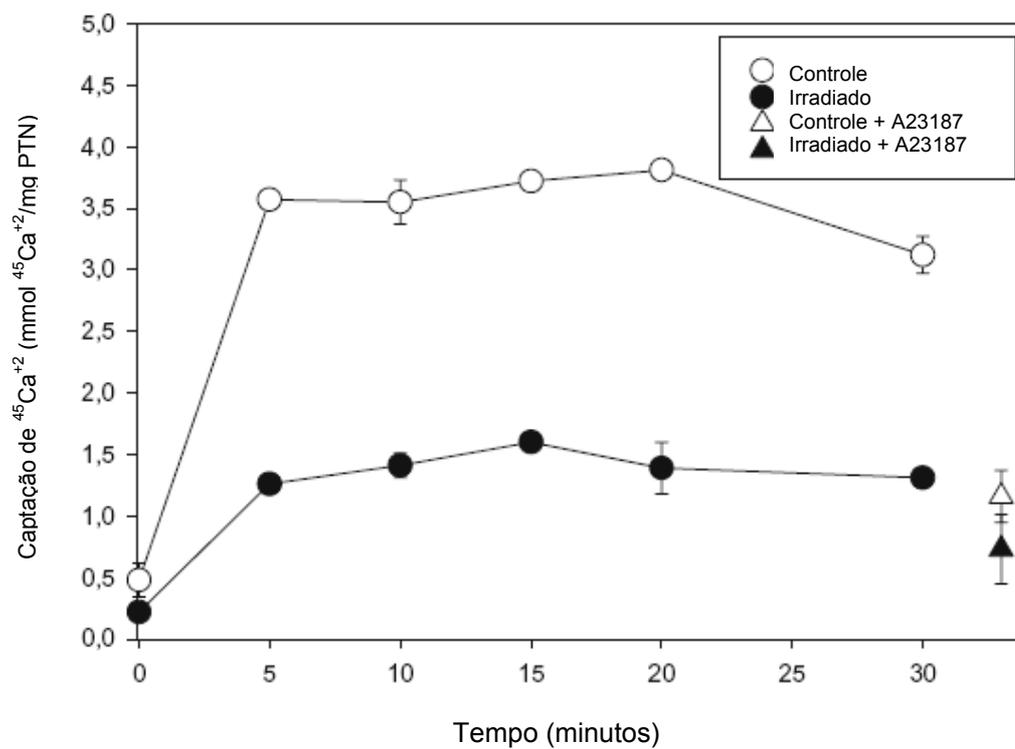
Para análise da atividade das ATPases de membrana realizamos uma preparação de membranas plasmáticas dos eritrócitos livres de citoplasma (Ghosts), das bolsas controle e irradiadas, nos dias 1, 14 e 28 após irradiação. Com essas preparações de membrana, realizamos ensaios para medida da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e Ca<sup>2+</sup>-ATPase, de acordo com o materiais e métodos. Não foi observada diferença na atividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase entre amostra controle e a irradiada após o tratamento com radiação gama em todo o período analisado (figura 9). Além disso, durante o período de estocagem das bolsas de concentrados de hemácias, não houve alteração global da atividade enzimática, corroborando os resultados obtidos em relação aos níveis de Ca<sup>2+</sup> plasmáticos. Entretanto, a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi inibida em até 40% (p<0.05), 14 dias após irradiação, mantendo-se este nível de inibição constante até 28 dias após irradiação.



**Figura 9- Atividades Ca<sup>2+</sup>-ATPásica e Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPásica.** As atividades ATPásicas de ambas as enzimas foram medidas usando ghosts preparados em cada dia testado pós-irradiação (1, 14 e 28 dias). Os dados foram apresentados como % da atividade do controle, que variou entre 557,9 – 720,8 nmoles.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para a Ca<sup>2+</sup>-ATPase (cinza claro) e 192,6 – 248,9 nmoles.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (cinza escuro). Os dados representam médias ± S.E. (n=3). Asteriscos representam que os resultados são significativamente diferente do controle, e foram avaliados pelo teste de t de Student (p<0,05).

#### 4.6- Efeito da irradiação na captação e a liberação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

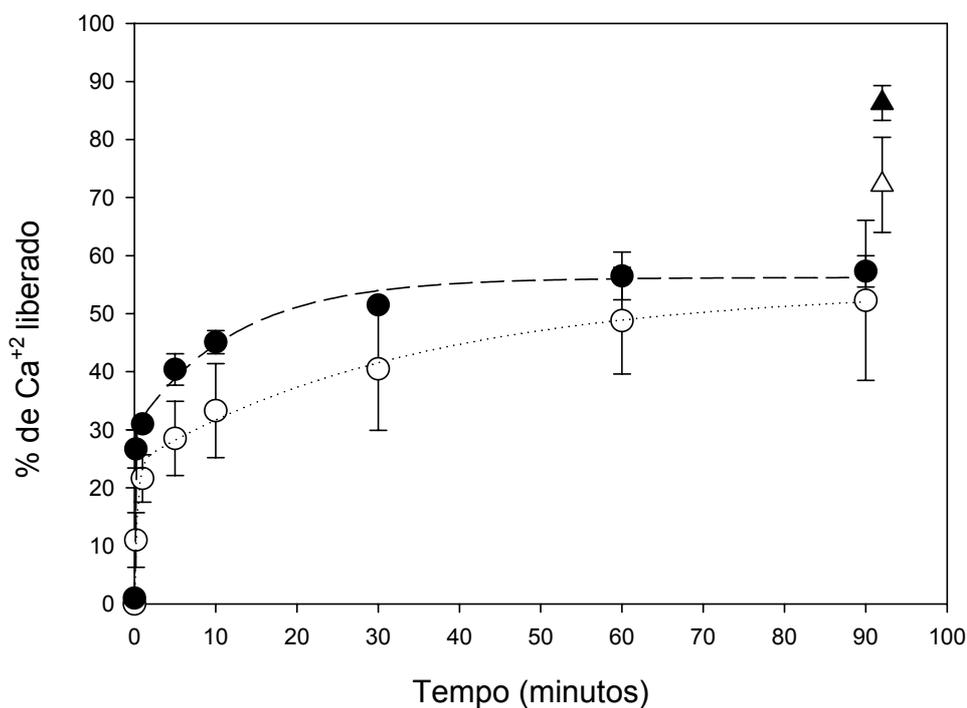
Descrições prévias sugerem que a irradiação pode provocar danos aos fosfolípidos da membrana plasmática através da geração de espécies reativas de oxigênio (Singh e cols, 1982; Suzuki e cols, 2000), por causar peroxidação lipídica. Os danos provocados na membrana poderiam ser os responsáveis pela liberação do  $\text{K}^+$  verificada após a irradiação de hemocomponentes. Para verificarmos se a permeabilidade da membrana a íons está alterada pelo tratamento com a radiação- $\gamma$  realizamos experimentos de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em vesículas inside-out (IOV) de membrana plasmática. Estas vesículas são preparadas a partir dos ghosts, fazendo com que os fragmentos de membrana sejam resselados ao avesso. Em vesículas “inside-out”, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA) bombeia ativamente o  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  para o interior da vesícula até o sistema chegar a um estado estacionário, onde é alcançado um equilíbrio químico entre a entrada e a saída de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Ao avaliarmos os níveis de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em IOV preparadas a partir de ghosts controle ou tratado com radiação- $\gamma$  (armazenados por 28 dias) (Figura 10), pudemos notar que nas amostras tratadas com radiação- $\gamma$ , o nível máximo de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (em torno de 1,25 nmol/mg de proteína, que corresponde ao estado estacionário) é muito menor que o nível máximo de captação da amostra controle (em torno de 3,5 nmol/mg de proteína).



**Figura 10- Captação de  $\text{Ca}^{+2}$  pelas IOV's preparados de ghosts de sangue controle e irradiado.** Os ghosts foram preparados de sangue estocado por 28 dias em  $4^{\circ}\text{C}$  e foram preparadas IOV's utilizadas para captação de  $\text{Ca}^{+2}$ . Os resultados representam média  $\pm$  S.E. (n=3).

Este resultado poderia ser explicado por duas hipóteses: 1) O nível máximo de captação na amostra irradiada é menor que na amostra controle porque a bomba de cálcio (PMCA) estaria transportando o cálcio para dentro da vesícula com uma velocidade menor, e a membrana plasmática estaria intacta. 2) A bomba de cálcio estaria funcionando normalmente, captando cálcio com a mesma velocidade na amostra controle.

A Figura 11 mostra a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  ao passar do tempo induzida por EGTA observada em IOV's obtidos de hemoconcentrados controle (círculos aberto) e irradiados (círculos fechados). Claramente é visto que a taxa inicial de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  é maior nas amostras irradiadas que no controle. Apesar de não ser possível determinar se o aumento da taxa de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  é através da  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase ou pela membrana lipídica, é óbvio que a permeabilidade passiva está aumentada nas amostras irradiadas e na irradiada, porém a membrana plasmática na amostra irradiada teria sido danificada pelo tratamento com a radiação- $\gamma$ , ficando muito mais permeável ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ .

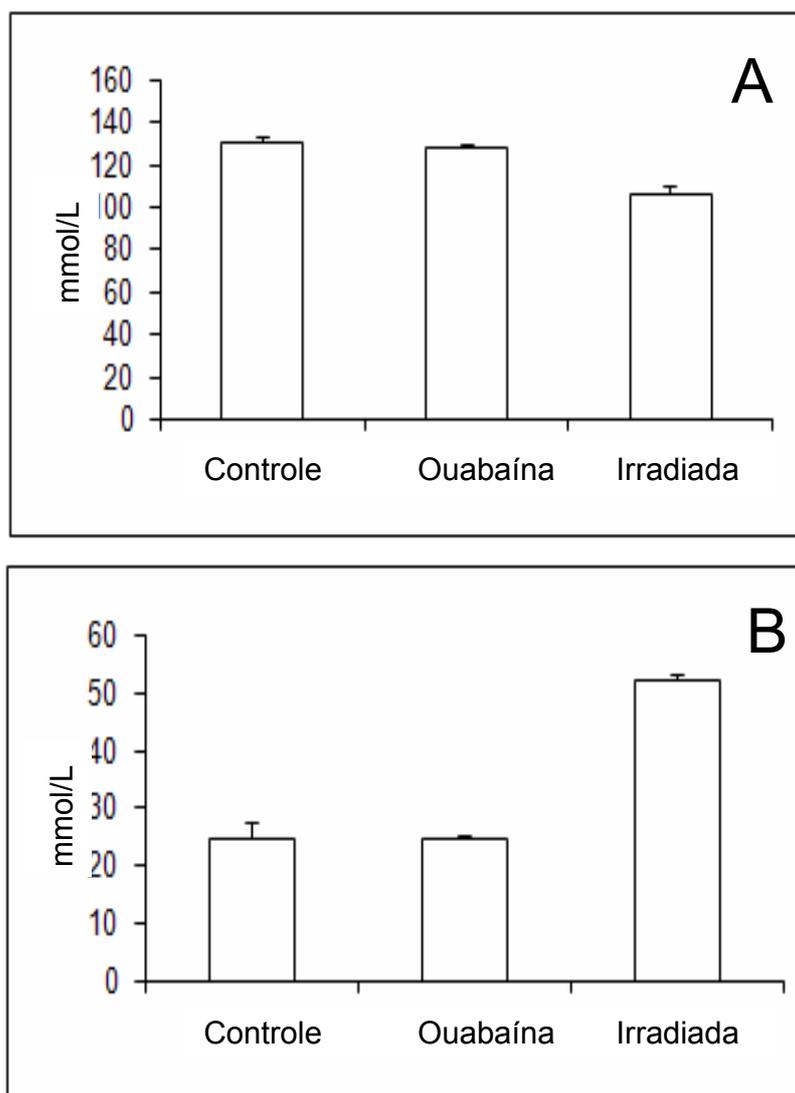


**Figura 11- Liberação passiva de Ca<sup>+2</sup> de IOV's.** Após carregamento ativo com [<sup>45</sup>Ca]Ca<sup>+2</sup> por 60 min, as IOV's foram coletadas e diluídas 10 vezes em um meio de efluxo com 1mM EGTA. Como os valores de uptake são diferentes, estes são expressos como liberação fracionada. Ambas cinéticas de liberação controle (círculos abertos) e irradiada (círculos fechados) foram adicionadas no gráfico com dupla equação exponencial de decaimento. Controle:  $k_1=2,6035$ ,  $k_2=0,0286$ ,  $a_1=24,1715$ ,  $a_2=30,1318$  (linha pontilhada); irradiada:  $k_1=10,3599$ ,  $k_2=0,0817$ ,  $a_1=30,0601$ ,  $a_2=26,1569$  (linha tracejada). Os triângulos representam a liberação de Ca<sup>+2</sup> após adição de 5  $\mu$ M de ionóforo de Ca<sup>+2</sup> A23187. (n=4  $\pm$  S.E.)

