



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020010696-1 A2



(22) Data do Depósito: 27/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

(54) Título: PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E USO DO PROCESSO

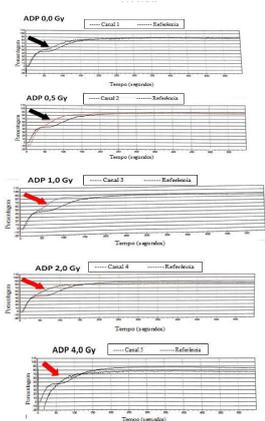
(51) Int. Cl.: G01N 33/86.

(52) CPC: G01N 33/86.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANNE MAELY MARIA DE SALES FERREIRA; IVONE ANTÔNIA DE SOUZA; ISVÂNIA MARIA SERAFIM DA SILVA LOPES; SONIA PEREIRA LEITE; RENATHA CLAUDIA BARROS SOBREIRA DE AGUIAR; YHASMINE KARINE DA SILVA; JONAS SÉRGIO DE OLIVEIRA FILHO.

(57) Resumo: PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E USO DO PROCESSO. A presente invenção descreve um processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária com radiação ionizante na faixa de 1,0 Gy a 4,0 Gy. Especificamente, a presente invenção compreende um processo que compreende as etapas de aplicação de um conjunto de técnicas qualitativas em uma amostra, avaliação das plaquetas irradiadas em comparação ao controle e avaliação da formação de agregados plaquetários. A presente invenção se situa nos campos da radiobiologia, medicina, biomedicina, farmácia, hematologia e banco de sangue.



## PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E USO DO PROCESSO

### Campo da Invenção

001. A presente invenção descreve um processo de avaliação de avaliação do potencial de agregação plaquetária com radiação ionizante na faixa de 1,0 a 4,0 Gy. A presente invenção se situa nos campos da radiobiologia, medicina, biomedicina, farmácia, hematologia e banco de sangue.

### Antecedentes da Invenção

002. As plaquetas desempenham um importante papel tanto na hemostasia primária como na fisiopatologia de várias doenças relacionadas à formação de trombos. O mecanismo de ativação plaquetário não ocorre apenas pela injúria do endotélio vascular, mas também por outros fatores. Fisiologicamente este processo pode ser atribuído a três elementos principais: redução do mecanismo que mantém as propriedades antitrombóticas do endotélio; espécies reativas de oxigênio geradas pelos fatores de risco de aterosclerose (fumo, hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes), os quais estão relacionados com grande número de plaquetas ativadas circulantes; e aumento dos mediadores protrombóticos e pró-inflamatórios na circulação ou imobilizados no endotélio.

003. A radioterapia utilizada como tratamento para tumores malignos de cabeça, pescoço e pulmão e no Linfoma de Hodgkin tem aumentado a sobrevivência de pacientes, entretanto, há um elevado risco de desenvolvimento de aterosclerose. Estudos dos efeitos das radiações ionizantes realizados em ratos demonstraram uma relação entre as células endoteliais e moléculas tais como ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e molécula de adesão do endotélio plaquetário (PCAM-1), levando a um

aumento da interação entre leucócitos e células endoteliais. Os efeitos da radiação na espécie humana causam também uma diminuição da tromborresistência endotelial por diminuição da trombomodulina e aumento da expressão do fator tecidual, o que desencadeia o processo inflamatório.

004. Em se tratando de indivíduos que estejam em tratamento radioterápico, há apenas o controle quantitativo de plaquetas e de uso de anticoagulantes orais, para a prevenção de episódios trombóticos. Porém, não é analisado o potencial de formação de grumos plaquetários e sua relação com a dose de radiação recebida, ou seja, não são analisados constituintes da hemostasia primária, principalmente em relação à ativação plaquetária fator decisivo para desencadear o início do processo da coagulação.

005. A irradiação de hemocomponentes é usualmente realizada em bancos de sangue bolsas de concentrados de plaquetas também é comumente utilizada em bancos de sangue com a finalidade de prevenir reações transfusionais graves, como a doença do enxerto versus hospedeiro associada à transfusão, que, quando manifestada tem índice de letalidade  $\geq 90\%$  dos casos. A fim de reduzir esses riscos os concentrados de plaquetas devem ser irradiados com radiação gama, com dose mínima de 25 Gy. Devido ao reduzido tempo de vida-média plaquetário e aos riscos de contaminação por suas condições de armazenamento (20 a 24°C) as plaquetas devem ser estocadas durante um intervalo de tempo de até 5 dias. Entretanto, após passarem por processos de irradiação as plaquetas têm uma sobrevida mínima de dez dias na corrente. Alguns estudos realizados *in vitro* com bolsas de plaquetas mostraram que uma irradiação acima de dose equivalente a 30 Gy, não impede a sobrevida das plaquetas, mas na agregação plaquetária ocorre redução na capacidade percentual agregante, no dia da irradiação. E, entre o terceiro e quinto dia após a irradiação ocorre uma

redução ainda maior na capacidade percentual agregante (ZIMMERMANN, 2001).

006. Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema.

007. O documento *“Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos”* de Rizzatti, E. G. e Franco, R. F publicado em julho de 2001, revela testes laboratoriais realizados para identificar distúrbios hemorrágicos como contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada para o diagnóstico de distúrbios hemorrágicos.

008. A contagem de plaquetas é um teste quantitativo, assim como a microscopia ótica (MO) que não tem por finalidade analisar as modificações celulares, nestes testes é considerado apenas o volume plaquetário e, sendo assim, o presente documento se diferencia da presente invenção.

009. O documento *“Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico”* comparados a doadores de sangue de Bernardim, P.S.M e Moreira H. W publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (v. 26, p. 239-244) em 2004 revela um teste de agregação plaquetária com análise de ondas correspondendo às fases de agregação. Entretanto o teste é realizado com doadores de sangue, diferenciando o documento da presente invenção.

010. O documento *“In vitro and In Vivo Characterization of Ultraviolet Light C-irradiated human platelets in a 2 Event Mouse Model of Transfusion”* revela um teste de agregação de plaquetas com presença de radiação e utilizando quantidades de ADP de 1,25  $\mu\text{M}$  a 80  $\mu\text{M}$ . A radiação utilizada é a radiação UV, um tipo de radiação não ionizante, que não contempla o tratamento de radioterapia, nesse aspecto o

documento se diferencia da presente invenção.

011. O documento “*Thromboembolic Ischemic Stroke and the Presence of Necrotic Platelets: A Scanning Electron Microscopy Investigation*” de Pretorius E, Engelbracht, M. e Duim, W. publicado na *Ultrastructural Pathology* (v.36, p. 19-22) em 2012 revela o uso da microscopia eletrônica por varredura (MEV) para verificar mudanças na morfologia plaquetária em indivíduos que sofreram acidente vascular cerebral tromboembólico, porém não se aplica a técnica naqueles que estejam em tratamento de radioterapia, diferenciando o documento da presente invenção.

012. O documento “*Venous thromboembolism in radiation therapy cancer patients: Findings from the RIETE registry*” de GUY, J.G., *et al.* publicado na revista *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (v.113, p. 83-89) em 2017 revela um estudo associação entre indivíduos que realizam radioterapia e a trombose. O estudo é realizado durante o tratamento da radioterapia com uso de antiagregantes plaquetários como o AAS, aplicável nos testes de agregação no caso de monitorização do paciente com relação à dose prescrita, fato este que não é a finalidade da presente invenção.

013. Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

014. Em resumo, no estado da técnica não há nenhum processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária após a exposição à radiação ou que avalie a ativação das plaquetas frente a essa exposição visando observar de maneira qualitativa, se a funcionalidade dessas plaquetas foi comprometida.

### Sumário da Invenção

015. Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de um processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária com radiação ionizante em uma faixa de 1,0Gy a 4,0Gy que avalia a hemostasia primária em indivíduos que passam por tratamento radioterápico ou sofreram a exposição acidental à radiação ionizante, ou ainda em hemocomponentes irradiados em bancos de sangue.

016. A presente invenção apresenta como conceitos inventivos os seguintes objetos.

017. A presente invenção apresenta como primeiro objeto um processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária que compreende as etapas de:

- a) Amostra de sangue ou hemoconcentrados;
- b) Aplicação de um conjunto de técnicas qualitativas na amostra da etapa a), em dito conjunto de técnicas qualitativas da etapa (a) compreender microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e teste de agregação de plaquetas;
- c) Avaliação das plaquetas irradiadas em comparação ao controle;
- d) Avaliação da formação de agregados plaquetários; e
- e) Avaliação se o porcentual mínimo de ativação plaquetária é maior ou igual a 13,04.

018. A presente invenção apresenta como segundo objeto o uso do processo definido no primeiro objeto para a avaliação do potencial de agregação plaquetária após exposição de plaquetas ou concentrados de plaquetas a radiações ionizantes.

019. Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

020. São apresentadas as seguintes figuras.

021. A Figura 1 mostra os gráficos do perfil de agregação plaquetária com ADP. Gráfico A-Perfil da dose de 0,0 Gy; gráfico B mostra o perfil da dose de 0,5 Gy; gráfico C, perfil da dose de 1,0 Gy; gráfico D mostra o perfil da dose de 2,0 Gy; o gráfico E mostra o perfil da dose de 4,0 Gy. O gráfico A representa um perfil com duas ondas, os a seta indica o início da segunda curva. Nos gráficos B, C, D e E não há distinção entre as duas ondas.

022. A Figura 2 mostra uma imagem por microscopia ótica (aumento de 1000x), onde as setas vermelhas indicam plaquetas ativadas, evidenciadas pelas alterações em suas superfícies, apresentando projeções delgadas. A seta preta indica plaqueta não ativada, na qual se observa a ausência de projeções em sua membrana.