O nosso conjunto de dados mostra que a atividade ATPásica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase não é alterada pelo tratamento com a radiação- $\gamma$ . A não ser que esteja ocorrendo um desacoplamento entre hidrólise de ATP e transporte de cálcio, é de se esperar que a enzima esteja com a mesma velocidade de captação de cálcio em ambas as amostras. Este dado, em conjunto com a informação de que a irradiação causa maior liberação passiva de  $\text{Ca}^{+2}$  nas amostras irradiadas, e que causa danos permanentes à membrana plasmática, corroboram para que a segunda hipótese analisada seja a mais aceitável, ao invés da primeira.

#### **4.7- O tratamento com ouabaína não provoca aumento de potássio plasmático**

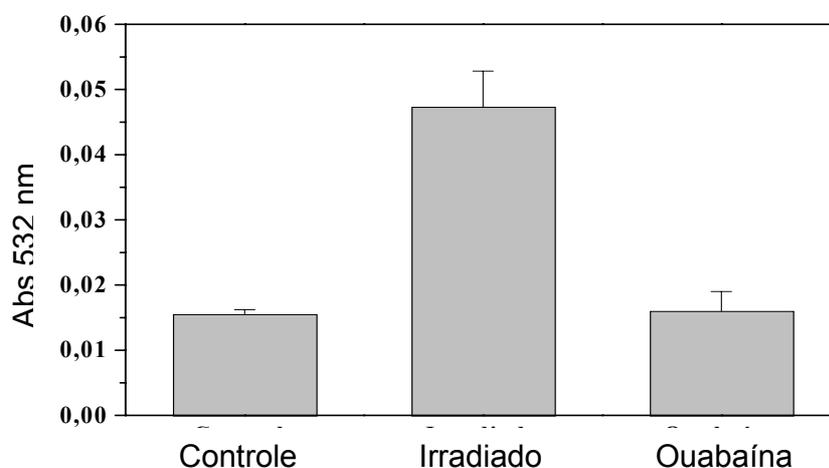
Para verificar o real envolvimento da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no aumento do potássio plasmático, as bolsas de sangue foram separadas em 3 unidades: 1 controle, 1 irradiada e 1 tratada com 200  $\mu\text{M}$  de ouabaína e estocadas por 14 dias em 4°C. Como mostrado na Figura 12, não houve mudança nos níveis de potássio e sódio da amostra tratada com ouabaína, ao contrário do que é observado com a amostra irradiada. Isto reforça o pensamento sobre a permeabilidade da membrana aumentada pela irradiação ser a responsável pelo aumento do potássio plasmático.



**Figura 12. Efeito do tratamento com ouabaína nos níveis plasmáticos de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> de hemoconcentrados estocados em 4°C.** Após 14 dias de estocagem, as bolsas de sangue foram abertas após 30 minutos em temperatura ambiente e homogeneização do conteúdo, e os concentrados foram centrifugados a 6000 x g por 10 min, em 4°C, e os parâmetros medidos no plasma sobrenadante. Os valores plasmáticos para Na<sup>+</sup> (A) e K<sup>+</sup> (B), representando o controle (círculos aberto) e amostras. . Os resultados representam média ± S.E. (n=3).

#### 4.8- Efeito da irradiação nos níveis de peroxidação lipídica da membrana plasmática

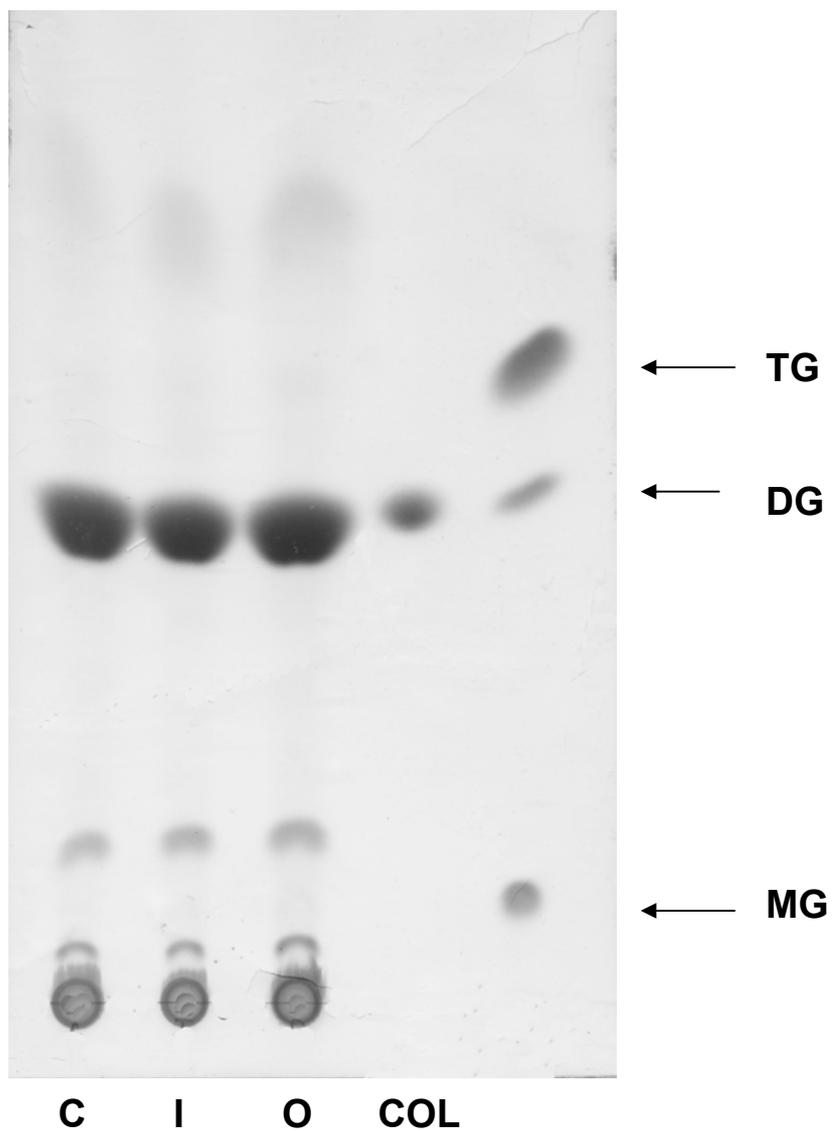
Para verificarmos o possível dano na membrana plasmática dos eritrócitos irradiados, realizamos ensaios de TBARS. Caso a membrana fosse prejudicada pela irradiação os níveis de TBARS estariam aumentados. As bolsas de sangue foram separadas em 3 amostras: controle, tratamento com ouabaína 200  $\mu\text{M}$  e irradiada, e após 14 dias de estocagem foi feita a medição para TBARS dos respectivos ghosts. Como visto na Figura 13 os níveis do controle e do tratamento com ouabaína estão equivalentes, mas ocorreu um aumento significativo de formação de TBARS na amostra irradiada, demonstrando que o processo de irradiação provocou peroxidação lipídica na membrana plasmática dos eritrócitos irradiados.



**Figura 13. Efeito da irradiação na peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos de hemoconcentrados estocados em 4°C.** Os ghosts foram preparados de sangue estocado por 14 dias em 4°C e foi efetuada a dosagem de TBARS para as amostras controle, irradiada e tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de ouabaína. Os resultados representam média  $\pm$  S.E. (n=3).

#### **4.9- Os níveis lipídicos da membrana plasmática de eritrócitos após irradiação**

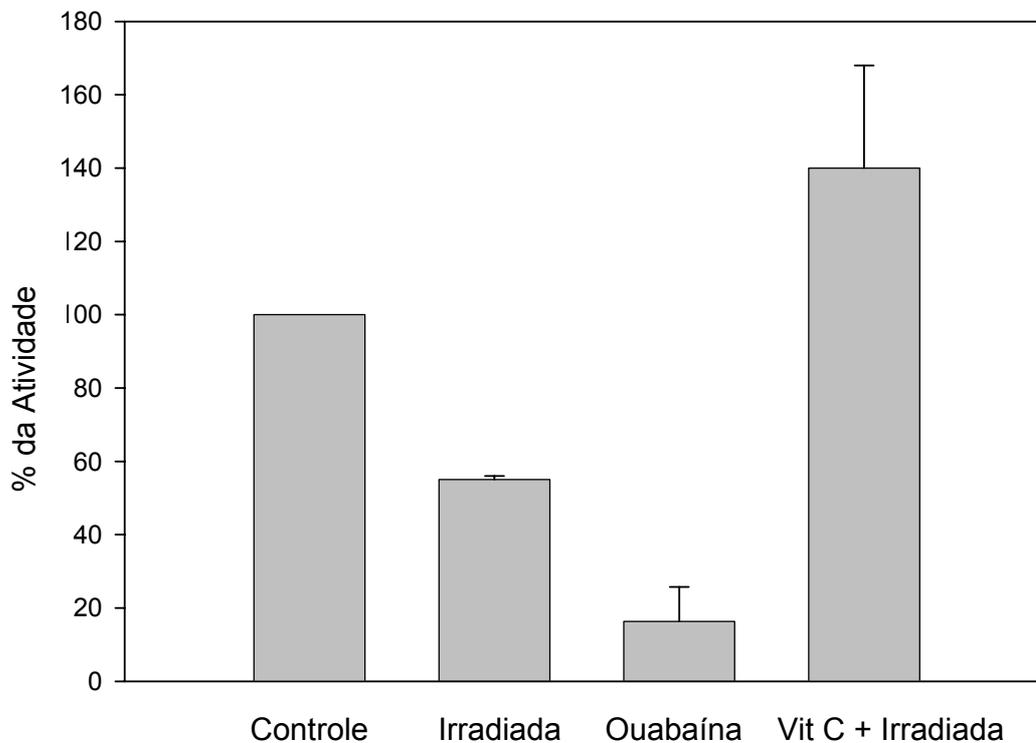
Uma vez que o processo de irradiação provocou peroxidação lipídica na membrana plasmática dos eritrócitos irradiados, decidimos realizar uma análise mais completa sobre o perfil lipídico da membrana após a irradiação. Para tal experimento, as bolsas de sangue foram separadas em 3 amostras: controle, tratamento com ouabaína 200  $\mu\text{M}$  e irradiada, estocadas por 14 dias e realizada a preparação de ghosts destas amostras. Com estes fantasmas de eritrócitos foi realizada uma cromatografia de camada fina (TLC) para definição do perfil lipídico de acordo com os padrões aplicados, conforme mostrado na Figura 14. Não houve mudança no perfil lipídico após a irradiação e tratamento com a ouabaína, mostrando que a constituição lipídica total permanece inalterada após a irradiação.



**Figura 14. Os níveis lipídicos da membrana de eritrócitos não modificam após a irradiação.** As bolsas de sangue foram separadas em 3 unidades: controle, irradiada e tratada com 200  $\mu$ M com ouabaína e após 14 dias de estocagem em 4°C foram utilizadas para realização de ghost. Estes ghosts foram utilizados para a extração lipídica e realização da cromatografia de camada fina. Os padrões utilizados foram: COL – Colesterol, MG – monoacilglicerol, DG – Diacilglicerol, TG – Triacilglicerol.

#### **4.10- Tratamento com Vitamina C preserva a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

Como nossos experimentos apontaram para o envolvimento da formação de radicais livres após o processo de irradiação, nós testamos se a utilização de um antioxidante seria capaz de proteger a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Utilizamos para este experimento a Vitamina C, pois além de possuir um bom efeito antioxidante, seria uma substância que poderia ser utilizada sem riscos numa possível transfusão sanguínea. As bolsas de sangue foram separadas em 4 amostras: controle, irradiada, tratada com 200 µM de ouabaína e irradiada depois de 8h de tratamento com 250 µM de vitamina C e foram estocadas por 14 dias a 4°C. O tratamento com ouabaína inibiu a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em 80% (figura 15), mostrando que o tratamento com a ouabaína foi eficiente na inibição da enzima. Além disso, o tratamento com vitamina C mostrou-se eficaz na proteção da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase do processo de irradiação, mostrando níveis de atividade comparáveis com a amostra controle.



**Figura 15. O tratamento com vitamina C protege a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase.** As amostras de sangue foram separadas em: controle, irradiada, tratada com 250  $\mu\text{M}$  de ouabaína e irradiada após 8h de tratamento com 250  $\mu\text{M}$  de vitamina C. Após os tratamentos as amostras foram estocadas em 4°C por 14 dias e foram coletadas para realização de ghosts e posterior análise da atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase. Os resultados representam média  $\pm$  S.E. (n=3).

## **5- DISCUSSÃO-**

A estocagem de hemocomponentes irradiados é um processo esperado para a organização dos serviços de hemoterapia de alta complexidade. O período máximo de estocagem de hemoconcentrados irradiados de acordo com a legislação brasileira é de 28 dias após a irradiação, sendo preservada a dada limite de validade do componente. No banco de sangue do HUCFF, o uso de hemocomponentes irradiados aumentou progressivamente nas últimas décadas como consequência de dois fatores principais: envelhecimento da população, com o aumento da incidência do câncer, e o crescimento do número de transplantes de órgãos. Estes fatores determinaram a implementação de fornecimento de hemocomponentes especiais e procedimentos para pacientes imunodeficientes. Além disso, na prática clínica o aumento do potássio plasmático pela irradiação pode trazer problemas clínicos diversos (Carvalho e cols, 1999; Buntain e cols, 1999; Baz e cols, 2002), tornando a utilização de hemocomponentes irradiados problemática para recém-nascidos e pacientes com doença renal crônica (Hall e cols, 1993). Portanto, determinar o verdadeiro intervalo de estocagem de hemocomponentes irradiados para que eles permaneçam com suas propriedades com nível apropriado para utilização clínica e nível de segurança tornou-se de grande importância.

A radiação  $\gamma$  possui efeitos diretos e indiretos em sistemas biológicos, Através da indução de dano no DNA, a radiação interrompe a replicação, o crescimento, e a sobrevivência de células T. Apesar dos eritrócitos humanos serem capazes de sustentar uma alta atividade metabólica, eles não possuem material genético, e portanto neste aspecto eles não são afetados pela radiação. Esta diferença de sensibilidade a irradiação entre os eritrócitos e os linfócitos T demonstrou ser interessante para a inativação das células T nos

hemocomponentes ( $1,0-2,0 \times 10^9$  células por unidade). Foi estabelecido que a dose de 25 Gy de radiação  $\gamma$  é efetiva para a prevenção da replicação dos linfócitos T (Stark, 2005).

Nós não notamos mudanças significativas nos níveis de LDH (figura 6) e nem do pH (figura 5) plasmático entre as amostras de hemoconcentrados irradiados e não-irradiados. Estes fatores são imperativos para a determinação da viabilidade celular em amostras sanguíneas irradiadas e estão de acordo com os estudos realizados em plaquetas irradiadas (Holme, 2005).

Conforme demonstrado na Figura 10, os níveis do  $\text{Ca}^{+2}$  plasmático não foram afetados pela irradiação. Por outro lado, ambos os valores do potássio e o sódio plasmático (figura 7) foram profundamente afetados, muito além do que apenas o processo de estocagem provoca (Figura 7 controle). O rápido aumento dos níveis de potássio plasmático, com a diminuição proporcional do sódio até atingir um equilíbrio já foi descrita anteriormente (Pelzynski e cols, 1994; Brugnara & Churchill, 1992). Desde que o potássio plasmático praticamente dobra no primeiro dia de estocagem nós especulamos que uma possível inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pudesse estar envolvida neste processo. Nós encontramos que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi inibida em 40% no décimo quarto dia após irradiação mantendo-se até o vigésimo oitavo dia, mas não no primeiro dia pós-irradiação (figura 9). Nossos resultados estão em total contraste com aqueles reportados por Brugnara e cols (1992), que mostraram que não havia variação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase com a mesma dose de radiação (25 Gy) que nós usamos. Estes autores utilizaram a taxa de fração do efluxo do sódio ouabaina-sensível dos eritrócitos como um ensaio indireto da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. É relevante enfatizar que em nossos experimentos, a atividade

ATPásica foi medida diretamente de membranas de fantasmas de eritrócitos. Além disso, nossos resultados foram obtidos com ensaios de alta sensibilidade utilizando ATP radioativo e portanto não são afetados por variáveis que metodologias indiretas possuem. Esta pode ser a razão pela qual a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi observada após 14 dias de irradiação em nossos experimentos.

Em nossas medições, a concentração plasmática de potássio dobrou 24h após irradiação, apesar de não haver alteração significativa da inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase na mesma escala de tempo. Portanto, mesmo que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase esteja envolvida na perda da homeostase iônica, certamente não é a única entidade envolvida no processo. Além disso, como os hemoconcentrados são estocados a 4°C, provavelmente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase tenha um efeito limitado na manutenção da homeostase celular durante a estocagem. Esta inibição pode ser um importante fator imediatamente antes e depois a transfusão, uma vez que na temperatura corporal a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase estará ativa e 40% de inibição pode provocar efeitos no formato celular, volume e viabilidade. Morroff e cols (1999) usaram quatro protocolos diferentes de irradiação em seu estudo, e também reportaram mudanças dos níveis de potássio plasmático após a irradiação de hemoconcentrados. Estes autores concluíram que longo tempo de estocagem após a irradiação reduz a viabilidade celular e recuperação pós-transfusão. Em nosso trabalho, nós descrevemos pela primeira vez uma relação de causa e efeito, através do dano de uma proteína envolvida no transporte iônico e alteração da fisiologia dos eritrócitos após a irradiação.

O efeito da irradiação na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é aparentemente aumentado com longo período de estocagem, em contraste com o aumento do potássio plasmático que

ocorre rapidamente (o dobro dos níveis de potássio com o primeiro dia de estocagem). Este curto tempo para a liberação do potássio pelos eritrócitos pode estar associado com a abertura de canais de potássio, uma vez que a diminuição do sódio, que apresenta um curso de tempo mais devagar, paralelamente com a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Isto é provavelmente devido aos efeitos oxidativos da irradiação, os quais possuem relatos para a geração de substâncias reativas de oxigênio (ROS) pela radiação  $\gamma$  (Suzuki e cols, 2000).

Para mimetizarmos o efeito da inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, um tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de ouabaína foi realizado. Com a inibição permanente da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase por 14 dias esperávamos observar o aumento do potássio extracelular. Surpreendentemente, não houve mudança nos níveis do potássio e de sódio após o tratamento com ouabaína (figura 12). Estes dados implicam que a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não é primordial para a liberação de potássio observado após a irradiação de hemoconcentrados. É importante ressaltar que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi inibida em 80% pelo tratamento com a ouabaína (figura 15), demonstrando que outros mecanismos estão envolvidos com o transporte dos íons sódio e potássio na hemácia.

Apesar de não ser observada a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase imediatamente após a irradiação, as cascatas de peroxidação lipídica são conhecidas por gerar intermediários químicos que podem provocar dano em membrana e proteínas de membranas (Weiskopf e cols, 2005). Isto poderia levar a inibição de 40% da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase observada após 14 dias (figura 9). Este dano oxidativo de longo tempo poderia também ser consequência da depleção da glutathiona reduzida e moléculas antioxidantes, como resultado da estocagem em baixa temperatura onde os níveis de ATP e 2,3-DPG também são

depletados (Moroff e cols, 1999). Foi observada níveis aumentados de TBARS nas amostras após 14 dias de irradiação (figura 13) demonstrando efeito da irradiação no processo de peroxidação lipídica. Na tentativa de otimizar a estocagem de hemocomponentes irradiados, diferentes misturas preservativas com adição de osmolitos, nucleotídeos, anti-oxidantes, e diferentes polímeros e plásticos utilizados para a fabricação das bolsas estão atualmente em estudo por diferentes grupos, com resultados animadores para a prevenção de danos na membrana (Moroff e cols, 1999; Cicha e cols, 2000; Valeri e cols, 2001).

Seria esperado que a atividade da PMCA pudesse ser inibida pela radiação  $\gamma$ . Apesar da inibição da SERCA (Castilho e cols, 1996) e PMCA (Rohn e cols, 1996) por ROS estar descrito na literatura, nenhuma inibição da PMCA das amostras irradiadas foi observado em nossos experimentos (Figura 9). Isto pode ser devido a diferença inerente de suscetibilidade a peroxidação lipídica ou oxidação direta, entre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a PMCA. Há um relato da resposta de ATPases ao 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (HNE) na qual a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi muito mais afetada que a PMCA pela acumulação do HNE (Leinder e cols, 1992). Consistente com o fato da PMCA não ser inibida, não fomos incapazes de detectar qualquer mudança significativa nos níveis de cálcio plasmáticos entre as amostras irradiadas e controle (figura 8). Como medimos os níveis de cálcio plasmáticos, é pouco provável que a concentração intracelular de cálcio, que é muito pequena (10-100 nM) pudesse interferir com os níveis plasmáticos que possuem um maior grau de magnitude (na faixa de mM). Entretanto, uma mudança nos níveis intracelulares de cálcio

poderia levar a abertura de canais de potássio, induzindo a liberação de potássio para o meio extracelular (Sharifi e cols, 2000).

Como a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aparenta não ser o fator determinante na liberação celular de potássio, é plausível que devido ao dano oxidativo a membrana se torne mais permeável a íons, mas não o suficiente para um extravasamento de proteínas. Para verificarmos isso, a capacidade da captação de cálcio foi avaliada por IOV's e também a liberação passiva foram avaliadas. Como mostrado em nossos dados, a irradiação inibiu a captação máxima (figura 10) e aumenta a taxa de liberação passiva de cálcio (figura 11). Isto é altamente sugestivo que danos de membrana devem ocorrer sobre irradiação, provocando a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  IOV's e possivelmente outros íons metálicos, portanto permitindo a liberação do potássio. É provável que devido a oxidação da membrana os IOV's não consigam se formar eficientemente, resultando em uma alta permeabilidade, mas não eliminaria o fato dos lipídios da membrana sofrerem danos após a irradiação, como demonstrado previamente na figura 13.

Alguns estudos publicados com soluções antioxidantes adicionadas em hemoconcentrados antes da irradiação mostraram resultados promissores na prevenção do aumento do potássio plasmático (Hirayama e cols, 2005). A vitamina C é uma conhecida substância antioxidante e devido a sua solubilidade, poderia ser utilizada como aditivo protetor em bolsas de sangue. Como mostrado na figura 15, a vitamina C foi capaz de prevenir o dano causado na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, e sua atividade permaneceu inalterada após a irradiação em presença do antioxidante. Esta é outra evidência para demonstrar o envolvimento de ROS na indução de dano na membrana celular pela irradiação.

Uma vez que o envolvimento da peroxidação lipídica parece estar envolvida diretamente com os efeitos na homeostasia iônica causada pela irradiação, decidimos visualizar o perfil lipídico da membrana dos eritrócitos irradiados. Conforme mostrado na figura 14, não houve mudança no perfil lipídico total da membrana após a irradiação. Entretanto, não foi verificada mudanças no perfil lipídico de microdomínios da membrana dos eritrócitos, como os rafts de membrana, sendo necessários mais estudos para a elucidação do efeito da irradiação nos lipídios eritrócitários.

Podemos concluir que os hemoconcentrados irradiados são suscetíveis a danos que são proporcionais ao período de estocagem. Portanto, seria conveniente a irradiação de hemoconcentrados apenas no período de uso. Entretanto, esta realidade não seria possível para o gerenciamento dos serviços de hemoterapia, especialmente para a cidade do Rio de Janeiro, onde existe apenas 1 irradiador para todos os serviços existentes. Para resolver este problema, nós recomendamos que os hemoconcentrados irradiados devam ser, sempre que possível, serem utilizados no máximo com 14 dias de estocagem após a irradiação, desde que os níveis da membrana celular e integridade protéica permanece aparentemente adequadas. Uma outra possibilidade seria a adição prévia de agentes antioxidantes, como manitol, vitamina E e ascorbato para a prevenção de progressivo dano na membrana e perda de função celular.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-**

ALBERS, R.W. (1975). The enzymes of biological membranes. (Martonosi, A. ed.), pp. 283-301, Plenum Press, New York.

ANDERSON, K.C. & WEINSTEIN, H.J. (1990) Transfusion-associated graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **323**, 315–321.

ANDERSON, K.C., GOODNOUGH, L.T., SAYERS, M., PISCIOTTO, P.T., KURTZ, S.R., LANE, T.A., ANDERSON, C.S. & SILBERSTEIN, L.E. (1991) Variation in blood component irradiation practice: implications for prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* **77**, 2096–2102.

ANDERSON, R.G. (1993) Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol.* **3**, 69-72.

AOKI, Y., NAKAMURA, H. & SAKAKIBARA, Y. (1984) [Probable graft-versus-host reaction following massive blood transfusion in an aged patient with postoperative aortic aneurysm: a case report]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* **73**, 1209–1216.

APELL, H.J. (2004) How do P-type ATPases transport ions? *Bioelectrochemistry* **63**: 149-56.

ASAI, T., INABA, S., OHTO, H., OSADA, K., SUZUKI, G., TAKAHASHI, K., TADOKORO, K. & MINAMI, M. (2000) Guidelines for irradiation of blood and blood components to prevent post-transfusion graft-versus-host disease in Japan. *Transfusion Medicine* **10**, 312–320.

ASKARI, A., HUANG, W.H. (1981) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: (Ca<sup>2+</sup> ouabain)-dependent phosphorylation by Pi. *FEBS Lett.* **126**, 215-7.

BAZ, E., KANAZI, G., MAHFOUZ, A., OBEID, M. (2002) An unusual case of hyperkalaemia-induced cardiac arrest in a paediatric patient during transfusion of a “fresh” 6-day old blood unit. *Transfusion Med.* **12**, 383-6.