023. A Figura 3 mostra o gráfico de análise qualitativa da agregação plaquetária com ADP (normoagregante de 65 a 100% de agregação).

024. A Figura 4 mostra o gráfico de análise qualitativa da agregação plaquetária com Epinefrina (normoagregante de 65 a 100% de agregação).

025. A Figura 5 mostra a análise plaquetária por MEV. A1, A2 e A3 representam amostras não tratadas (controle). Na dose de 0,5 Gy representada por B1, B2 e B3 podemos observar os processos de ativação e agregação tornando-se mais evidentes, e a interação com outras células sanguíneas, caracterizando a etapa final da agregação plaquetária. São observadas emissões de vários pseudópodes retos, e com prolongamentos maiores. O processo continua até a dose de 1,0 Gy (C1, C2 e C3), tendo essas alterações morfológicas ainda mais evidentes que a dose anterior. Nas doses de 2,0 Gy (D1, D2 e D3) e 4,0 Gy (E1, E2 e E3) ocorre uma diminuição progressiva das alterações morfológicas analisadas, com diminuição expressiva dos pseudópodes, que é a característica mais evidente da ativação plaquetária.

026. A Figura 6 mostra o gráfico de avaliação qualitativa da ativação plaquetária, a partir do comportamento da onda, resultante da agregação plaquetária.

027. A Figura 7 mostra o gráfico do percentual de ativação plaquetária analisado por microscopia ótica convencional.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

028. A presente invenção foi realizada a partir da coleta de amostras sanguíneas de indivíduos saudáveis em tubos com citrato de sódio ou EDTA, essas amostras foram irradiadas com radiação ionizante na faixa de 1,0 a 4,0 Gy, a fim de simular *in vitro* o que ocorre no sangue de indivíduos que passam por tratamento radioterápico ou sofreram a exposição acidental à radiação ionizante ou em bolsas de hemoconcentrados.

029. As amostras irradiadas passaram por teste de agregação, contagem de plaquetas, microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, comprovando que há uma relação direta entre dose de radiação e modificação estrutural e funcional da plaqueta.

030. Os ensaios coagulométricos e avaliação da hemostasia secundária foram realizados por dosagens de Tempo de Protrombina (TP/INR), Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa) e Dosagem de Fibrinogênio, porém os resultados não tiveram significância estatística comprovando que a irradiação não interfere nas proteínas pró-coagulantes presentes no mecanismo de Hemostasia secundária.

031. Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária que compreende as etapas de:

- a) Amostra de sangue ou hemoconcentrados;
- b) Aplicação de um conjunto de técnicas qualitativas na amostra da etapa a), em dito conjunto de técnicas qualitativas da etapa (a)

compreender microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e teste de agregação de plaquetas;

c) Avaliação das plaquetas irradiadas em comparação ao controle;

d) Avaliação da formação de agregados plaquetários; e

e) Avaliação se o percentual mínimo de ativação plaquetária é maior ou igual a 13,04.

032. Em uma concretização, a amostra na etapa (a) está em tubos com citrato de sódio ou EDTA.

033. Em uma concretização, a amostra na etapa (a) está em tubos com citrato de sódio a 3,2% e EDTA.

034. Em uma concretização, a dita amostra é de sangue ou hemoconcentrados irradiados.

035. Em uma concretização, a amostra é irradiada através de uma radiação ionizante.

036. Em uma concretização, a microscopia ótica determina projeções na superfície das plaquetas irradiadas.

037. Em uma concretização, microscopia eletrônica de varredura determina a presença de pseudópodes em plaquetas irradiadas.

038. Em uma concretização, o teste de agregação plaquetária na etapa b) está dentro dos valores normais, com percentual de agregação entre 65 a 100%.

039. Entretanto, o que caracteriza a hiperestimulação da plaqueta é o traçado do gráfico (Figura 1) de agregação plaquetária, com o agonista ADP, que não realizou a primeira onda de agregação.

040. O percentual de agregação classificado como normal ou normoagregante é de > 65% de agregação. O que foi avaliado nos testes de agregação plaquetária foi o comportamento do traçado do gráfico das amostras testes em relação ao traçado do gráfico de referência, o qual representa o traçado padrão.

041. Em uma concretização, um agonista é utilizado para teste de

agregação plaquetária.

042. Em uma concretização, o agonista é selecionado entre ADP e epinefrina.

043. Em uma concretização, o agonista é o ADP.

044. Em uma concretização, existem outras opções de agonistas, porém não são tão comumente utilizadas como o ADP para a rotina de testes de agregação. Cada agonista é utilizado com finalidade diferente. Por exemplo, a Ristocetina é utilizada para auxiliar no diagnóstico final da Doença de Von Willebrand, porém, o agonista que é utilizado em larga escala para identificação de defeitos nas glicoproteínas plaquetárias é o ADP.

045. Em uma concretização, a concentração do agonista utilizado é de 2,5  $\mu\text{M}$ .

046. A concentração utilizada neste experimento foi a mesma utilizada para as amostras de pacientes atendidos pelo HEMOPE - Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco. O equipamento de agregação plaquetária tem as concentrações configuradas e padronizadas para a realização dos testes. Portanto, essas concentrações não foram alteradas visando reproduzir “*in vitro*” o que aconteceria “*in vivo*”.

047. Em uma concretização, as plaquetas irradiadas sofreram irradiação entre 1,0 a 4,0 Gy por radiação ionizante.

048. Em uma concretização, o processo é para avaliar o potencial de agregação plaquetária após sua exposição à radiação ionizante.

049. Em uma concretização, os agregados plaquetários sugerem risco de trombogênese.

050. Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso do processo definido no primeiro objeto para a avaliação do potencial de agregação plaquetária após exposição de plaquetas ou concentrados de plaquetas a radiações ionizantes.

051. Em uma concretização, o uso do processo é para avaliar o potencial agregante de plaquetas submetidas a doses de radiações ionizantes, seja ele em banco de sangue (concentrados de plaquetas) ou em indivíduos expostos a radiações ionizantes em tratamento ou acidentalmente.

052. A presente invenção apresenta como vantagem a possibilidade de monitorar os efeitos de agregação plaquetária e formação de grumos após a administração de doses terapêuticas fracionadas de radiação em indivíduos que passam por tratamento radioterápico ou que naqueles receberam concentrados de plaquetas irradiadas e, dessa forma, prevenir o risco de trombogênese nestes.

053. Na presente invenção, ficam entendidos os conceitos abaixo.

054. Agregados plaquetários: como aqui utilizado, o termo “agregados plaquetários” refere-se aos grupos de plaquetas que se sobrepõem e amontoam-se, formadas após sua estimulação, seguida de ativação, formando-se grumos. “Grumos plaquetários” pode ser um termo também utilizado, embora o termo científico correto seja “agregados plaquetários”.

055. Potencial de agregação plaquetária: como aqui utilizado, o termo “potencial de agregação plaquetária” refere-se ao risco de formação de agregados e, conseqüentemente, risco de formação de trombos.

### **Exemplos**

056. Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

### **Metodologia da coleta de amostras**

057. Foi realizado um ensaio clínico não randomizado que consistiu na comparação entre um grupo de amostras de sangue periférico humano,

expostas a diferentes doses de radiação ionizante e um grupo controle de amostras não expostas a essa radiação. Ambos os grupos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade e conveniência.

058. O estudo foi realizado no período de março de 2016 a setembro de 2017, nos laboratórios da UNILABE (HEMOPE), Laboratório de Biofísica Celular e Molecular (LBCM/UFPE) e Laboratório de Cultura de Células (CPQAM/FIOCRUZ), com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação com Humanos do HEMOPE.

059. Foram coletadas amostras de 06 doadores de sangue voluntários saudáveis da Fundação HEMOPE de maneira aleatória, sendo que estes doadores foram convidados a participar do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A seleção dos indivíduos foi realizada após triagem e avaliação médica nas quais foram considerados aptos à doação de sangue no HEMOPE.

060. Os critérios de inclusão adotados foram: indivíduos aptos à doação de sangue no HEMOPE, do sexo masculino, com idades entre 22 e 35 anos, não tabagistas, sem uso de nenhuma medicação, principalmente sem uso de AAS, em jejum de 12 horas.

061. Os critérios de inclusão para os voluntários foram baseados nas instruções de coleta descritas no Manual de Diagnóstico Laboratorial de Coagulopatias Hereditárias, publicado em 2016 pelo Ministério da Saúde. Visto que o Fator de Von Willebrand poderia influenciar amostras de plaquetas de pessoas do sexo feminino, por questões de variações hormonais, optamos por restringir nossos ensaios apenas para indivíduos do sexo masculino, a fim de evitar dúvidas quanto aos resultados. Quanto à alimentação, solicitamos jejum de 12h a fim de evitar lipemia, o que poderia dificultar a análise da formação dos grumos plaquetários pelo equipamento. O fumo pode também estimular a formação de grumos plaquetários. Os voluntários também foram orientados a não realizarem ingestão de alimentos que contivessem ômega 3 ou que fossem

conhecidos como antiagregantes plaquetários. Foram orientados ainda a não utilizarem nenhuma medicação antiagregante plaquetária, como é o caso do AAS, pois estes podem interferir na inibição da agregação plaquetária.

062. Os critérios de exclusão adotados foram: indivíduos considerados inaptos à doação de sangue no HEMOPE, indivíduos com material biológico inadequado ou insuficiente e indivíduos que não concordaram em participar do estudo.

063. As variáveis quantitativas numéricas foram: contagem de plaquetas, porcentagem de agregação plaquetária, dosagem de fibrinogênio, porcentagem de ativação plaquetária, tempo de protrombina/razão normalizada internacional (TP/INR) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa). As variáveis qualitativas nominais foram a análise de imagens por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

064. A construção do banco de dados foi realizada no *software* Microsoft Excel (Microsoft Corporation). O emprego do programa GraphPad Prism 7, foi utilizado para avaliar a existência de associações entre variáveis quantitativa, utilizando o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as populações submetidas a doses diferentes de radiação. E, quando necessário, foi utilizado o teste post hoc de Dunn. Um valor de  $p$  menor que 0,05 foi considerado, para indicar significado estatístico.