BERGER, R.S. & DIXON, S.L. (1989) Fulminant transfusion-associated graft-versus-host disease in a premature infant. *J. Am. Acad. Dermatol.* **20**, 945–950.

BILLINGHAM, R.E. (1966) *The Biology of Graft-versus-Host Reactions*, pp. 21–78. Academic Press, New York.

BLANCO, G. & MERCER, R.W., Isoenzymes of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am.J. Physiol.* **275**: F633-650. (1998). - *Invited review*

BLAUSTEIN MP (1988) sodium/calcium exchange and control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12(supl5)** : s56-s68.

BLAUSTEIN MP. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* **264**: c1367-87.

BONTING, S. L. (1970) Sodium-potassium activated adenosine-triphosphatase and cation transport. in *Membranes and Ion Transport* (E. Bittar ed.), Vol.1, pp.286-392, Wiley-interscience, New York.

BRUBAKER, D.B. (1986) Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Human Pathol.* **17**, 1085–1088.

BRUGNARA, C., CHURCHILL, W.H. (1992) Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion* **32**, 246-52.

BUNTAIN, S., PABARI, M. (1999) Massive transfusion and hyperkalaemic cardiac arrest in craniofacial surgery in a child. *Anaesth. Intensive Care* **27**, 530-533.

BURNS, L.J., WESTBERG, M.W., BURNS, C.P., KLASSEN, L.W., GOEKEN, N.E., RAY, T.L. & MACFARLANE, D.E. (1984) Acute graft-versus-host disease resulting from normal donor blood transfusions. *Acta Haematol.* **71**, 270–276.

BUTTON, L.N., DEWOLF, W.C., NEWBURGER, P.E., JACOBSON, M.S. & KEVY, S.V. (1981) The effects of irradiation on blood components. *Transfusion* **21**, 419–426.

CARAFOLI E, BRINI M. (2000) Calcium pumps: structural basis and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 152-61.

CARAFOLI E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev. Biochem.* **56**: 395-433.

CARAFOLI E. (1992) The plasma membrane calcium pump: structure, function, regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **17**: 266-7.

CARAFOLI, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Ann. Rev. PHysiol.* **53**: 531-547.

CARAFOLI, E. (1994) Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase, 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* **8**: 933-1002.

CARVALHO, B., QUINEY, N. (1999) "Near miss" hyperkalaemic cardiac arrest associated with rapid blood transfusion. *Anaesthesia* **54**,1094-1096.

CASTILHO, R.F., CARVALHO-ALVES, P.C., VERCESI, A.E., FERREIRA, S.T. (1996) Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump induced by Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbate is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. *Mol. Cell. Biochem.* **159**, 105-14.

CHANG, H., VORALIA, M., BALI, M., SHER, G.D. & BRANCH, D.R. (2000) Irreversible loss of donor blood leucocyte activation may explain a paucity of transfusion-associated graft-versus-host disease from stored blood. *Br. J. Haematol.* **111**, 146-156.

CHOW, D. C. & FORTE, J. G. (1995) Functional significance of the  $\beta$ -subunit for heterodimeric P-type ATPases. *Journal of Exp. Biol.* **198**: 1-17.

CICHA, I., SUZUKI, Y., TATEISHI, N., SHIBA, M., MUARAOKA, M., TADOKORO, K., MAEDA, N. (2000) Gamma-ray irradiated red blood cells store in mannitol-adenine-

phosphate medium: Rheological evaluation and susceptibility to oxidative damage. *Vox Sang.* **79**, 75-82.

DAVEY, R.J., MCCOY, N.C., YU, M., SULLIVAN, J.A., SPIEGEL, D.M. & LEITMAN, S.F. (1992) The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival. *Transfusion* **32**, 525–528.

DE MEIS, L. (1981) The sarcoplasmic reticulum. In: Bittar E, editor. Transport in the life Sciences, vol 2 New York: Wiley. 24-28.

DECOSTE, S.D., BOUDREAUX, C. & DOVER, J.S. (1990) Transfusion-associated graft-vs-host disease in patients with malignancies. Report of two cases and review of the literature. *Arch. of Dermatol.* **126**, 1324–1329.

DINSMORE, R.E., STRAUS, D.J., POLLACK, M.S., WOODRUFF, J.M., GARRETT, T.J., YOUNG, C.W., CLARKSON, B.D. & DUPONT, B. (1980) Fatal graft-versus-host disease following blood transfusion in Hodgkin's disease documented by HLA typing. *Blood* **55**, 831–834.

DONNET C, ARYSTARKHOVA E, SWEADNER KJ. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for  $\alpha$ - $\alpha$  oligomeric interaction and  $\gamma$  subunit association with c-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 7357-65

DOUGLAS, S.D. & FUDENBERG, H.H. (1969) Graft versus host reaction in Wiskott–Aldrich syndrome: antemortem diagnosis of human GVH in an immunologic deficiency disease. *Vox Sang* **16**, 172–178.

DROBYSKI, W., THIBODEAU, S., TRUITT, R.L., BAXTER-LOWE, L.A., GORSKI, J., JENKINS, R., GOTTSCHALL, J. & ASH, R.C. (1989) Third-party-mediated graft rejection and graft-versus-host disease after t-cell-depleted bone marrow transplantation, as demonstrated by hypervariable DNA probes and HLA-DR polymorphism. *Blood* **74**, 2285–2294.

ELLIS-DAVIES, G. & KAPLAN, J. (1990) Binding of Na<sup>+</sup> ions to the Na, K-ATPase increases the reactivity of an essential residue in the ATP binding domain. *J. Biol. Chem.* **265**: 20570-20576.

ENYEDI, A., ELWESS, N.L., FILOTEO, A.G., VERMA, A.K., PASZTY, K., PENNISTON, J.T. (1997). Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin. *J Biol Chem.* **272**: 27525-8.

FAGAN, MJ & SAIER JrMH (1994) P-type ATPases of the eukariotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetics trees. *J Mol Evol.* **38**: 57-99.

FERRARA, J. & DEEG, H.J. (1991) Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **324**, 667–674.

FERRARA, J.L.M. & ANTIN, J.H. (1999) The pathophysiology of graft-versus-host disease. In: Hematopoietic Cell Transplantation (ed. by E.D. Thomas, K.G. Blume & S.J. Forman), pp. 305–315. Blackwell Science, Oxford, UK.

FORBUSH, B. 3RD., KAPLAN, J. H. & HOFFMAN, J. F. (1978). Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *Biochemistry* **17**: 3667-3676.

FORBUSH, B. 3RD. (1988) Overview: occluded ions and Na, K-ATPase. *Prog. Clin. Biol. Res.* **268A**, 229-48.

FUKUSHIMA, Y., POST, R.L. (1978) Binding of divalent cation to phosphoenzyme of sodium- and potassium-transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **253**, 6853-62.

FURUKAWA KI, TAWADA Y, SHIGEKAWA M. (1988). Regulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump by cyclic nucleotides in culture vascular cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 8085-8065.

GELLY, K.J., KERR, R., RAWLINSON, S., NORRIS, A. & BOWEN, D.T. (2000) Transfusion-associated graft vs. host disease in a patient with high-grade B-cell lymphoma. Should cellular products for patients with non-Hodgkin's lymphoma be irradiated? *Br. J. Haematol.* **110**, 228–229.

GERENESER, GA & PURUSHOTHAM, KR (1996) Reconstitute Cl<sup>-</sup> pump protein: a novel ion (Cl<sup>-</sup>) motive ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 459-469.

GIANGRANDE, P.L. (2000) The history of blood transfusion. *Br. J. Haematol* **110**: 758-767.

GIBSON, J.G., GREGORY, C.B., BUTTON, L.N. (1961) Citrate-phosphate-dextrose solution for preservation of human blood: a further report. *Transfusion* **1**: 280-287.

GLOOR, S., ANTONICECK, H., SWEADNER, K.J., PAGLIUSE, S., FRANK, R., MOOS, M. & SCHACHNER, M. (1990). The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Cell. Biol.* **110**: 165-174.

GLYNN, I. M. (1993). All hands to the sodium pump. *J Physiol.* **462**: 1-30.

GLYNN, I.M. (1985) The Enzymes of Biological Membranes. 2<sup>nd</sup> edition, Vol.3 p. 35-114. A. Martonosi (ed.), Plenum Press, New York.

GLYNN, I.M., KARLISH, S.J. (1990) Occluded cations in active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 171-205.

GREENBAUM, B.H. (1991) Transfusion-associated graft-versus-host disease: historical perspectives, incidence, and current use of irradiated blood products. *J. Clin. Oncol.* **9**, 1889-1902.

GROVER, A.K. & KHAN, I. (1992) Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* **13**: 9-17.

GUEERING, K., BEGGAH, A., GOOD, P., GIRARDET, S., ROY, S., SCHAER, D. & JAUNIN, P. (1996). Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: Functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the  $\beta$  subunit with the  $\alpha$  subunit. *J. Cell Biol.* **133**: 1193-1204.

HALL, T., BARNES, A., MILLER, J., BETHENCOURT, D., NESTOR, L. (1993) Neonatal mortality following transfusion of red cells with high plasma potassium levels. *Transfusion* **33**, 606-9.

HAMLIN, J.M., BLAUSTEIN, M.P., BOVA, S., DUCHARME, D.W., HARRIS, D.W., MANDEL, F., MATHEWS, W.R., LUDENS, J.H. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6259-63.

HAMRICK, M.; RENAUD, K.J. & FRAMBROUGH, D.M. (1993) Assembly of the extracellular domain of the Na,K-ATPase  $\beta$  subunit with the  $\alpha$  subunit . Analysis of  $\beta$  subunit chimeras and carboxyl-terminal deletions. *J. Biol. Chem* **268**: 24367-24373.

HANSEN, O. (1984) Interaction of cardiac glycosides with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. *Pharmacol. Reviews* **36**, 143-162.

HASLER, U., WANG, X., CRAMBERT, G., BEGUIN, P., JAISSER, F., HORISBERGER, J. D., GUEERING, K. (1998). Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Bio. Chem.* **273**: 30826-35.

HATO, T., YASUKAWA, M. & TAKEUCHI, N. (1994) Decrease in transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion* **34**, 457.

HELLER, M. (1990) Commentary - Cardiac glycosides: New old ideas about old drugs." *Biochem. Pharmacol.* **40** , 919-925.

HERBERT H, PURHONEN P, VORUM H, THOMSEN K, MAUSNBACK AB. (2001) Three dimensional structure of renal Na,K-ATPase from cryo-electron microscopy of two dimensional crystals. *J. Mol. Biol.* **314**: 479-94.

HOFMANN E, JAMES P, VORHERR T, CARAFOLI E. (1993) The c-terminal domain of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump contains 3 high affinity Ca<sup>2+</sup> binding sites. *JBC* **268**: 10252-10259

HORISBERGER, J.D.; LEMAS, V.; KRAEHENBUHL, J.P. & ROSSIER, B.C. (1991) Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *A. Rev. PHysiol.* **53**: 565-584.

JACOBSEN, M.D., PEDERSEN, P.A. & JORGENSEN, P.L. (2002) Importance of Na,K-ATPase residue  $\alpha$ 1-Arg<sup>544</sup> in the segment Arg<sup>544</sup>\_Asp<sup>567</sup> for high-affinity binding of ATP, ADP, or MgATP. *Biochemistry.* **41**, 1451-1456.

JORGENSEN, P. L. (1975) Purification and Characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)ATPase. V. Conformational Changes in the Enzyme Transitions between the Na-form and The K-form Studied With Tryptic Digestion as a Tool. *Biochim. Biophys. Acta* **356**: 53- 67.

JORGENSEN, P.L., HANSEN, C.K. (1990). Multiple endo-beta-1, 4-glucanase-encoding genes from *Bacillus lautus* PL 236 and characterization of the celB gene. *Gene.* **93**: 55-60.

KEETON, T.P. & SHULL, G.E. (1995) Primary structure of rat plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice A site. *Biochem. J.***306**: 779-785.

KUHLBRANDT W, AVER M, SCARBOROUGH GA. (1998) Structure of the P-type ATPases. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 510-6.

LINGREL, J. B. & KUNTZWEILER, T. (1994) Minireview - Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase” *J. Biol. Chem* **269**: 19659-19662.

HENTSCHEL, R., BROECKER, E.B. & KOLDE, G. (1995) Intact survival with transfusion-associated graft-versus-host disease proved by human leukocyte antigen typing of lymphocytes in skin biopsy specimens. *J. Pediatr.* **126**, 61–64.

HIRAYAMA, J., ABE, H., AZUMA, H., IKEDA, H. (2005) Leakage of potassium from red blood cells following gamma ray irradiation in the presence of dipyrindamole, trolox, human plasma or mannitol. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1318-20.

HOBBS, A.S., BRUMBACK, R.A., FESTOFF, B.W. (1979) Monovalent cation transport in myotonic dystrophy. Na-K pump ratio in erythrocytes. *J. Neurol. Sci.* **41**, 299-306.

HOLLAND, P.V. (1989) Prevention of transfusion-associated graft-vshost disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113**, 285–291.

HOLME, S. (2005) Current issues related to the quality of stored red blood cells. *Transf. Apheresis Sci.* **33**, 55-61.

JORGENSEN, P.L., NIELSEN, J.M., RASMUSSEN, J.H., PEDERSEN, P.A. (1998) Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**, 65-70.

JUJI, T., TAKAHASHI, K., SHIBATA, Y., IDE, H., SAKAKIBARA, T., INO, T. & MORI, S. (1989) Post-transfusion graft-versus-host disease in immunocompetent patients after cardiac surgery in Japan. *N. Engl. J. Med.* **321**, 56.

KESSINGER, A., ARMITAGE, J.O., KLASSEN, L.W., LANDMARK, J.D., HAYES, J.M., LARSEN, A.E. & PURTILO, D.T. (1987) Graft versus host disease following transfusion of normal blood products to patients with malignancies. *J. Surg. Oncol.* **36**, 206–209.

KLEIN, C., FRAITAG, S., FOULON, E., RAFFOUX, C., BODEMER, C. & BLANCHE, S. (1996) Moderate and transient transfusion-associated cutaneous graft-versus-host disease in a child infected by human immunodeficiency virus. *Am. J. Med.* **101**, 445–446.

KNAUF, P.A., PROVERBIO, F., HOFFMAN, J.F. (1974) Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* **63**, 324-36.

LABOTKA, R.J. & RADVANY, R. (1985) Graft-versus-host disease in rhabdomyosarcoma following transfusion with nonirradiated blood products. *Med. Pediat. Oncol.* **13**, 101–104.

LANDSTEINER, K.S., WIENER, A.S. (1940) An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proceed Society Exp Biol Med* **43**: 223

LEINDERS, T., van KLEEF, R.G., VIJVERBERG, H.P. (1992) Single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocytes: Ca<sup>2+</sup> dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta*. **1112**: 67-74.

LEITMAN, S.F. & HOLLAND, P.V. (1985) Irradiation of blood products. Indications and guidelines. *Transfusion* **25**: 293–303.

LEVINE, P., STETSON, R.E. (1939) An unusual case of intragroup agglutination. *J Am Med Asso* **113**: 126-127.

LEWINSOHN, R. (1915) Blood transfusion by the citrate method. *Surg Gynecol Obstet* **21**: 37-47

LINGREL, J.B., ORLOWSKI, J., SHULL, M.M, PRICE, E.M. (1990). Molecular genetics of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **38**: 37-89.

LIU ,G., XIE, Z., MODYANOV, N.N., ASKARI, A. (1996) Restoration of phosphorylation capacity to the dormant half of the alpha-subunits of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase. *FEBS Lett.* , 323-6.

LORENTZON P, SACHS G, WALLMARK B. (1998) Inhibitory effects of cations on the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase – a potential sensitive step in the limb of the pump cycle. *JBC* **263**: 10705-10.

LOWENTHAL, R.M., CHALLIS, D.R., GRIFFITHS, A.E., CHAPPELL, R.A. & GOULDER, P.J. (1993) Transfusion-associated graft-versus-host disease: report of an occurrence following the administration of irradiated blood. *Transfusion* **33**, 524–529.

LOWENTHAL, R.M., MENON, C. & CHALLIS, D.R. (1981) Graft-versus-host disease in consecutive patients with acute myeloid leukaemia treated with blood cells from normal donors. *Aust. N. Z. J. Med.* **11**, 179–183.

MALIK, N, CANFIELD, VA, BECKER, MC, CROSS, P & LEVENSON, R (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. *J. Biol. Chem.* **271**: 22754—22758.

MATHE', G., BERNARD, J. & SCHWARZENBERG, L. (1960) New trials with homologous bone marrow grafts after total irradiation in children with acute leukemia in remission. The problem of the secondary syndrome in man. *Revue Hematologique* (Paris), **15**, 115–161.

MAUNG, Z.T., WOOD, A.C., JACKSON, G.H., TURNER, G.E., APPLETON, A.L. & HAMILTON, P.J. (1994) Transfusion-associated graft-versus-host disease in fludarabine-treated B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **88**, 649–652.

MAYER, K. (1990) Transfusion of the patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**, 295–297.

MENITOVE, J.E. (1999) Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 19th edn. American Association of Blood Banks, Bethesda, MD.

MERCER, R.W. (1993) Structure of The Na,K-ATPase. *Int. Rev. Cyt.* **137**: 139- 168.

MEYER T, STRYER L. (1991) Calcium spiking. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**:153-74.

MILLER, R.P. & FARLEY, R.A.. (1988) All three potential N-glycosylation sites of the dog kidney (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase  $\beta$ -subunit contain oligosaccharide. *Biochim. Biophys. Acta.* **954**: 50-57.

MINCHEFF, M. (1998) Changes in donor leukocytes during blood storage. Implications on post-transfusion immunomodulation and transfusion-associated GVHD. *Vox Sang* **74**, 189–200.

MOBASHERI, A. AVILA, J, COZAR-CASTELLANO, I, BROWNLEADER, MD, TREVAN, M, FRANCIS, MJO, LAMB, JF, MARTIN-VASSALLO, P.(2000) Na,k-ATPase isoenzyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functions interaction. *Bioscience Reports.***20**: 51-91.

MORI, S., MATSUSHITA, H., OZAKI, K., ISHIDA, A., TOKUHIRA, M., NAKAJIMA, H., KIZAKI, M., SUGIURA, H., KIKUCHI, A., HANDA, M., KAWAI, Y., YAMAORI, S. & IKEDA, Y. (1995) Spontaneous resolution of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion* **35**, 431–435.

MOROFF, G., HOLME, S., AUBUCHON, J., HEATON, W.A., SWEENEY, J.B., FRIEDMAN, L.I. (1999) Viability and in vitro properties of AS-1 red cells after gamma irradiation. *Transfusion* **39**, 128–34.

MOROFF, G., LEITMAN, S.F. & LUBAN, N.L. (1997) Principles of blood irradiation, dose validation and quality control. *Transfusion* **37**, 1084–1092.

MUTASIM, D.F., BADR, K., SAAB, G. & KURBAN, A.K. (1984) Graft-versus-host disease in a patient with acute lymphoblastic lymphoma. *Cutis* **33**, 206–210.

NAIMAN, J.L., PUNNETT, H.H. & LISCHNER, H.W. (1969) Possible graft-versus-host reaction after intrauterine transfusion for Rh erythroblastosis fetalis. *N. Engl. J. Med.* **281**, 697–701.

NIKOSKELAINEN, J., SODERSTROM, K.O., RAJAMAKI, A., MEURMAN, L., KORVENRANTA, H., KALLIOMAKI, J.L. & TOIVANEN, A. (1983) Graft-versus-host reaction in 3 adult leukaemia patients after transfusion of blood cell products. *Scan. J. Haematol.* **31**, 403–409.

NISHIMURA, M., HIDAKA, N., AKAZA, T., TADOKORO, K. & JUJI, T. (1998) Immunosuppressive effects of chloroquine: potential effectiveness for treatment of post-transfusion graft-versus-host disease. *Transfusion Med.* **8**, 209–214.

NISHIMURA, M., UCHIDA, S., MITSUNAGA, S., YAHAGI, Y., NAKAJIMA, K., TADOKORO, K. & JUJI, T. (1997) Characterization of T-cell clones derived from peripheral blood lymphocytes of a patient with transfusion-associated graft-versus-host disease: Fas-mediated killing by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clones and tumor necrosis factor beta production by CD4<sup>+</sup> T-cell clones. *Blood* **89**, 1440–1445.

OHTO, H. & ANDERSON, K.C. (1996a) Posttransfusion graft-versus-host disease in Japanese newborns. *Transfusion* **36**, 117–123.

OHTO, H. & ANDERSON, K.C. (1996b) Survey of transfusion-associated graft-versus-host disease in immunocompetent recipients. *Transf. Med. Review* **10**, 31–43.

OHTO, H., YASUDA, H., NOGUCHI, M. & ABE, R. (1992) Risk of transfusion-associated graft-versus-host disease as a result of directed donations from relatives. *Transfusion* **32**, 691–693.

PALASIS M., KUNTZWEILER, T.A., ARGUELLO, J.M. & LINGREL, J.B. (1996) Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J. Biol. Chem* **271**: 14176-14182.

PELZYNSKI, M.M., MOROFF, G., LUBAN, N.L., TAYLOR, B.J., QUINONES, R.R. (1994) Effect of  $\gamma$ -irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* **83**, 1683-9.

PENG, M., HUANG, L., XIE, Z., HUANG, W.H., ASKARI, A. (1996) Partial inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain induces the Ca<sup>2+</sup>-dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 10372-8.

PENNISTON JT, ENYEDI A. (1998) Modulation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *J Membr Biol* **165**:101-9

PETERS, W. H. M., DE PONT, J. J. H. H. M., KOPPERS, A. & BONTING, S. L. (1981). Studies on (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. XLVII. Chemical composition, molecular weight, and molar ratio of the subunits of the enzyme from rabbit kidney outer medulla. *Biochim. Biophys. Acta* **641**: 55-70

PETZ, L.D., CALHOUN, L., YAM, P., CECKA, M., SCHILLER, G., FAITLOWICZ, A.R., HERRON, R., SAYAH, D., WALLACE, R.B. & BELLDEGRUN, A. (1993) Transfusion-associated graft-versus-host disease in immunocompetent patients: report of a fatal case associated with transfusion of blood from a second-degree relative, and a survey of predisposing factors. *Transfusion* **33**, 742-750.

POST, R. L., HEGIVARY, C. & KUME, S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**: 6530-6540.

POST, R. L., SEN, A. K. & ROSENTHAL, A. S. (1965). A phosphorylated intermediate

in adenosine-triphosphatase dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *J. Biol. Chem.* **240**:1437-1445.

POSTMUS, P.E., MULDER, N.H. & ELEMA, J.D. (1988) Graft versus-host-disease after transfusions of non-irradiated blood cells in patients having received autologous bone marrow. A report of 4 cases following ablative chemotherapy for solid tumors. *Eur.J. Cancer Clin. Oncol.* **24**, 889–894.

REEVES JP, CONDRESSEU M, CHERNAYA G, GARDENER JP. (1994) Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> antiport in the mammalian heart. *J. Exp. Biol.* **196**: 375-88.

ROBINSON JD, FLASHNER MS. (1979) Modification of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-dependent ATPase by acetic anhydride and trinitrobenzene sulfonate: specif changesin enzymatic properties. *Arch Biochem Biophys.* **196**: 350-62.

ROHN, T.T., HINDS, T.R., VINCENZI, F.F.. (1996) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-Pump ATPase and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pump ATPase by Iron-Generated Free Radicals. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 471-6.

RYO, R., SAIGO, K., HASHIMOTO, M., KOHSAKI, M., YASUFUKU, M., WATANABE, N., OKADA, M., TADOKORO, K. & JUJI, T. (1999) Treatment of post-transfusion graft-versus-host disease with nafmostat mesilate, a serine protease inhibitor. *Vox Sang* **76**, 241–246.

SAAB, G.A., KURBAN, A.K. & MUTASIM, D.F. (1983) Graft-versus-host disease in lymphoblastic lymphoma following blood transfusions. *Middle East J. Anesth.* **7**, 221–225.

SAITO, M., TAKAMATSU, H., NAKAO, S., SHIOBARA, S., MATSUDA, T., TAJIKA, E., NAKAMURA, T., KAJI, T. & YOSHIDA, T. (1993) Transfusion-associated graft-versus-host disease after surgery for bladder cancer. *Blood* **82**, 326–327.

SAKAKIBARA, T., IDA, T., MANNOUJI, E., KIKUCHI, T., TATSUNO, K., KAWASE, M. & IMAI, M. (1989) Post-transfusion graft-versus-host disease following open heart surgery. Report of six cases. *J. Cardio. Surg. Turin* **30**, 687–691.

SCARBOROUGH GA. (1999) Structure and function of the P-type ATPases. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 517-22

SCHMALZING, G., RUHL, K., GLOOR, S.M. (1997). Isoform-specific interactions of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**: 1136-41.

SCHMALZING, G.; KRONER, S.; SCHACHNER, M. & GLOOR, S.(1992) The adhesion molecule on glia (AMOG/β2) and α1 subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 20212-20216.

SCHROEDER, M.L. (2002) Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* **117**, 275-87.

SCHUURMANS-STEKHOVEN, F.M.A.H., SWARTS, H. G. P., DE PONT, J. J. H. H. M. & BONTING, S. L. (1980). Studies on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-activated ATPase - XLIV. Single phosphate incorporation during dual phosphorylation by inorganic phosphate and adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **597**: 100-111.