065. A coleta, o transporte e o acondicionamento das amostras foram realizados conforme orientações do Ministério da Saúde para coleta de testes para Hemostasia, considerando as variáveis pré-analíticas.

066. Os indivíduos selecionados a partir dos critérios de inclusão e exclusão foram orientados a ter uma dieta livre de lipídeos e de alimentos que interferissem no processo de agregação plaquetário como, por exemplo, o ômega 3, obedecendo aos critérios pré-analíticos para coleta

de testes de Hemostasia conforme descrito no Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016, *Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias*, Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Especializada - Ministério da Saúde, Brasília - DF).

067. Sabendo que o controle das variáveis pré-analíticas como condições de jejum do indivíduo, coleta, transporte, processamento e armazenamento das amostras, é de grande importância para a minimização dos interferentes que podem levar a um erro laboratorial, bem como manter confiabilidade e qualidade dos resultados dos testes realizados, buscou-se tomar os devidos cuidados com o objetivo de reduzir as fontes de erros pré-analíticos.

068. Sendo assim, a coleta de 40 mL de sangue de cada voluntário foi realizada no período entre 6h00 e 7h00 da manhã, após período de jejum de 12 horas, para obter amostra de plasma límpido, livre de lipemia. A coleta para testes de Hemostasia deve ser realizada com jejum mínimo de 4h. O sistema de coleta utilizado foi o sistema de coleta à vácuo, de forma rápida sem manipulação excessiva a fim de evitar liberação de grande quantidade de fator tecidual e comprometer a fidedignidade dos testes.

069. Foram utilizados tubos padronizados de polipropileno contendo citrato de sódio di-hidratado a 3,2% tamponado, prevenindo o aumento no pH, obedecendo a proporção de 1 parte de anticoagulante para 9 partes de sangue total, indicada com uma seta no tubo de coleta.

070. Os tubos de EDTA obedeceram aos critérios estabelecidos pelo *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH). Os quais eram tubos de polipropileno, numa proporção entre 1,5 e 2,2 mg de sal anidro por mililitro de sangue, a quantidade ideal de EDTA necessária para a completa quelação do cálcio e minimização dos danos

celulares e ideal para a realização da contagem em equipamento hematológico automatizado.

071. As amostras foram coletadas obedecendo, de forma rigorosa, à sequência de preenchimento dos tubos, isto é, primeiramente preenchimento dos tubos com citrato de sódio e, por fim os tubos com EDTA, buscando evitar a contaminação indesejada dos tubos com citrato de sódio e uma possível interferência nos resultados dos testes.

072. Foram coletados cinco tubos de amostra de sangue contendo citrato de sódio di-hidratado a 3,2% tamponado como anticoagulante, em um volume total de 3,5 mL, e cinco tubos de 4,0 mL de sangue em EDTA.

073. Após a coleta das amostras em cada tubo, estes foram homogeneizados delicadamente por inversão de 8 a 10 vezes evitando a formação de coágulo e hemólise.

074. As amostras com citrato de sódio foram utilizadas para realização dos testes de agregação plaquetária, dosagem de fibrinogênio, TP/INR e TTPa. Enquanto os tubos com EDTA foram utilizados para análise morfológica das plaquetas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### Irradiação das amostras sanguíneas

075. A irradiação de sangue total *in vitro* sempre apresenta características semelhantes à irradiação *in vivo*.

076. Dos dez tubos colhidos, um de citrato de sódio e um de EDTA não foram irradiados sendo usados como controle ou dose 0,0 Gy. Os 8 tubos restantes foram irradiados com radiação ionizante em um acelerador linear do Centro de Radioterapia do IMIP (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira) nas doses de 0,5 Gy, 1,0 Gy, 2,0 Gy e 4,0 Gy sendo 1 tubo de citrato e 1 de EDTA para cada dose de irradiação. As amostras foram avaliadas antes e após a irradiação, sendo que essa radiação foi aplicada em doses variadas.

### Teste de agregação

077. Após a coleta e irradiação, o sangue citratado foi preparado para os testes de agregação através da centrifugação para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) por 5 minutos, em rotação de 377,3 g a temperatura ambiente (25°C). Após a extração do PRP, foi obtido o plasma pobre em plaquetas (PPP), pela centrifugação do sangue por 20 minutos em rotação de 2.168,25 g a 22°C, com o objetivo de obtenção do plasma como branco no teste de agregação. O PRP foi processado de imediato, e o teste de agregação realizado em seguida. A análise foi realizada em agregômetro utilizando-se para os agonistas adenosina difosfato (ADP) e epinefrina, as concentrações de 2,5 µM.

078. A agregação plaquetária é um teste qualitativo o qual avalia a funcionalidade da plaqueta *in vitro* por meio de diversas vias de ativação, tendo seu comportamento representado em um gráfico e avaliado conforme o traçado das ondas teste. Seguido do estímulo inicial ocorre uma ligação plaqueta-plaqueta intermediada por pontes de fibrinogênio na presença de cálcio. Na etapa seguinte ocorre a formação de agregados plaquetários, seguindo-se à liberação de adenosina difosfato (ADP) e de outras substâncias provenientes das organelas plaquetárias.

079. No teste de agregação plaquetária, as plaquetas são estimuladas e se agregam formando grandes grumos, que deixam passar mais luz, aumentando a transmitância. O resultado é obtido em um gráfico de ondas, no qual a primeira onda representa a resposta imediata da plaqueta após a ação do agonista. Espera-se que em testes de agregação plaquetária, em amostras de indivíduos normais, o traçado do gráfico apresente uma resposta bifásica, sendo a primeira etapa denominada primeira onda ou agregação primária, a qual é um processo de agregação reversível, e representa uma resposta induzida e imediata à estimulação da plaqueta pelo agonista. Segue-se, então, a segunda fase do processo denominada segunda onda de agregação plaquetária, etapa

irreversível durante a qual acontece a secreção ou liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários, os quais levam à mudança na morfologia plaquetária dando início à formação dos agregados.

080. Existem várias vias diferentes de ativação plaquetária, e a via ativada depende do agonista utilizado.

081. Quando a agregação é mediada pela epinefrina/adrenalina há a estimulação dos receptores, inibindo a adenilciclase, reduzindo a concentração de AMP cíclico (AMPc) intraplaquetário e interage com íons cálcio das organelas levando à ativação plaquetária, e conseqüentemente provoca a liberação do ácido aracdônico endógeno, com formação de TXA2 (tromboxano A2), permitindo a contração e secreção plaquetária. No traçado do gráfico de agregação com epinefrina, pode-se distinguir a resposta bifásica evidenciando tanto a formação da primeira onda quanto da segunda onda. Neste caso, a primeira onda representa fixação do fibrinogênio ao complexo de glicoproteínas IIb/IIIa presente na superfície da membrana plaquetária. A segunda onda corresponde à formação de TXA2 e conseqüente secreção plaquetária.

082. Quando o agonista é o ADP, na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  para agregação plaquetária, a primeira onda reflete a formação das pontes de fibrinogênio que se ligam às plaquetas e na segunda ocorre a liberação dos grânulos plaquetários.

083. O ADP liga-se a receptores plaquetários de membrana específicos levando à ativação plaquetária e desencadeando uma série de reações, as quais se expressam na modificação da forma da plaqueta, contração, mobilização e liberação dos grânulos plaquetários, culminando com a agregação plaquetária.

084. A avaliação da atividade/função plaquetária tem importância como exame complementar no diagnóstico da plaquetopatias hereditárias e no monitoramento do uso de drogas antiplaquetárias.

085. Os resultados do teste de agregação plaquetária realizados

com ADP e epinefrina nas amostras irradiadas mostraram que para todas as doses de irradiação não houve variação significativa do número de plaquetas, este foi mantido em valores normais, ou seja, de >65 a 100%.

086. A análise estatística do gráfico de ativação plaquetária realizada pelo Teste Quiquadrado, quanto ao perfil do traçado da agregação, utilizando como agonista o ADP, demonstrou que as doses de 0,0 Gy (controle) e 0,5 Gy apresentaram comportamento semelhante, com curvas de agregação normais, onde a primeira e segunda ondas estão bem delimitadas (Figura 1). A partir da dose de 1,0 Gy houve uma exacerbação na ativação, representada no gráfico de agregação por um traçado contínuo, dificultando a distinção entre a primeira e segunda onda, as quais determinam a delimitação entre a resposta primária da plaqueta ao agonista (1ª onda) e a resposta fisiológica da plaqueta após o estímulo (resposta secundária), caracterizada pela 2ª onda de agregação. Esses dados apresentaram significância estatística ( $p < 0,001$ ).

087. As doses de 2,0 Gy e 4,0 Gy tiveram uma redução na porcentagem de agregação com ADP.

088. Nos resultados da porcentagem de agregação com ADP (Figura 3) foi possível observar que todos os valores se apresentaram dentro da normalidade, sem diferença estatística após exposição às doses de radiação empregadas. Para os testes da porcentagem de agregação plaquetária com Epinefrina (Figura 4), também não houve significância estatística entre as doses. No entanto, referente à avaliação da ativação plaquetária, a partir dos gráficos resultantes da análise da agregação com ADP (Figura 1), foi possível observar que nas plaquetas irradiadas houve uma exacerbação da ativação quando comparada com o controle (nas setas temos a indicação da presença e/ou ausência da primeira onda de agregação). Para a dose 0,0 Gy, há a formação das duas ondas, enquanto para as outras doses, não há a formação da segunda onda, ou em alguns casos, uma plaqueta que não respondia após o estímulo do agonista,

quando associada com as doses de radiação, passavam a responder. Isso também pode ser observado na Figura 6, onde a partir da dose de 1,0 Gy, as plaquetas apresentaram uma exacerbação da ativação em quase todos os casos.

089. Analisando-se os dados estatísticos pelo Teste Qui-quadrado da Figura 3, quanto ao percentual de agregação (normoagregante) para o teste de agregação plaquetária com ADP, não houve significância estatística entre as doses aplicadas ( $p > 0,05$ ).

090. Analisando-se os dados estatísticos pelo Teste Qui-quadrado da Figura 4, quanto ao percentual de agregação (normoagregante) para o teste de agregação plaquetária com Epinefrina, não houve significância estatística entre as doses aplicadas ( $p > 0,05$ ).

091. Ao apresentar os dados, quanto aos doadores, em relação à ativação (Figura 6), é possível observar que a partir da dose de 1,0 Gy, a maioria deles apresentaram-se com ativação exacerbada, e a partir do teste Qui-quadrado, foi identificado que esse resultado apresentou significância estatística a partir da dose de 1,0 Gy, em relação as doses de 0,0 Gy e 0,5 Gy ( $p < 0,001$ ).

### Discussão

092. Embora para todas as doses de radiação, os testes de agregação plaquetária realizados com dois agonistas (ADP e Epinefrina), responderam bem aos ensaios (valor normal: > 65 a 100%), no teste com ADP para as doses a partir de 1,0 Gy, foi observada uma hiperestimulação (ativação excessiva) perceptível no traçado da primeira onda, na qual não há distinção visível entre a primeira e segunda onda. A primeira onda representa a resposta imediata da plaqueta após a ação do agonista. Espera-se que em testes de agregação plaquetária, em amostras de indivíduos normais, o traçado do gráfico apresente uma resposta bifásica, sendo a primeira etapa denominada primeira onda ou agregação primária, a qual é um processo de agregação reversível, e representa uma

resposta induzida e imediata à estimulação da plaqueta pelo agonista. Segue-se, então, a segunda fase do processo denominada segunda onda de agregação plaquetária, etapa irreversível durante a qual acontece a secreção ou liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários os quais levam à mudança da morfologia plaquetária dando início à formação dos agregados (MOREIRA; BERNARDI, 2004).

093. A análise estatística do gráfico de ativação plaquetária (Figura 6) realizada pelo Teste Qui-quadrado, quanto ao perfil do traçado da agregação, utilizando como agonista o ADP, demonstrou que as doses de 0,0 Gy (controle) e 0,5 Gy apresentaram comportamento semelhante, com curvas de agregação normais, onde a primeira e segunda ondas estão bem delimitadas, conforme demonstrado na Figura 1. A partir da dose de 1,0 Gy houve uma exacerbação na ativação, representada no gráfico de agregação por um traçado contínuo (Figura 1), dificultando a distinção entre a primeira e segunda onda, as quais determinam a delimitação entre a resposta primária da plaqueta ao agonista (1ª onda) e a resposta fisiológica da plaqueta após o estímulo (resposta secundária), caracterizada pela 2ª onda de agregação. Esses dados apresentaram significância estatística ( $p < 0,001$ ).

094. A agregação mediada pela epinefrina estimula os receptores, inibindo a adenilciclase, reduz a concentração de AMP cíclico intraplaquetário e interage com íons cálcio das organelas levando à ativação plaquetária, e conseqüentemente provoca a liberação do ácido aracdônico endógeno, com formação de TXA<sub>2</sub>, permitindo a contração e secreção plaquetária. No traçado do gráfico de agregação com epinefrina pode-se distinguir a resposta bifásica evidenciando tanto a formação da primeira onda quanto da segunda. Neste caso a primeira onda representa a fixação do fibrinogênio ao complexo de glicoproteínas IIb/IIIa presente na superfície da membrana plaquetária. A segunda onda corresponde à formação de TXA<sub>2</sub> e conseqüente secreção plaquetária (MOREIRA;

BERNARDI, 2004).

095. A epinefrina atua ativando as plaquetas por meio dos receptores alfa-adrenérgicos, exercendo importante papel no processo da trombogênese. Ela pode, além de provocar a exposição dos receptores de fibrinogênio, iniciar o processo de ligação entre fibrinogênio e plaquetas, do qual resultará o processo de agregação plaquetária, quando na ausência de outros agonistas, como ADP, serotonina, fator de ativação plaquetário e trombina (HAYES; KITAHARA; TECHEMIANTCHOUK, 2014).

096. O fibrinogênio tem papel essencial no mecanismo de agregação plaquetária induzida pelo ADP (CARTWRIGHT *et al.*, 2015). Receptores plaquetários específicos para fibrinogênio expressam-se rapidamente quando expostos ao ADP. As plaquetas não agregam sem a presença do fibrinogênio, o qual é dependente da concentração plasmática. Em indivíduos com afibrinogenemia há diminuição da resposta ao ADP. O fibrinogênio é o mediador que faz as pontes de ligação plaqueta-plaqueta (MARGUERIE; EDGINGTON; PLOW, 1980). Todos os doadores apresentaram concentrações plasmáticas dentro dos valores de referência normais. Embora o fibrinogênio seja peça chave na formação do coágulo ao longo da cascata de coagulação, resultando na conversão de fibrina, destacando-se como proteína marcadora de fase aguda nas doenças vasculares inflamatórias e em processos de injúria vascular, como na formação da aterosclerose (PRETORIUS *et al.*, 2013), não foram encontradas alterações significativas relacionadas às dosagens deste marcador no presente trabalho.

097. Ao utilizarmos o ADP (adenosina difosfato) como agonista, na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  para agregação plaquetária, a primeira onda reflete a formação das pontes de fibrinogênio que se ligam às plaquetas e na segunda ocorre a liberação dos grânulos plaquetários. Porém, Moreira *et al.* (2004) comprovou em seu estudo que quando foram utilizadas as concentrações de 3  $\mu\text{M}$  de ADP não houve distinção da

primeira onda em relação à segunda onda, que representa uma resposta intensa ao estímulo recebido, caracterizando um estado de hiperatividade (MOREIRA; BERNARDI, 2004). A hiperagregação de plaquetas pode levar ao fenômeno da trombogênese, obstrução vascular e, conseqüentemente, à isquemia (SILVA; D'AMICO, 2010).

098. A resposta à epinefrina ocorre em duas fases, sendo a primeira onda mais limitada e a segunda mais expansiva. A primeira onda se forma mais rapidamente, na qual necessita da geração de tromboxano e onde ocorre a liberação de ADP e ATP presentes nos grânulos densos. O ADP secretado potencializa o efeito da segunda onda de agregação com epinefrina com outros de menor intensidade (MICHELSON *et al.*, 2013).

099. O ADP liga-se a receptores plaquetários de membrana específicos levando à ativação plaquetária e desencadeando uma série de reações, as quais se expressam na modificação da forma da plaqueta, contração, mobilização e liberação dos grânulos plaquetários, culminando com a agregação plaquetária. Embora as diferentes vias utilizadas no teste de agregação plaquetária estejam interligadas, o resultado dependerá da concentração e do tipo de agonista empregado no ensaio *in vitro* após a adição do agonista a formação dos agregados plaquetários resulta em uma redução da absorvância da luz, aumento da luz transmitida e da densidade ótica. O resultado é detectado pelo agregômetro que se utiliza da técnica de nefelometria. Utilizando-se a epinefrina como agonista tem-se resultados semelhantes aos do ADP sem exposição à radiação ionizante (KITCHEN, 2010). Porém, no presente trabalho, observa-se que estando ausente a onda secundária quando do estímulo do ADP associado a doses de radiação a partir de 1,0 Gy, o traçado da onda não se altera quando o agonista é a epinefrina associada à radiação.

100. Em relação à quantidade de plaquetas, de acordo com o Gráfico 4, para todas as doses de radiação estudadas, não houve variação

significativa, permanecendo elas dentro dos valores de normalidade, o que já era esperado, baseado em estudos de irradiação de bolsas de plaquetas, com doses muito mais elevadas.

101. Embora alguns estudos tenham ressaltado a importância de correlação do volume plaquetário médio (MPV - Mean Platelet Volume) como biomarcador e fator de risco elevado na morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares (SHAH *et al.*, 2014), bem como sua relação com o elevado valor preditivo para o desenvolvimento de eventos tromboembólicos (FERRONI *et al.*, 2014), não identificamos variações significativas no MPV entre as doses analisadas.

102. As análises realizadas por MO (Figura 2) permitiram a observação da ativação plaquetária por meio da visualização de delgadas/discretas projeções em sua superfície. Os resultados apresentados demonstraram uma relação de plaquetas ativadas/plaquetas contadas (Tabela 1), maior na dose de 1,0 Gy, quando comparada ao controle (0,0 Gy). Em doses maiores essa relação diminuiu, o que nos permite supor a possibilidade de danos estruturais, para doses superiores a 1,0 Gy. Uma investigação mais detalhada de fatores que possam estar envolvidos neste processo merece ser realizada, tendo em vista que há ausência de informação na literatura, para as doses estudadas nesse trabalho.

103. Em estudo realizado por Pretorius *et al.*, em 2012, foram observadas, por meio de MEV, alterações morfológicas plaquetárias após ativação. Para isso, eles avaliaram um grupo controle com plaquetas de indivíduos saudáveis e outro grupo de indivíduos que sofreram tromboembolismo isquêmico em decorrência de acidente vascular encefálico (AVE), o qual está diretamente relacionado a um estado procoagulante. As plaquetas de indivíduos trombóticos (AVE) apresentam-se inchadas e suas membranas com proeminências em forma de lágrimas. Nas análises, por MEV (Figura 5), realizadas nesse trabalho

também foi possível verificar o processo de ativação mais evidente para as doses de 0,5 e 1,0 Gy, com o aumento do número de pseudópodes, e com os mesmos mais longos. Já para as doses a partir de 2,0 Gy, esses pseudópodes começam a ficar mais curtos, como se a ativação estivesse diminuindo, contudo, a agregação parece aumentar com a dose, inclusive agregando células sanguíneas. Os resultados encontrados na análise por MEV (Figura 5) se assemelham aos obtidos por MO (Figura 2).