SEEMAYER, T.A. & BOLANDE, R.P. (1980) Thymic involution mimicking thymic dysplasia: a consequence of transfusion-induced graft versus host disease in a premature infant. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **104**, 141–144.

SHAMRAJ, O.I.; GRUPP, I.L.; GRUPP, G.; MELVIN, D.; GRADOUX, N.; KREMERS, W.; LINGREL, J.B. & DE POVER, A. (1993) Characterization of NA/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovascular Research* **27**:2229-2237.

SHARIFI, S., DZIK, W.H., SADRZADEH, S.M. (2000) Human plasma and tirilazad mesylate protect stored human erythrocytes against the oxidative damage of gamma-irradiation. *Transfus. Med.* **10**, 125-30.

SHIMODA, T. (1955) On postoperative erythroderma. (Em japonais). *Geka* **17**, 487–492.

SKOU, J. C.(1957). The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* **23**: 394-401.

SOLA, M.A., ESPANA, A., REDONDO, P., IDOATE, M.A., FERNANDEZ, A.L., LLORENS, R. & QUINTANILLA, E. (1995) Transfusion-associated acute graft-versus-host disease in a heart transplant recipient. *Br. J. Dermatol.* **132**, 626–630.

SPECTOR, D. (1995) Transfusion-associated graft-versus-host disease: an overview and two case reports. *Oncol. Nurs. Forum* **22**, 97–101.

SPRENT, J., ANDERSON, R.E. & MILLER, J.F.A.P. (1974) Radiosensitivity of T and B lymphocytes. II. Effect of irradiation on response of T cells to alloantigens. *Eur. J. Immun.* **4**, 204–210.

STARK, G. (2005) Functional consequences of membrane damage. *J. Membrane Biol.* **205**, 1–16.

STAUFFER, T.P.; GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. A study using specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **270**: 12184-12190.

STRAUSS, R.G. (2000) Data-driven blood banking practices for neonatal RBC transfusions. *Transfusion* **40**, 1528–1540.

STROBEL, S., MORGAN, G., SIMMONDS, A.H. & LEVINSKY, R.J. (1989) Fatal graft versus host disease after platelet transfusions in a child with purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Eur. J. Pediat.* **148**, 312–314.

SUZUKI, Y., TATEISHI, N., CICHA, I., SHIBA, M., MURAOKA, M., TADOKORO, K., MAEDA, N. (2000) Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **22**, 131-41.

TAMKUN, M.M. & FRAMBROUGH, D.M. (1986) The  $(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})$ -ATPase of chick sensory neurons. Studies on biosynthesis and intracellular transport. *J. Biol. Chem* **261**: 1009-1019.

THALER, M., SHAMISS, A., ORGAD, S., HUSZAR, M., NUSSINOVITCH, N., MEISEL, S., GAZIT, E., LAVEE, J. & SMOLINSKY, A. (1989) The role of blood from HLA-homozygous donors in fatal transfusion-associated graft-versus-host disease after open-heart surgery. *N. Engl. J. Med.* **321**, 25–28.

TREUHEIT, M.J.; COSTELLO, C.E. & KIRLEY, T.L.(1993). Structures of the complex glycans found on the  $\beta$ -subunit of (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **268**: 13914-13919.

TRIULZI, D.J. & NALESNIK, M.A. (2001) Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation. *Transfusion* **41**, 419–426.

VALERI, C.R., PIVACEK, L.E., CASSIDY, G.P., RAGNO, G. (2001) In vitro and in vivo measurements of gamma-radiated, frozen, glycerolized RBCs. *Transfusion* **41**, 545-9.

VALERIUS, N.H., JOHANSEN, K.S. & NIELSEN, O.S. (1981) Effect of vitro X-irradiation on lymphocyte and granulocyte function. *Scan. J. Hematol.* **27**, 9–18.

VERMA, A.K., PASZTY, K., FILOTEO, A.G., PENNISTON, J.T., ENYEDI, A. (1999). Protein kinase C phosphorylates plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform 4a at its calmodulin binding domain. *J Biol Chem.* **274**: 527-31.

von FLIEDNER, V.E., HIGBY, D.J. & KIM, U. (1982) Graft-versus-host reaction following blood product transfusion. *Am. J. Med.* **72**, 951–961.

WANG K.K.W., WRIGTH L.C., MACHAN C., ALLEN B.G., CONIGRAVE A.D., ROUFOGALIS B.D. (1991) Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **266**: 9078-9085.

WEISKOPF, R.B., SCHNAPP, S., ROUINE-RAPP, K., BOSTROM, A., TOY, P. (2005) Extracellular potassium concentrations in red blood cell suspensions after irradiation and washing. *Transfusion* **45**, 1295-301.

WISE, B.V. & LAWRENCE, N.L. (1990) A risk of blood transfusions for premature infants. *MCN Am. J. Mat. Child Nurs.* **15**, 86–89.

WISECARVER, J.L., CATTRAL, M.S., LANGNAS, A.N., SHAW, B.W.J., FOX, I.J., HEFFRON, T.G. & RUBOCKI, R.J. (1994) Transfusion-induced graft-versus-host disease after liver transplantation. Documentation using polymerase chain reaction with HLA-DR sequence-specific primers. *Transplantation* **58**, 269–271.

WOODS, W.G. & LUBIN, B.H. (1981) Fatal graft versus host disease following a blood transfusion in a child with neuroblastoma. *Pediatrics* **67**, 217–221.

WRIGHT LC, CHEN S, ROUFOGALIS BD. (1993). Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by protein kinase C in intact human erythrocytes. *Biochim. Biophys.* **306**: 277-284

WUYTACK F and RAEYMAEKERS L. (1992) The  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase from the plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 285-300

XIE, Z., ASKARI, A. (2002)  $\text{Na,K}$ -ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2434-2439.

XIE, Z. (2001) Ouabain interaction with cardiac  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. *Cel. Mol. Biol.*, **47**, 383-390.

YAMAGUCHI, M., TONOMURA, Y. (1979) Simultaneous binding of three  $\text{Na}^+$  and two  $\text{K}^+$  ions to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependent ATPase and changes in its affinities for the ions induced by the formation of a phosphorylated intermediate. *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 509-23.

YASUKAWA, M., SHINOZAKI, F., HATO, T., TAKADA, K., ISHII, Y., TAMAI, T., TAKAMATSU, H., SHIOBARA, S., YOSHIZAKI, K. & FUJITA, S. (1994) Successful treatment of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* **86**, 831–836.

YODA, A. & YODA, S. (1982) Interaction between ouabain and the phosphorylated intermediate of  $\text{Na,K}$ -ATPase. *Mol. Pharmacol.* **22**: 700-705.

YU S.P., CANZONIERO L.M., CHOI D.W. (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**: 405-11.

ZAMOFING, D.; ROSSIER, B.C. & GEERING, K.(1986) Role of the NA,K-ATPase  $\beta$ -subunit in the cellular accumulation and maturation of the enzyme as assessed by glycosylation inhibitors. *J. Membr. Biol.* **104**: 69-79.

**8- ANEXOS-**



## Effects of $\gamma$ -irradiation on the membrane ATPases of human erythrocytes from transfusional blood concentrates

Otacílio C. Moreira · Vanessa H. Oliveira ·  
 Luíza B. F. Benedicto · Carmem M. Nogueira ·  
 Julio A. Mignaco · Carlos Frederico L. Fontes ·  
 Leandro A. Barbosa

Received: 8 August 2006 / Accepted: 21 August 2007 / Published online: 15 September 2007  
 © Springer-Verlag 2007

**Abstract** Irradiation of blood derivatives is employed in blood banks to avoid transfusion-associated graft-vs-host disease. As irradiation can damage membranes and membrane proteins by generation of reactive oxygen species, we investigated whether the membrane permeability,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from red blood cell plasma membranes were altered by  $\gamma$ -irradiation. Whole blood was collected from healthy donors and concentrated to 90% cell fraction. Within 24 h of collection, blood concentrates were irradiated with 25 Gy of  $\gamma$ -radiation. At days 1, 7, 14, and 28 post-irradiation, fractions were removed and centrifuged.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities from ghost membranes were assessed by  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP hydrolysis. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase was not immediately affected by irradiation, but it was inhibited by 40% by day 14 and until day 28. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was unaltered by irradiation. The rate and the maximal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake from re-sealed inside-out vesicles were reduced, and the passive efflux of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$

was increased. Thus, irradiation of blood concentrates increased the plasma membrane permeability to monovalent and divalent cations and would change ion homeostasis and cell function. We recommend the use of irradiated blood within a period shorter than 14 days after irradiation.

**Keywords**  $\gamma$ -Irradiation · Graft-vs-host disease · Plasma membrane permeability · ATPase

### Abbreviations

TA-GVHD	transfusion-associated graft-vs-host disease
HLA	human lymphocitary antigen
LDH	lactate dehydrogenase
IOVs	inside-out vesicles from red blood cells
p.i.	post-irradiation
ROS	reactive oxygen species

### Introduction

Irradiation of donor's blood with  $\gamma$ -radiation has been adopted at blood banks as a strategy to avoid transfusion-associated graft-vs-host disease (TA-GVHD) [1]. TA-GVHD occurs when severely immunodeficient or immunodepressed patients receive blood containing donor's immunologically competent lymphocytes. Donor's lymphocytes can then engraft and develop an immune response against host cells. This issue can be observed in immunodepressed patients after chemotherapy for cancer treatment or due to bone marrow transplantation, congenital problems, or HIV infection [2, 3]. Although TA-GVHD is infrequent, patients affected respond very poorly to current treatments; therefore this illness can be fatal [4]. Irradiation of blood with  $\gamma$ -rays can inactivate the T lymphocytes that trigger TA-GVHD and has been described as a tool to prevent this illness [5].

O. C. Moreira · V. H. Oliveira · L. B. F. Benedicto ·  
 J. A. Mignaco · C. F. L. Fontes · L. A. Barbosa  
 Instituto de Bioquímica Médica, CCS, UFRJ,  
 Alameda Bauhinia 400, Ilha do Fundão,  
 Rio de Janeiro CEP 21941-590, Brazil

C. M. Nogueira  
 Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ,  
 Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n°, Ilha do Fundão,  
 Rio de Janeiro CEP 21945-560, Brazil

C. F. L. Fontes (✉) · L. A. Barbosa (✉)  
 Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas e ATPases  
 (LERPA), Instituto de Bioquímica Médica, CCS, UFRJ,  
 Programa de Biologia Estrutural,  
 Alameda Bauhinia 400, Sala H2-026, Ilha do Fundão,  
 Rio de Janeiro CEP 21941-590, Brazil  
 e-mail: cfontes@bioqmed.ufrj.br  
 e-mail: leaugust@yahoo.com.br

Previous works established that irradiation of blood concentrates induce an increase in plasma  $K^+$  [6–8]. This could be a shortcoming on the transfusion of blood or derivatives [9, 10]. Cases of hyperkalaemic cardiac arrhythmias and arrest after transfusion of irradiated and nonirradiated red blood cells (RBCs) were reported [11–13]. In newborn patients requiring massive blood transfusion, this plasma  $K^+$  increase could be dangerous [14].

Earlier reports showed that  $\gamma$ -radiation can induce damage in the plasma membrane (PM) or associated proteins [15–17]. Two PM enzymes are main targets to study the effects of  $\gamma$ -radiation on the RBCs, performing key roles in erythrocyte ionic balance:  $Na^+K^+$ -ATPase and PM  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA). The  $Na^+K^+$ -ATPase is a heterodimer ( $\alpha_2\beta_2$ ), where  $\alpha$  (100 kDa) is the catalytic subunit and  $\beta$  (50 kDa) is a glycoprotein with regulatory and chaperone-like relevance. This enzyme maintains an asymmetrical gradient of  $Na^+$  and  $K^+$  through PM that is important to sustain the transport of glucose and aminoacids, to establish the resting membrane potential, and to regulate cell volume [18]. PMCA is a monomer (140 kDa) important to extrude  $Ca^{2+}$  ions from cytoplasm to the outside of cells, hence controlling intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations in homeostatic levels [19]. Both enzymes belong to the P-type ion-transporting ATPase family [20] which enzymes are able to form a phosphointermediate during its catalytic cycle, being classically inhibited by vanadate [21].

In this work, we aimed to evaluate the perturbations resulting from  $\gamma$ -radiation on the ionic balance of blood concentrates during its storage, to estimate the viability and reliability of transfused cells, and to establish a possible involvement of the  $Na^+K^+$ -ATPase and the PMCA in these events.