104. A agregação crescente com a dose, observada na MEV (Figura 5), remete a uma hipercoagulabilidade, baseado numa sequência de eventos que podem ocorrer, as quais foram observadas no estudo de Pretorius *et al.*, em 2012, onde em condições inflamatórias a disposição das fibras da rede de fibrina, está alterada. Em indivíduos saudáveis, na presença de trombina são encontradas fibras grandes, grossas e finas organizadas aleatoriamente. Em indivíduos doentes tendem a formar um emaranhado de fibras mais espessas a fim de formar placas de fibrina. Esta mudança morfológica na formação da rede de fibrina também tem sido observada em fumantes. Em pacientes diabéticos é frequente o achado de plaquetas que sofreram apoptose. Nestas podem ser encontradas estruturas morfológicas típicas, apresentando formação de bolhas na sua membrana e a presença de micropartículas indicando processo de ativação ou apoptose. Tais eventos estão comumente associados a doenças com comprometimento vascular e hipercoagulabilidade, como diabetes mellitus e doenças inflamatórias sistêmicas.

105. Em estudo realizado em 2015, Swanepoel e Pretorius compararam plaquetas de não gestantes com plaquetas de gestantes durante três fases da gravidez, analisadas por meio de MEV. No grupo controle (não grávidas) foram observadas plaquetas com formas esféricas e não esféricas ou apenas com um pseudópode, algumas apresentando poros de abertura evidenciando sistema canalicular para trocas

transmembrana, mas não foi observada interação entre plaquetas. No grupo no início da gestação foi observada quantidade bastante elevada de poros transmembrana, presença de bolhas na membrana, vários pseudópodes em todas as plaquetas e interações entre plaquetas adjacentes em comparação às do controle (não tão compactas). Estes achados foram semelhantes aos encontrados no final da gestação, e podem persistir por até dois meses após o parto, ressaltando o estado de hipercoagulabilidade materno durante este período. A mudança conformacional com a consequente projeção de seus pseudópodes marca o início do processo de adesão e agregação plaquetários. A formação de vesículas (bolhas) visíveis ao MEV na superfície plaquetária, um indicativo do início do processo de apoptose, é resultante da elevação dos níveis de trombina e, conseqüentemente, da ativação plaquetária. Algumas alterações do trabalho de Swanepoel e Pretorius, 2015, corroboram com os achados obtidos neste estudo, quando da análise por MEV.

106. Ao associarmos os resultados por MO, MEV e agregação obtidos no presente trabalho, é possível perceber que a dose de radiação ionizante de 1,0 Gy, leva a uma ativação plaquetária e conseqüentemente a uma maior agregação, podendo ser um importante fator desencadeador no processo de formação da trombose. Porém, nas doses subsequentes (2,0 Gy e 4,0 Gy) ocorre uma aparente perda da ativação, mas que após ter disparado o processo de agregação, o mesmo se mantém, quando da avaliação por MEV e agregação. Modelos de experimentação animal têm sido estudados para elucidar as causas da trombogênese e sua relação com o mecanismo de ativação plaquetário. Um estudo de Spuy *et al.* publicado em 2013 com MEV relacionou alterações ocorridas em superfícies plaquetárias e emissão de pseudópodes em ratos, após administração de estrogênio, com o mecanismo de ativação plaquetário e a trombogênese na isquemia cerebral. O referido estudo ressalta o importante papel das alterações

morfológicas observadas durante a ativação plaquetária relacionado à progressão dos eventos ocorridos na isquemia cerebral, sugerindo a utilização das plaquetas como parâmetro na evolução clínica do indivíduo (SPUY *et al.*, 2013).

107. As dosagens coagulométricas para avaliação da Hemostasia Secundária - dosagem de fibrinogênio, Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa) não apresentaram diferença estatística. Esses resultados sugerem não haver danos quanto ao mecanismo da Hemostasia Secundária após irradiação, reforçando a hipótese de que a irradiação aparentemente não interfere nas proteínas pró-coagulantes presentes no mecanismo de Hemostasia Secundária.

#### Contagem de plaquetas

108. A contagem automatizada é realizada pelo método de impedância elétrica, baseada em uma análise dimensional e na determinação de mudanças na resistência elétrica depois que as células, incluindo as plaquetas, atravessarem um orifício e produzirem um sinal de pulsos elétricos.

109. De cada amostra irradiada foram preparados cinco esfregaços, imediatamente após a chegada ao laboratório, a fim de preservar as células e diminuir a interferência com o EDTA. As lâminas quais foram coradas pelo May-Grunwald-Giemsa, e foram analisadas em microscópio Olympus CX 22, em objetiva de imersão, com aumento de 1000x. Para cada dose foram contadas 1000 plaquetas as quais foram selecionadas entre ativadas e não ativadas. A relação do número de plaquetas ativadas e do número de plaquetas contadas para cada dose de radiação foi multiplicada por 100, dando origem a porcentagem de plaquetas ativadas em cada dose de radiação.

110. A análise dos resultados de contagem demonstrou um aumento significativo na porcentagem de plaquetas ativadas nas doses de 0,5 Gy e 1,0 Gy. Enquanto nas doses de 2,0 Gy e 4,0 Gy ocorreu uma diminuição

da porcentagem de ativação.

Tabela 1 - Resultados da contagem de plaquetas (% de plaquetas ativadas) obtidos

RADIAÇÃO RECEBIDA	0,0 Gy	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
AMOSTRAS	% ATIVAÇÃO (n° de plaquetas ativadas)				
JS 1	24,00	37,00	64,00	51,00	37,00
JS 2	39,23	33,70	20,10	40,29	56,00
IL 1	25,17	41,82	54,05	18,99	15,95
IL 2	18,46	35,71	55,31	30,45	32,00
WI	25,05	35,15	38,09	35,15	30,80
P	27,43	29,81	72,85	30,96	35,43

111. O cálculo para obtenção do percentual de ativação plaquetário foi realizado observando-se a morfologia plaquetária, comparando-se a emissão de pseudópodes e projeções em plaquetas ativadas, com plaquetas sem emissão de pseudópodes e projeções em plaquetas não ativadas, através de Regra de Três Simples.

112. O cálculo foi feito conforme indicado abaixo:

\*N° de plaquetas contadas - 100%

N° de plaquetas ativadas - X%

X= Percentual de plaquetas ativadas

\*Foram contados vários campos até atingir um total mínimo 2.000 plaquetas contadas.

113. Ressaltamos que este cálculo atrelado às alterações morfológicas, nunca havia sido utilizado para este fim.

### Discussão

114. A análise por microscopia ótica revelou a presença de plaquetas ativadas, tanto nas plaquetas não irradiadas quanto nas

irradiadas, contudo, de acordo com a técnica de contagem aplicada, foi possível calcular a porcentagem de plaquetas ativadas para cada dose de radiação, o que demonstrou um aumento significativo na porcentagem de plaquetas ativadas nas doses de 0,5 Gy e 1,0 Gy; e uma redução progressiva dessa porcentagem de ativação com o aumento das doses para 2,0 Gy e 4,0 Gy, conforme Figura 7.

115. O gráfico da Figura 7 representa o percentual de ativação plaquetária após análise em microscopia ótica convencional. A análise estatística pelo Teste Kruskal-Wallis, com post hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ) demonstrando diferença estatística entre as doses de 0,0 Gy (controle) e 1,0 Gy.

116. A contagem de plaquetas ativadas contribuiu para o resultado. Pois, corroborou com os achados encontrados tanto nos ensaios de agregação plaquetária quanto nos de MEV, criando-se um novo parâmetro e uma nova técnica para distinção entre plaquetas ativadas e não ativadas, a qual pode ser implementada a fim de auxiliar na descrição de plaquetas em microscopia ótica convencional.

#### Microscopia ótica (MO)

117. A identificação morfológica das plaquetas ativadas foi resultante da análise dos esfregaços por microscopia ótica.

118. Essas análises permitiram a observação de plaquetas ativadas, tanto nas plaquetas não irradiados quanto nas irradiadas, por meio da visualização de delgadas/discretas projeções e pseudópodes na superfície dessas plaquetas, bem como de alterações da forma original discóide.

119. Os resultados apresentados demonstraram uma relação plaquetas ativadas/plaquetas contadas, maior na dose de 1,0 Gy, quando comparada ao controle (0,0 Gy). Em doses maiores, essa relação diminui, o que nos permite supor a possibilidade de danos estruturais, para doses superiores a 1,0 Gy.

120. Não foram observadas relações entre o volume plaquetário

médio e a emissão de pseudópodes na ativação plaquetária.

#### Preparo de lâminas e resultados da MEV

121. As amostras foram coletadas em tubos de citrato de sódio, centrifugadas a 1.780 g, durante 20 minutos, à temperatura de 25°C, obtendo-se o PPP (plasma pobre em plaquetas), e processadas em coagulômetro conforme protocolo do fabricante do equipamento.

122. O preparo do PRP (plasma rico em plaquetas) para o pellet de plaquetas, utilizado na montagem das lamínulas da MEV, foi realizado com mesmo protocolo aplicado no teste de agregação plaquetária.

123. Os pellets de plaquetas foram obtidos pela centrifugação do PRP a 1.308 g, durante 5 minutos, retirado o sobrenadante e adição do fixador (solução de glutaraldeído a 25% e para-formaldeído a 4%), homogeneizando delicadamente o pellet. As soluções foram transferidas para tubos de fundo cônico de 1,5 mL adicionando-se 1,0 mL de tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. Os tubos foram mantidos a temperatura de 4-8°C durante 12 dias.

124. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 20.929 g durante 3 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Ao final da última lavagem, foi desprezado o sobrenadante, ressuspendido o pellet e transferido gota a gota, delicadamente, até cobrir totalmente a superfície da lamínula. Foram utilizadas lamínulas de 13 mm dispostas no fundo dos poços de uma placa para cultura de células com 24 poços. Sobre elas adicionou-se solução de poli-L-lisina a 0,1 %.

125. Após 30 minutos as amostras foram pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 2% e ferricianato de potássio, na proporção de 1:1. Passados 15 minutos foi descartado o excesso da solução, colocando a placa para secar em estufa a 37°C e desidratado em solução de álcool etílico a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com intervalos de 10 minutos. As amostras foram montadas em duplicata. Em seguida foram

levadas para equipamento de ponto crítico para substituição gradativa do solvente (etanol) por CO<sub>2</sub> líquido.

126. Foram adicionadas às lamínulas cola de prata. As lamínulas foram acopladas a suportes apropriados, levadas ao metalizador e pulverizadas com lâmina de ouro. Após o processo foram armazenadas em dissecador até o momento da análise em MEV.

127. A montagem e preparo das lamínulas, bem como as imagens em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-Recife.

128. A MEV teve como finalidade determinar qual seria, fisiologicamente e morfológicamente, o comportamento da plaqueta frente a doses terapêuticas fracionadas de radiação, também utilizadas na radioterapia, e quais as modificações relevantes ocorridas na superfície plaquetária quando relacionadas a essas doses, estimando os riscos de ocasionar a trombogênese.

129. Acompanhando a exacerbação bem caracterizada pelo parâmetro de ausência ou presença da primeira e da segunda onda de agregação plaquetária conforme as doses de radiação recebidas, foram observadas na MEV um aumento evidente do número de pseudópodes, bem como um aumento no comprimento dessas projeções (pseudópodes), até a dose de 1,0 Gy, conforme demonstrado pela figura 5 anexada. A dose de 1,0 Gy corresponde, segundo o experimento, à dose onde há um maior risco de formação de agregados plaquetários. A partir da dose de 2,0 Gy há uma redução desse risco, o que sugere que a plaqueta perdeu suas características funcionais de agregação diminuindo o risco de formação de agregados.

130. A partir dessas observações, concluiu-se que existe uma relação direta entre a dose de radiação recebida e a modificação estrutural e funcional da plaqueta, importante fator para o início da trombogênese.

### Ensaio coagulométricos e avaliação de hemostasia secundária

131. Para os ensaios coagulométricos e avaliação da hemostasia secundária foram realizadas as dosagens de Tempo de Protrombina (TP/INR), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e Dosagem de Fibrinogênio.

132. Nestes testes, não foram verificadas alterações significativas entre as doses de radiação aplicadas, sugerindo não haver danos quanto ao mecanismo da hemostasia Secundária após irradiação, reforçando a hipótese de que a irradiação não interfere nas proteínas pró-coagulantes presentes no mecanismo de Hemostasia secundária.

### Conclusão

133. Com base no aumento de variações em unidades percentuais entre as doses de 0,0 Gy até 1,0 Gy, as quais representam os valores percentuais de plaquetas ativadas representados na Tabela 1, e, segundo os resultados obtidos na MEV e agregação plaquetária, os quais apontam para um aumento na exacerbação da agregação plaquetária a partir do início do processo de radiação, chegamos ao valor de 13,04 como limite mínimo aceitável para menor risco de formação de agregados e, conseqüentemente, risco de formação de trombos, a partir da dose de radiação de 1,0 Gy. Pelos nossos resultados, pudemos observar que esta dose apresenta maior risco de formação de agregados.

134. O aumento mínimo de variação em unidades percentuais para a ativação plaquetária observada na microscopia ótica, entre o intervalo da dose de 0,0 Gy até a dose que representa significância estatística (1,0 Gy), quando seus resultados estão relacionados aos resultados de ensaios de agregação plaquetária e MEV, representa o percentual mínimo, em unidades percentuais, de 13,04. A partir deste valor, conforme demonstrado em nossos experimentos, consideramos que há um risco iminente de formação de agregados plaquetários e, conseqüentemente, risco elevado de formação de trombos. A Tabela 2 constata a variação em

unidades percentuais entre as doses de 0,0 Gy e 1,0 Gy.

135. Foram consideradas apenas as amostras que obtiveram significância estatística, amostras com percentual crescente entre as doses de 0,0 e 1,0 Gy. As amostras hipoagregantes para o teste de agregação plaquetária foram excluídas nesta avaliação de variação de unidades percentuais entre as doses de 0,0 e 1,0 Gy.

Tabela 2 - Variação em unidades percentuais entre os percentuais relativos às doses de 0,0 Gy e 1,0 Gy

% ATIVAÇÃO			
LÂMINAS	0,0 Gy	Variação (%)	1,0 Gy
JS 1	24,00	40	64,00
IL 1	25,17	28,88	54,05
IL 2	18,46	36,85	55,31
WI	25,05	13,04	38,09
P	27,43	45,42	72,85

136. Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

### Referências

137. ANJOS, C. S.; BARBOSA. A. F. S. Avaliação da agregação plaquetária em pacientes diabéticos em um laboratório de análises clínicas em Belém, Revista Paraense de Medicina. V.29 (1), p. 17-22, 2015.

138. BADIMON L.; PADRÓ, T.; VILAHUR G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease - Review, European

Vascular Journal: Acute Cardiovascular Care. 1(1) p. 60-74, 2015.

139. BADIMON L.; PADRÓ, T.; VILAHUR G. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis, Medicina cardiovascular traslacional, Rev Esp Cardiol.; 62(10):p. 1161-1178, 2009.

140. BITHELL T. C.; FORESTER J. Abordagem diagnóstica das desordens do sangramento. In: LEE G. R. *et al.*, Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole, v 2, cap. 48, p. 1.427-1.457, 1998.

141. BORN G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, Nature. n° 4832, p. 927-929, 1962.

142. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Especializada, Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias, Brasília - DF, 2016.

143. BUCCI F. *et al.* Radiotherapy-related axillary arteriopathy thoracic, Case Report - Thoracic, Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery, n° 15, 176-177, 2012.

144. CARTWRIGHT B. L. *et al.* Efficacy of Fibrinogen Concentrate Compared With Cryoprecipitate for Reversal of the Antiplatelet Effect of Clopidogrel in an In Vitro Model, as Assessed by Multiple Electrode Platelet Aggregometry, Thromboelastometry, and Modified Thromboelastography. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, Vol 29, No3: p. 694-702, 2015.

145. CASTRO H.C. *et al.* Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. J Bras Patol Med Lab.42(5): p. 321-332, 2006.

146. COMAR S. R.; DANCHURAS H. S. M.; SILVA P. H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

147. FAILACE R.; PRANKE P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 26(3): p.159-166, 2004.

148. FARIAS M.G; BÓ S.D. Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário médio. J Bras Patol Med Lab;46(4): p. 275-281, 2010.

149. FERRONI P. *et al.* Evaluation of mean platelet volume as a predictive marker for cancer-associated venous thromboembolism during chemotherapy, Haematologica 99(10), p. 1638-1644, Ferrata Storti Foundation, 2014.

150. FRANCO R. F. Fisiologia da Coagulação do Sangue e da Fibrinólise, In: ZAGO M. A.; FALCÃO R. P.; PASQUINI R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu, p. 749-755, 2001.

151. GERALDO R.B. *et al.* Platelets: Still a Therapeutical Target for Haemostatics Disorders. International Journal of Molecular Sciences, p. 17901-17919, 2014.

152. GURBEL P. A. *et al.* Platelet-Mediated Thrombosis From Bench to Bedside, Circulation Research, n° 29, p. 1380-1391, 2016.

153. HAYES C.; KITAHARA S.; TEHEMIANTCHOUK O. Decreased threshold of aggregation to low-dose epinephrine is evidence of platelet hyperaggregability in patients with thrombosis. Hematology Reports; volume 6, p. 53-26, 2014.

154. HOFFBRAND A. V.; MOSS P. A. H. Fundamentos em Hematologia, 6ª edição, p. 320-326, Artmed, 2013.

155. HOVING S. *et al.* Irradiation induces different inflammatory and thrombotic responses in carotid arteries of wildtype C57BL/6J and atherosclerosis-prone ApoE/ mice, Radiotherapy and Oncology n° 105, p. 365-370, 2012.

156. KITCHEN S.; McCRAW A.; ECHENAGUCIA M. Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A Laboratory Manual, Second Edition (2010), World Federation of Hemophilia (WFH), 2010.

157. LANDI E. P.; JÚNIOR MARQUES J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo - Revisão, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, n°

25(1): p. 39-46, 2003.

158. LOURENÇO D. M. Avaliação Laboratorial da Hemostasia, In: ZAGO M. A.; FALCÃO R. P.; PASQUINI R. Hematologia: Fundamentos e Prática, São Paulo: Atheneu, p. 749-755, 2001.

159. MARGUERIE G. A.; EDGINGTON T. S.; PLOW E. F. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *Journal of Biology and Chemistry* 255, p. 154-161, 1980.

160. MICHELSON A. D. *et al.* In: Platelets. Platelet Aggregation, p. 559-580, Elsevier, 3ª Edition, 2013.

161. MOREIRA H. W.; BERNARDI P. S. M. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 26(4):239-244, 2004.

162. OBERHOLZER H. M.; SCHOOR C. D.; PRETORIUS E. The Effect of Sibutramine on Platelet Morphology of Sprague-Dawley Rats Fed a High Energy Diet, *Microscopy Research and Thechnique*, n 76, p. 653-65, 2013.

163. PANOVA-NOEVA M. *et al.* ADP-induced platelet aggregation and thrombin generation are increased in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera, *Thrombosis Research*, n° 132, p. 88-93, 2013..

164. PRETORIOUS E. *et al.* Novel Use of Scanning Electron Microscopy for Detection of Iron-Induced Morphological Changes in Human Blood, *Microscopy Research and Thechnique*, n° 76, p. 268-271, 2013.

165. PRETORIUS E. ENGELBRECHT M. J., DUIM W. Thromboembolic Ischemic Stroke and the Presence of Necrotic Platelets: A Scanning Electron Microscopy Investigation, *Ultrastructural Pathology*, 36(1), p.19-22, 2012.

166. REIS C. V. *et al.* Avaliação de coagulação, fibrinólise e proteína

C em pacientes de risco e com doenças coronarianas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, nº 1, p. 7-13, 2002.

167. REZENDE S.M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. *Revista Médica de Minas Gerais*; 20(4), p. 534-553, 2010.

168. RIZZATTI E.G, FRANCO R. F. Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos. Simpósio: Hemostasia e Trombose, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Capítulo II, p. 34:238-247, 2001.

169. RODRIGUES *et al.* Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

170. ROGER M. *et al.* Ultrastructural morphometric analysis of human blood platelets exposed to minimal handling procedures, *APMIS*, nº 100: p. 922-929, 1992

171. ROOY M. J. *et al.* Platelet hyperactivity and fibrin clot structure in transient ischemic attack individuals in the presence of metabolic syndrome: a microscopy and thromboelastography study. *Cardiovascular Diabetology*, p. 14:86, 2015.

172. SCHOORL M. *et al.* Aspects of platelets disturbances in haemodialysis patients - Minireview, *Clin Kidney Journal* (6), p. 266-271, 2013.

173. SHAH B. *et al.* Mean platelet volume reproducibility and association with platelet activity and anti-platelet therapy, *National Institutes of Health - NIH*, nº 25(3): p. 188-192, 2014.

174. SILVA L. L.; D'AMICO E. A.. Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; nº 32(6): p. 463-468, 2010.

175. SPUY J. V. D.; PRETORIUS E. A Place for Ultrastructural Analysis of Platelets in Cerebral

176. Ischemic Research. Microscopy Research and Thechnique, p. 1-8, 2013.

177. SWANEPOEL A. C.; PRETORIUS E. Ultrastructural analysis of platelets during three phases of pregnancy, Hematology, Vol. 20 n°. 1, p. 39-47, 2015.

178. WANG P. L.; CHENG Y.B.; KEUERBAN G. The Clinical Characteristic Differences between Thrombosis-related Edema and Lymphedema Following Radiotherapy or Chemoradiotherapy for Patients with Cervical Cancer, J. Radiat. Res., n° 53, p. 125-129, 2012.

179. WEYRICH A. S. Platelets: more than a sack of glue, Hematology, p. 400-403, 2014.

180. WOOLLEY R. *et al.* A rapid, topographical platelet activation assay. Analyst, n° 138, p. 4512 - 4518, 2013.

181. ZHI L.; CHI X.; VOSTAL J. G. In vivo and in vitro characterization of ultraviolet light C-irradiated human platelets in a 2 event mouse mode of transfusion. Plos One, Volume 8, n° 11, p. 722- 731, 2013.

182. ZIMMERMANN R. *et al.* Effect of gamma radiation on the in vitro aggregability of WBC-reduced apheresis platelets, Transfusion, Volume 41, p. 236-242, 2001.

183. XU X. R. *et al.* Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies, Thrombosis Journal, n° 14 (Suppl 1):29, p. 37-46, 2016.

### **Reivindicações**

1. Processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) Amostra de sangue ou hemoconcentrados;
- b) Aplicação de um conjunto de técnicas qualitativas na amostra da etapa a), em dito conjunto de técnicas qualitativas da etapa (a) compreender microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e teste de agregação de plaquetas;
- c) Avaliação das plaquetas irradiadas em comparação ao controle;
- d) Avaliação da formação de agregados plaquetários; e
- e) Avaliação se o percentual mínimo de ativação plaquetária é maior ou igual a 13,04.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela amostra na etapa a) estar em tubos com citrato de sódio ou EDTA.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela dita amostra na etapa a) ser uma amostra de sangue ou hemoconcentrados irradiados.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pela a amostra ser irradiada através de uma radiação ionizante.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela utilização de um agonista no teste de agregação plaquetária na etapa b) selecionado entre ADP e epinefrina.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo teste de agregação plaquetária tem um percentual de agregação de 65 a 100%.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelas ditas plaquetas irradiadas terem sofrido irradiação entre 1,0 Gy a 4,0 Gy por radiação ionizante.

8. Uso do processo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por avaliar o potencial de agregação

plaquetária após exposição de plaquetas ou concentrados de plaquetas a radiações ionizantes.