## Materials and methods

### Blood samples

Fresh blood bags (maximum 1 day after collection) from healthy donors were fractionated to obtain blood concentrates and thereafter split in two equal fractions and saved in blood-bank type plastic bags (AS-1 type). One of the fractions was irradiated with 25 Gy, while the second sample was not treated and was used as control. Blood from each donor was used for comparison between control and irradiated samples. Bags with 175 ml of blood concentrate were irradiated (85–90% hematocritus) with the international standard of 25 Gy of  $\gamma$ -radiation. At selected days after irradiation, the plasma levels of  $Na^+$ ,  $K^+$ , and  $Ca^{2+}$  ions, the pH, the plasma lactate dehydrogenase activity (LDH), and both  $Na^+K^+$ -ATPase and PMCA activities were evaluated. In addition, the integrity and ion-perme-

ability of the membranes were assessed by  $^{45}Ca^{2+}$  uptake by inside-out ghost membranes and by  $Ca^{2+}$  efflux rates. The blood bags were stored at 4°C at the blood bank for different periods [1, 7, 14 and 28 days post-irradiation (p.i.)] in the same conditions used for clinical transfusions. A total of 25 blood bags were utilized during all experiments performed. All data presented corresponds to 'n' number of experiments done with three blood bags for each condition, and each experimental point was performed in triplicate. Total volume of whole-blood donation was approximately 450 ml, with a final volume of 350 ml for the RBC concentrates. The minimum hemoglobin content in the RBC concentrates was 43 g/unit, without leukocyte depletion (no buffy coat). The donation and the storage bags were the same (AS-1 type), and the composition of the Adsol® additive formula was 26.3 g/l of sodium citrate (dihydrate); 25.5 g/l of dextrose (monohydrate); 3.27 g/l of citric acid (anhydrous); 2.22 g/l of monobasic sodium phosphate (monohydrate); 154 mM NaCl; 42 mM mannitol; and 2 mM adenine.

### Assessment of $Na^+$ , $K^+$ , and $Ca^{2+}$ and LDH activity on plasma

Samples of the stored blood (50 ml) were spun at 5,000×g for 10 min, and the residual plasma (roughly 10% of the total blood concentrate) was removed for assessment of the ion concentrations and LDH activity. Ion measurements were done by flame photometry, following the standards applied in clinics.

### Preparation of erythrocyte membranes (ghosts)

Preparations of cytoplasm-free membrane ghosts were done from stored blood concentrate bags according to Rega et al. [22] with some modifications. The blood concentrates were spun at 6,500×g for 10 min at 4°C. The precipitates were resuspended in a solution of 20 mM Tris–Cl (pH 7.4), 130 mM KCl, and 0.6 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). This suspension was spun for 6,500×g for 10 min at 4°C. The cells were lysed by freezing in liquid nitrogen followed by thawing at room temperature (25°C). The lysed cells were then resuspended with 5 mM 4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; pH 7.4), 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 0.6 mg/ml PMSF and spun at 9,000×g for 10 min at 4°C. This step was repeated four times, and the resulting pellet was suspended in 10 mM HEPES (pH 7.4), 130 mM KCl, 0.5 mM  $MgCl_2$ , and 0.05 mM  $CaCl_2$ , spun at 9,000×g for 10 min, resuspended in a small volume of this last buffer, and stored in nitrogen until use. The total protein concentration was determined according to Lowry et al. [23].

### ATPase activities

Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was measured in media containing 30 mM Tris–Cl (pH 7.4), 1 mM ouabain, 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mg ml<sup>-1</sup> ghost protein, in presence or in the absence of 30 μM CaCl<sub>2</sub> and 1 μg ml<sup>-1</sup> calmodulin. Reactions (final volume of 0.5 ml) were typically started by the addition of [<sup>γ</sup>-<sup>32</sup>P]ATP (1 mM final, 0.2–0.3 Ci mol<sup>-1</sup>) and were quenched after 60 min at 37°C by addition of 0.2 ml of 0.1 N HCl. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was assessed in media containing 30 mM HEPES (pH 7.4), 120 mM NaCl, 20 mM KCl, 300 μM ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mg/ml ghost protein. Reactions were started by addition of [<sup>γ</sup>-<sup>32</sup>P]ATP (3 mM final, 0.2–0.3 Ci mol<sup>-1</sup>) and were quenched after 60 min at 37°C by addition of 1 volume of 0.1 N HCl. Total hydrolysis never exceeded 10% of the total substrate. After quenching the reactions, 0.4 ml of activated charcoal (25% w/v) in 0.1 M HCl was added, the samples were spun for 10 min at 8,000×g, and aliquots of the supernatant were applied on thick filter paper for drying. These filters were thereafter counted on a Tri-Carb 2100 liquid scintillation analyzer from Packard [24].

### Ca<sup>2+</sup> uptake by IOVs

IOVs were prepared as described by Coelho-Sampaio et al. [25] with both irradiated and nonirradiated ghost membranes. Vesicles were allowed to uptake <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (0.5 μCi ml<sup>-1</sup>) for increasing times in medium containing 20 mM Tris–Cl (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 100 μM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 2 μg ml<sup>-1</sup> calmodulin, and 100 μg ml<sup>-1</sup> IOVs, at 37°C. At different intervals, samples were removed, and binding was stopped by addition to 0.1 volume 10 mM EGTA (1 mM final). The samples were filtered in Millipore membranes (0.45 μm) and washed 3× 5 ml with a solution containing 20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)–Tris (pH 7.0), 3 mM La(NO<sub>3</sub>), and 100 mM KCl using a vacuum manifold Hoeffer apparatus. The radioactivity was determined by liquid scintillation.

### Passive release of Ca<sup>2+</sup> by IOVs

IOVs were loaded with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> by incubation of IOVs (1 mg ml<sup>-1</sup>) for 60 min in the Ca<sup>2+</sup>-uptake medium of the previous section. For Ca<sup>2+</sup> release, the IOVs were centrifuged at 8,000×g for 10 min, and immediately resuspended to 100 μg ml<sup>-1</sup> of IOVs in the efflux medium containing 20 mM Tris–Cl (pH 7.4), 120 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EGTA. Samples were taken from this medium and immediately filtered, washed, and counted as for the uptake section.

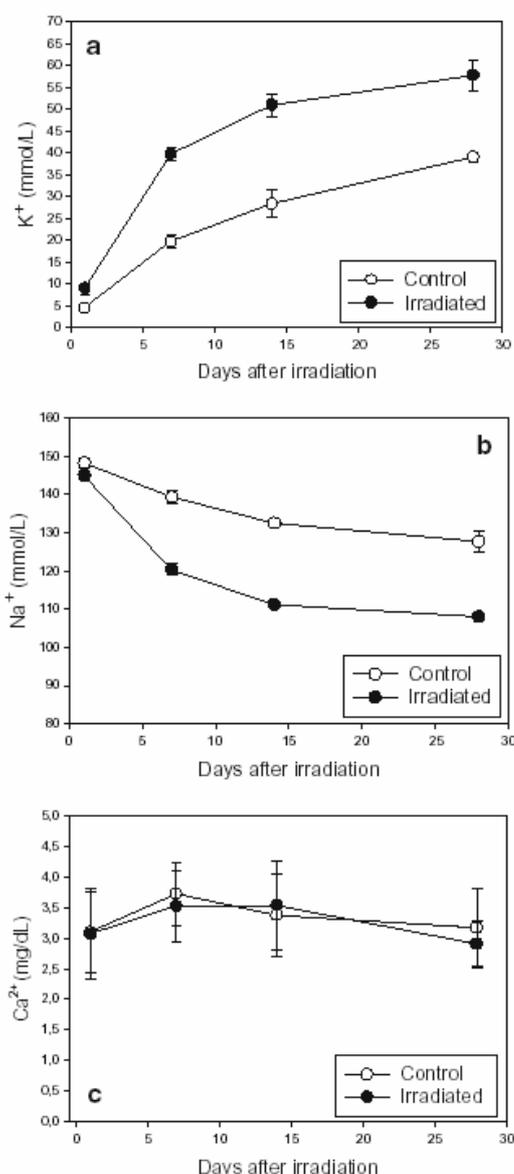
### Results

The irradiation of blood concentrates with 25 Gy of γ-radiation did not alter the pH nor increase the LDH activity of the plasma when compared to control samples. These results (not shown) were consistently obtained from days 1 to 28. The time-dependent increase in plasma LDH and the decrease in plasma pH observed for both control and irradiated bags indicated an expected and slow cell lysis induced by aging of the samples.

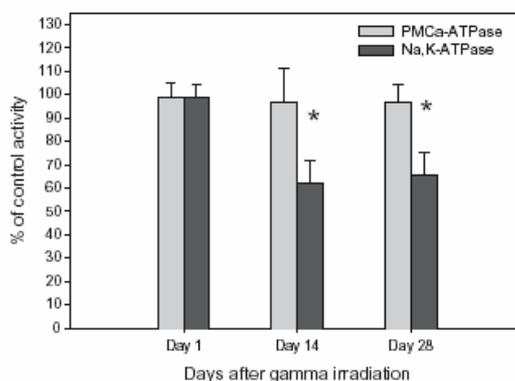
Exposure to γ-radiation induced a time-dependent increase in the K<sup>+</sup> values of the plasma from irradiated bags. This was observed as early as on the first day, where the plasma K<sup>+</sup> levels already doubled (~10 mM in irradiated and ~5 mM in nonirradiated bags), as shown in Fig. 1a, and thereafter plasma K<sup>+</sup> levels increased during storage. Conversely, Na<sup>+</sup> levels decreased more evidently for irradiated samples than for controls (Fig. 1b), although this decrease was not as marked as the increase in plasma K<sup>+</sup> shown in Fig. 1a. It was also observed that the Na<sup>+</sup> concentrations tended to stabilize between the 14th and the 28th day, while K<sup>+</sup> stood progressively increasing between days 14 and 28. In contrast, the plasma Ca<sup>2+</sup> concentration seemed almost unchanged and identical for both control and irradiated samples throughout all the storage period (Fig. 1c).

Cytosolic ion concentrations are dependent on the correct functioning of two main PM ATPases, namely, the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase. The ATPase activities of both enzymes under optimal assay conditions were evaluated with ghosts prepared at days 1, 14, and 28. In apparent agreement with the data obtained for the plasma Ca<sup>2+</sup> concentrations, the PMCA activity remained unaffected during the course of the storage (Fig. 2). On the other hand, the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of irradiated cells was inhibited by almost 40% (*p* < 0.05) within the initial 14-day period and remained unchanged until day 28 after irradiation (Fig. 2). Therefore, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition could be, at least in part, responsible for the changes in the plasma concentrations of both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions.

Previous reports showed that irradiation of erythrocytes damages membrane phospholipids by the generation of reactive oxygen species (ROS) that induce lipid peroxidation and formation of products reactive with thiobarbituric acid–TBARS [25–28]. Thus, damage to the membrane could also be in part responsible for the altered levels in plasma Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions observed after the irradiation of hemocomponents. To ascertain if the membrane permeability to ions was affected by irradiation, we measured Ca<sup>2+</sup> uptake by IOVs prepared from control and irradiated blood stored for 28 days p.i. IOVs are the result of inside–out resealing of ghost membranes; as a result, the Ca<sup>2+</sup>-ATPase actively pumps Ca<sup>2+</sup> inward IOVs. Ca<sup>2+</sup> is then loaded until

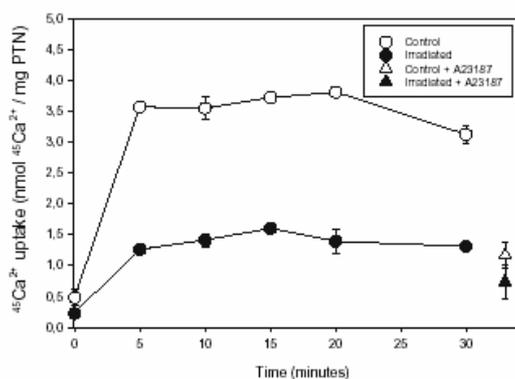


**Fig. 1** K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> plasma concentrations of blood concentrates stocked at 4°C. At each day represented, sealed blood bags were open after homogenizing the content; the concentrate was centrifuged at 6,000×g for 10 min at 4°C, and the different parameters were measured. The plasma values for K<sup>+</sup> (a), Na<sup>+</sup> (b) and Ca<sup>2+</sup> (c) are shown for the control (open circles) and irradiated samples (closed circles; n=3±SE)

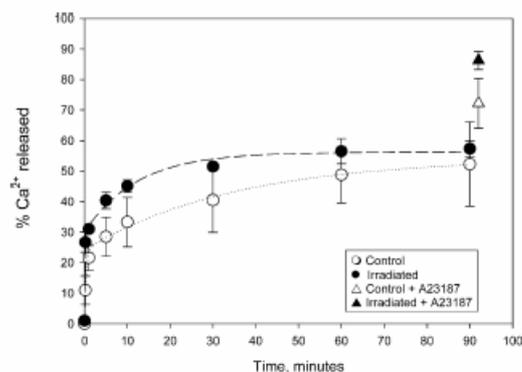


**Fig. 2** Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and PMCA ATPase activities. The ATPase activities of both enzymes were measured using membrane ghosts prepared at each reported day post-irradiation (1, 14, and 28 days). Data were presented as percent of control activity at the beginning of the time course experiment, which was at range of 557.9 to 720.8 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for Ca<sup>2+</sup>-ATPase (light gray) and 192.6 to 248.9 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (dark gray). Data are mean±SE (n=4). The control activity values were not significantly altered by the storage. Asterisks represent that result's bars are significantly different from controls, as evaluated by Student's *t* test (*p*<0.05)

a steady state between the active pumping by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the passive leakage through the membranes is reached. In Fig. 3, the irradiated samples reached a much lower Ca<sup>2+</sup> content than the nonirradiated samples (1.25 vs 3.5 nmol Ca<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup> IOVs, *p*<0.05). Figure 4 shows the time course of passive Ca<sup>2+</sup> release induced by EGTA, observed for IOVs obtained from control (open circles) and irradiated (closed circles) blood concentrates. It is shown that the initial rate of Ca<sup>2+</sup> release is much higher for the irradiated samples than for the control.



**Fig. 3** Ca<sup>2+</sup> uptake by IOVs prepared from ghosts of control and irradiated blood. Ghosts were prepared from blood stored for 28 days, and therefore IOVs were prepared and used for Ca<sup>2+</sup> uptake. Results are mean±SE (n=3)



**Fig. 4** Passive release of  $\text{Ca}^{2+}$  from IOVs. After active loading with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  for 60 min, IOVs were collected and diluted tenfold in an efflux medium with 1 mM EGTA. As the uptake values differed, values are expressed as fractional release. Both control (open circles) and irradiated (closed circles) release kinetics were fitted with a double-exponential decay equation. Control:  $k_1=2,6035$ ;  $k_2=0,0286$ ;  $a_1=24,1715$ ;  $a_2=30,1318$  (dotted line); irradiated:  $k_1=10,3599$ ;  $k_2=0,0817$ ;  $a_1=30,0601$ ;  $a_2=26,1569$  (dashed line). The triangles represent the  $\text{Ca}^{2+}$  released after addition of 5  $\mu\text{M}$  of the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 ( $n=4\pm\text{SE}$ )

## Discussion

The storage of irradiated hemocomponents is mandatory for hemotherapy services of high complexity. The maximal storage period for irradiated blood concentrates according to the international convention is 28 days p.i. Hence, to determine the true p.i. interval in which one may certify the safety and reliability of irradiated hemocomponents becomes of critical importance. By inducing DNA damage, 25 Gy of  $\gamma$ -radiation is effective to arrest replication, growth, and survival of T cells [28].

As depicted in Fig. 1, the plasma  $\text{Ca}^{2+}$  levels of blood concentrates were not affected by irradiation. However, both plasma  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  values were profoundly affected, by far exceeding the variations induced by blood storage only (Fig. 1 controls). As plasma  $\text{K}^+$  almost doubled within the first day p.i., it was speculated whether inhibition of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase would be involved in this process. We found that the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was inhibited by 40% at the 14th day p.i. and similarly at the 28th day but not at the first day p.i. (Fig. 2). Our results are in frontal contrast to those reported by Brugnara et al. [15], where no variations on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity were observed with the same radiation dose (25 Gy). These authors employed the ouabain-sensitive fraction of the rate of  $\text{Na}^+$  efflux from erythrocytes as an indirect assay of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. It is relevant to notice that, in our experiments, ATPase activity was measured directly from ghost membranes. Thus, we remark that our results were obtained with an accurate radioactive assay. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition

after 14 days of irradiation, reported in this paper, would therefore not be affected by indirect methodological variables.

The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition might be involved in the loss of cell monovalent ion homeostasis; however, it is certainly not the only causative factor. As blood derivatives are stored at  $4^\circ\text{C}$ , probably the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity has a limited effect in maintaining cell homeostasis during storage. This inhibition might prove to be important immediately before and after transfusion, as at body temperature the pump activity will be demanded, and a 40% inhibition could thereby affect cell shape, volume and viability. Morroff et al. [30], also reported changes of plasma  $\text{K}^+$  levels after irradiation of RBCs, concluding that longer storage times after irradiation reduced cell viability and posttransfusional recovery. We describe for the first time a link between ion-transport protein damage and altered RBC physiology after irradiation.

The effects of irradiation on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase are worsened on the long-term storage, while the increase in plasma  $\text{K}^+$  is rapid. This short-term  $\text{K}^+$  leakage by RBCs could be associated with the opening of  $\text{K}^+$  channels (see below), while the increase in plasma  $\text{Na}^+$ , which follows a slower time course, parallels with the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition. This could be due to the p.i. oxidative effects, which are related to ROS generation by  $\gamma$ -radiation [27, 28]. Although no  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition was seen immediately after irradiation, lipid peroxidation cascades can form chemical intermediates that can damage PM and membrane proteins [29]. This could explain the observed 40% reduction in the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase after 14 days (Fig. 2). This long-term oxidative damage could be also due to depletion of reduced glutathione and antioxidants during the low-temperature storage, where ATP and 2,3-diphosphoglycerate (DPG) levels are depleted [31].

Although inhibition of sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) [32] and PMCA [33] by ROS was reported, no inhibition of PMCA from irradiated samples was observed in our experiments. This might be due to an inherent difference in susceptibility to lipid peroxidation or to direct oxidation between the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and PMCA. It was observed in the response of transport ATPases to metastable 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (HNE) in which  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase was much more affected than PMCA by the HNE accumulation [34]. Consistent with the fact that PMCA was not inhibited, we were unable to detect changes on the plasma  $\text{Ca}^{2+}$  levels between irradiated and control samples (Fig. 1c). Although plasma values (3–3.5 mM) are similar, they do not preclude changes on the rather low (10–100 nM) intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , where only slight oscillations could significantly change cell metabolism. An increase on the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  could trigger the opening of the  $\text{K}^+$  channels, therefore inducing  $\text{K}^+$  leakage with the aforementioned consequences [35].

It is plausible that due to oxidative damage the PM became leaky to ions but not to proteins. As the PMCA was not inhibited by irradiation, the candidate for any difference observed on the uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  and also on the passive release rates should be the membrane integrity. As shown by our data,  $\gamma$ -irradiation inhibited the maximum uptake (Fig. 3) and increased the passive release rate (Fig. 4). This suggests that PM damage must have occurred upon irradiation, rendering IOVs leaky to  $\text{Ca}^{2+}$  and possibly any other metal ion, hence permitting the leakage of  $\text{K}^+$  and/or  $\text{Na}^+$  besides  $\text{Ca}^{2+}$ . Some studies described that when antioxidant solutions were added before the irradiation of hemoconcentrates, a prevention of the increase in plasma  $\text{K}^+$  is observed [36, 37]. This is evidence for the involvement of ROS on the irradiation-induced damage to the PM.

It can be concluded that irradiated hemoconcentrates are susceptible to damage that is dependent on the period of storage. Thus, it would be convenient to irradiate the samples on the time of usage. Nevertheless, this would be unfeasible on the management of hemotherapeutic centers. We recommend that irradiated hemoconcentrates should be, if possible, used within 14 days of storage, as the integrity levels of cell membrane and membrane proteins remain apparently adequate. Another possibility would be the addition of antioxidant agents, like vitamin E and ascorbate, before irradiation of hemoconcentrates to prevent progressive membrane damage and loss of cell function.

**Acknowledgements** We are grateful to Dr. Amir Askari for the careful reading of the manuscript.

## References

- Seghatchian MJ, Ala F (1995) TA-GVHD: Current concepts and future trends. *Transfus Sci* 16:99–105
- Anderson KC, Weinstein HJ (1990) Transfusion-associated graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 323:315–321
- Greenbaum BH (1991) Transfusion-associated graft-versus-host disease: historical perspectives, incidence, and current use of irradiated blood products. *J Clin Oncol* 10:1889–1902
- Aoun E, Shamseddine A, Chehal A, Obeid M, Taber A (2003) Transfusion-associated GVHD: 10 years' experience at the American University of Beirut-Medical Center. *Transfusion* 43:1672–1676
- Anderson K (2003) Broadening the spectrum of patient groups at risk for transfusion-associated GVHD: implications for universal irradiation of cellular blood components. *Transfusion* 43:1652–1654
- Ramirez AM, Woodfield DG, Scott R, McLachlan J (1987) High potassium levels in stored irradiated blood. *Transfusion* 27:444–445
- Rivet C, Baxter A, Rock G (1989) Potassium levels in irradiated blood. *Transfusion* 29:185
- Avoy DR (1990) Potassium levels in irradiated blood. *Transfusion* 30:764
- Barnard DR, Chapman RG, Simmons MA, Hathaway WE (1980) Blood for use in exchange transfusion in the newborn. *Transfusion* 20:401–408
- Brown KA, Bissonnette B, MacDonald M, Poon O (1990) Hyperkalaemia during massive blood transfusion in paediatric craniofacial surgery. *Can J Anaesth* 37:401–408
- Carvalho B, Quiney N (1999) "Near miss" hyperkalaemic cardiac arrest associated with rapid blood transfusion. *Anaesthesia* 54:1094–1096
- Buntain S, Pabari M (1999) Massive transfusion and hyperkalaemic cardiac arrest in craniofacial surgery in a child. *Anaesth Intensive Care* 27:530–533
- Baz E, Kanazi G, Mahfouz A, Obeid M (2002) An unusual case of hyperkalaemia-induced cardiac arrest in a paediatric patient during transfusion of a "fresh" 6-day old blood unit. *Transfus Med* 12:383–386
- Hall T, Barnes A, Miller J, Bethencourt D, Nestor L (1993) Neonatal mortality following transfusion of red cells with high plasma potassium levels. *Transfusion* 33:606–609
- Brugnara C, Churchill WH (1992) Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion* 32:246–252
- Pribush A, Agam G, Yermiahu T, Dvilansky A, Meyerstein D, Meyerstein N (1994) Radiation damage to the erythrocyte membrane: the effects of medium and cell concentrations. *Free Radic Res* 21:135–146
- Weinmann M, Hoffmann W, Rodegerdts E, Bamberg M (2000) Biological effects of ionizing radiation on human blood compounds ex-vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:584–588
- Glynn IM (1985) Martonosi A (ed) *The enzymes of biological membranes*, 2nd edition vol.3. Plenum, New York, pp 35–114
- Strehler EE, Treiman M (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 4:323–335
- Axelsen KB, Palmgren MG (1998) Evolution of substrate specificities in P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 43:84–101
- Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:282–295
- Rega AF, Garrahan PJ, Barrabin H, Horenstein A, Rossi JP (1979) In: Mukohata Y, Packer L (eds) *Cation flux across biomembranes*. Academic, New York, pp 67–76
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Grubmeyer C, Penefsky HS (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 256:3718–3727
- Coelho-Sampaio T, Ferreira ST, Castro Junior EJ, Vieyra A (1994) Betaine counteracts urea-induced conformational changes and uncoupling of the human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *Eur J Biochem* 221:1103–1110
- Singh A, Singh H (1982) Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Prog Biophys Mol Biol* 39:69–107
- Suzuki Y, Tateishi N, Cicha I, Shiba M, Muraoka M, Tadokoro K, Maeda N (2000) Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium. *Clin Hemorheol Microcirc* 22:131–141
- Stark G (2005) Functional consequences of membrane damage. *J Membr Biol* 205:1–16
- Weiskopf RB, Schnapp S, Rouine-Rapp K, Bostrom A, Toy P (2005) Extracellular potassium concentrations in red blood cell suspensions after irradiation and washing. *Transfusion* 45:1295–1301
- Moroff G, Holme S, AuBuchon J, Heaton WA, Sweeney JB, Friedman LI (1999) Viability and in vitro properties of AS-1 red cells after gamma irradiation. *Transfusion* 39:128–134
- Holme S (2005) Current issues related to the quality of stored red blood cells. *Transfus Apheresis Sci* 33:55–61
- Castilho RF, Carvalho-Alves PC, Vercesi AE, Ferreira ST (1996) Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -pump induced by  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ascorbate}$  is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. *Mol Cell Biochem* 159:105–114

33. Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi FF (1996) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-Pump ATPase and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pump ATPase by Iron-Generated Free Radicals. *Biochem Pharmacol* 51:471–476
34. Siems W, Capuozzo E, Lucano A, Salemo C, Criffo C (2003) High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal. *Life Sci* 73:2583–2590
35. Leinders T, Van Kleef RG, Vijverberg HP (1992) Single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocytes: Ca<sup>2+</sup> dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta* 1112:67–74
36. Sharifi S, Dzik WH, Sadzadeh SM (2000) Human plasma and tirilazad mesylate protect stored human erythrocytes against the oxidative damage of gamma-irradiation. *Transfus Med* 10:125–130
37. Hirayama J, Abe H, Azuma H, Ikeda H (2005) Leakage of potassium from red blood cells following gamma ray irradiation in the presence of dipyridamole, trolox, human plasma or mannitol. *Biol Pharm Bull* 28:1318–1320

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)