FIGURAS

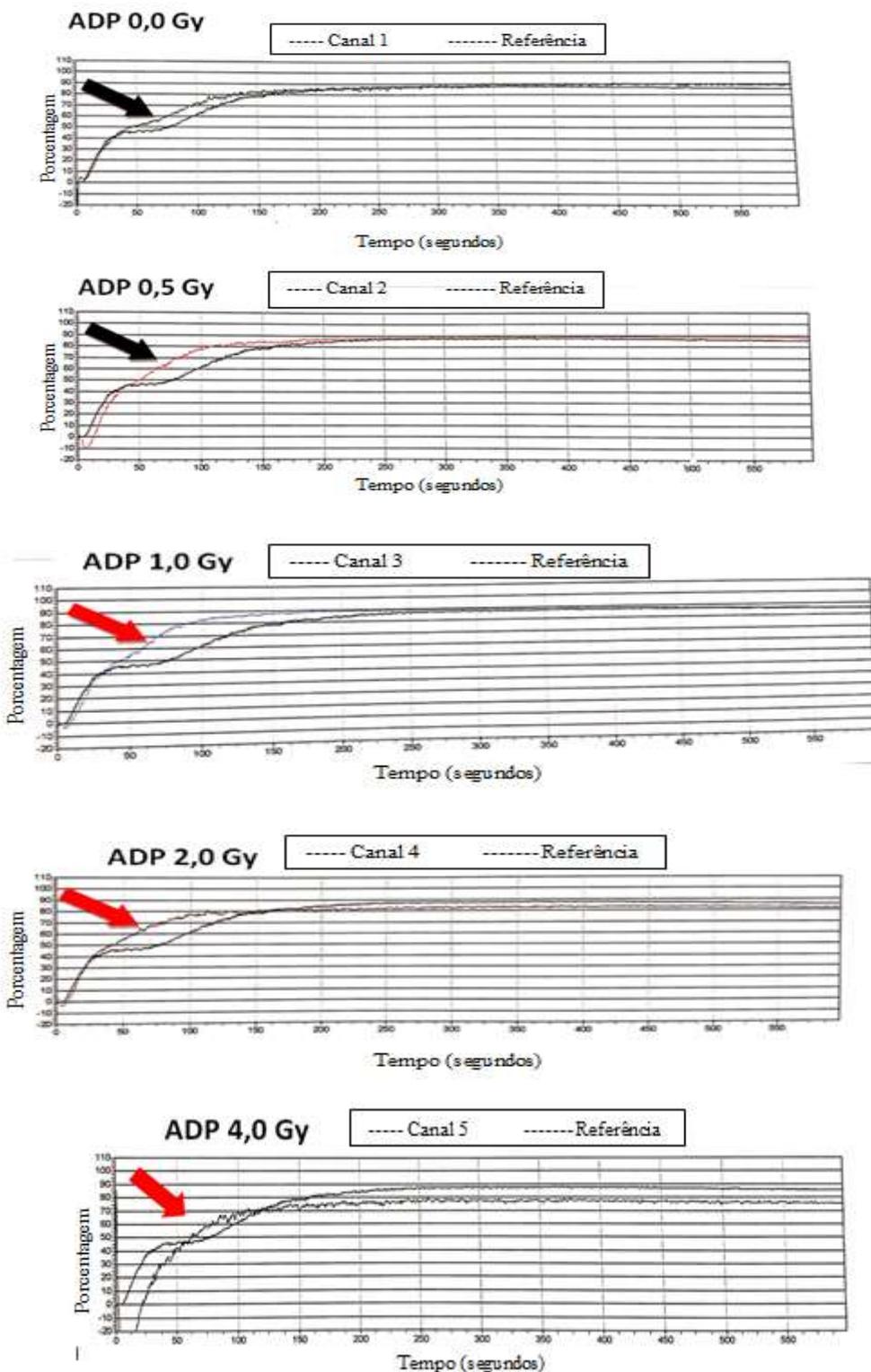


Figura 1

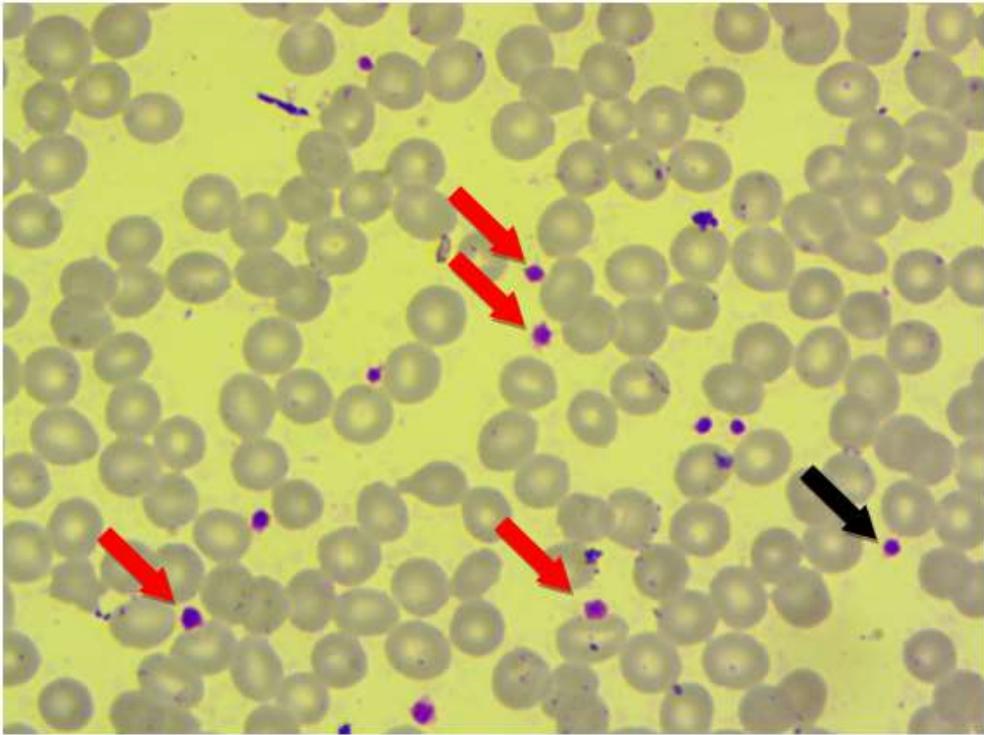


Figura 2

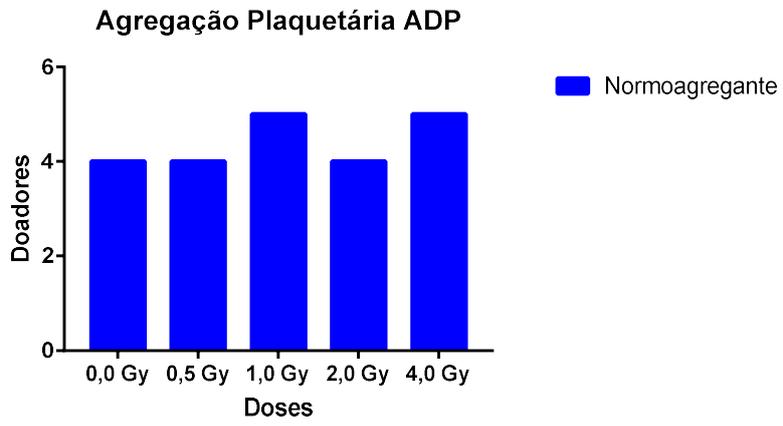


Figura 3

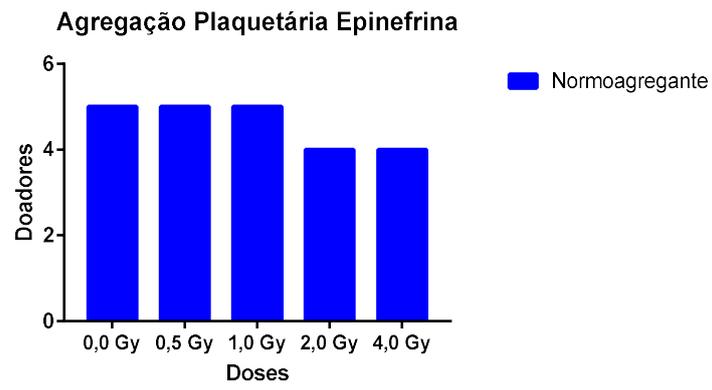


Figura 4

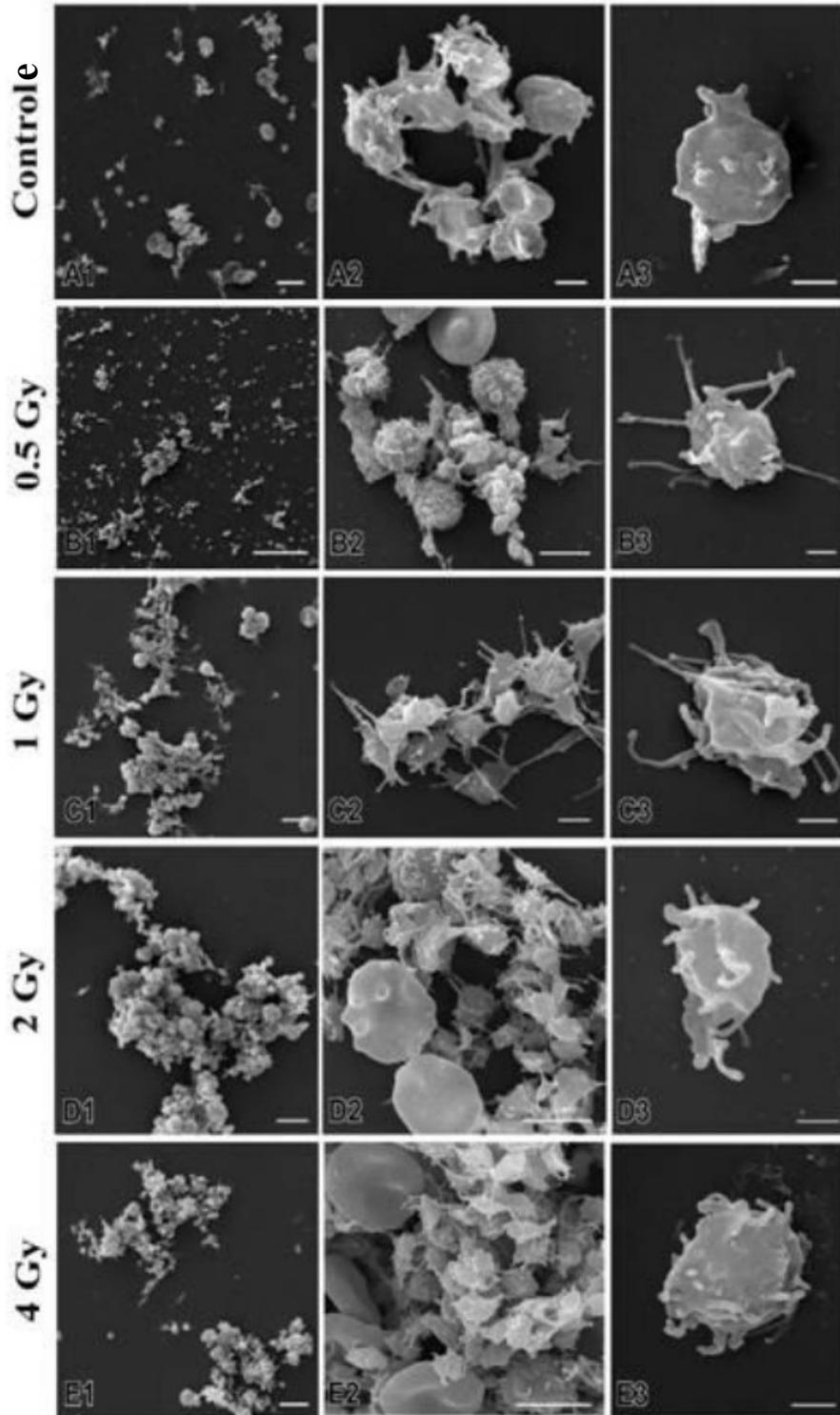


Figura 5

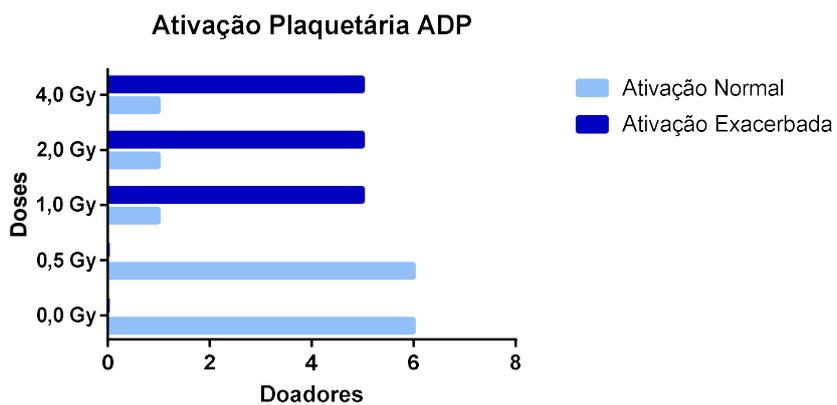


Figura 6

### Porcentagem de Ativação Plaquetária por MO

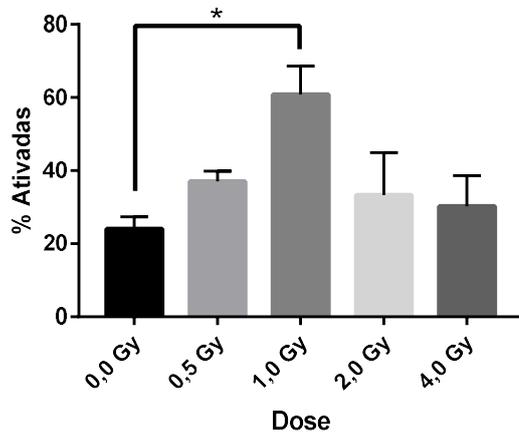


Figura 7

**Resumo****PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGREGAÇÃO  
PLAQUETÁRIA E USO DO PROCESSO**

A presente invenção descreve um processo de avaliação do potencial de agregação plaquetária com radiação ionizante na faixa de 1,0 Gy a 4,0 Gy. Especificamente, a presente invenção compreende um processo que compreende as etapas de aplicação de um conjunto de técnicas qualitativas em uma amostra, avaliação das plaquetas irradiadas em comparação ao controle e avaliação da formação de agregados plaquetários. A presente invenção se situa nos campos da radiobiologia, medicina, biomedicina, farmácia, hematologia e banco de sangue.