



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

AYRTON RAMOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DOS DISTÚRBIOS DA HEMOSTASIA
SECUNDÁRIA CAUSADOS PELA PRESENÇA DA
PEÇONHA BRUTA OU DE PROTEÍNAS ISOLADAS DA
PEÇONHA DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus***

João Pessoa-PB

2018

AYRTON RAMOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DOS DISTURBIOS DA HEMOSTASIA
SECUNDÁRIA CAUSADOS PELA PRESENÇA DA
PEÇONHA BRUTA OU DE PROTEÍNAS ISOLADAS DA
PEÇONHA DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Farmácia da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito
parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Profa. Dra. Daniela
Priscila Marchi Salvador


Parte manuscrita do Projeto de Graduação do aluno Ayrton Ramos Barbosa, apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 15 de JUNHO de 2018.


Banca examinadora:



Profa. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador (Orientadora)
(Departamento de Biologia Molecular/ CCEN/ UFPB)



Prof.ª Dr.ª Hilzeth De Luna Freire Pessoa
(Departamento de Biologia Molecular/ CCEN/ UFPB)



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes
(DCF/UFPB)



AYRTON RAMOS BARBOSA

B238a Barbosa, Ayrton Ramos.

Avaliação dos distúrbios da hemostasia secundária causados pela presença da peçonha bruta ou de proteínas isoladas da peçonha da serpente *crotalus durissus terrificus* / Ayrton Ramos Barbosa. -- João Pessoa, 2018.

55f. : il. –

Orientadora : Daniela Priscila Marchi Salvador.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Ofidismo. 2. Cascavel. 3. Tempo de protrombina. 4. Tempo de tromboplastina parcial ativada. 5. Proteínas anticoagulantes. 6. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.919(043.2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, dono de toda a ciência , e por ser em meu auxílio quando a força me faltava nos momentos mais difíceis nesta caminhada.

A minha amada mãe (Nazilda) por todo o cuidado, apoio e paciência em me educar, por todas as surras dadas por sem elas não seria metade do homem que eu sou.

A minha orientadora Prof. Dr. Daniela Priscila Marchi Salvador por me acolher como seu aluno e orientando ao longo destes anos, pelos ensinamentos, amizade e principalmente por confiar sempre em mim.

A minha filha Gabriela que mesmo sem entender nada disto nasceu em meio a todo o desenvolver deste trabalho me dando uma nova percepção do que é a vida.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pelas frações proteicas, pois sem elas nada deste trabalho seria possível.

Aos meus colegas que compõem ou já fizeram parte do Cpr-lab, em especial a Pedro Gabriel pelo companheirismo durante a realização dos experimentos.

A minha esposa Ivancia pela paciência e cumplicidade durante todo o processo.

Lista de Abreviaturas

- CA – Crotoxina A ou Crotopotina
- CB – Crotoxina B ou PLA2 básica
- CIVD – Coagulação Intravascular Disseminada
- CTM – Crotamina
- CTX – Crotoxina
- CVX – Convulxina
- GRX – Giroxina
- PAI – Inibidor do Ativador de Plasminogênio
- PLA2 – Fosfolipase A2
- PBS – Tampão Fosfato Salina
- TP – Tempo de Protrombina
- TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
- PB – Peçonha Bruta

RESUMO

Dentre as atividades desencadeadas pela peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, a coagulante é bastante intrigante e contraditória, pois a peçonha contém, em sua composição, tanto proteínas precursoras da coagulação como anticoagulantes. O presente trabalho descreve os efeitos coagulantes ou anticoagulantes, *in vitro*, causados pela presença da peçonha bruta e de proteínas isoladas da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, bem como quais vias de coagulação extrínseca, intrínseca e comum e seus respectivos fatores de coagulação são afetados. As atividades coagulantes e / ou anticoagulantes da peçonha bruta e das proteínas purificadas foram avaliadas diretamente sobre um *pool* de plasma humano citratado. Os coágulos formados na presença da peçonha bruta e da Giroxina apresentaram-se como massas hialinas flexíveis com distribuição puntiforme. Para avaliar a atividade anticoagulante das proteínas isoladas (complexo Crotoxina, Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina) foram utilizados kits comerciais para analisar em qual via de coagulação envolvida essas proteínas estavam atuando: Tempo de Protrombina (TP) – via extrínseca, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) – via intrínseca e ambos – via comum. A Giroxina apresentou atividade coagulante, pois age diretamente, quebrando o fibrinogênio a fibrina e aumentando a quantidade de ativador de plasminogênio (um inibidor), o que resulta na formação de trombos. A Crotoxina B interfere na formação do complexo protrombinase. O complexo Crotoxina, Crotoxina A, Crotoxina B e proteínas podem atuar na formação do complexo protrombinase por interação direta com o fator Xa, e a Crotamina interage com regiões carregadas negativamente de diferentes fatores de coagulação em todas as vias de coagulação. Contudo, a peçonha de *C. d. terrificus* possui proteínas que atuam sinergeticamente causando disfunção, ativação e / ou inibição de fatores de coagulação, perturbando a hemostasia.

Palavras-chave: ofidismo, cascavel, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, proteínas anticoagulantes.

ABSTRACT

Among the activities triggered by *Crotalus durissus terrificus* snake venom, coagulation is both intriguing and contradictory since the venom contains in its composition both coagulant and anticoagulant precursor proteins. This work describes the *in vitro* effects of crude venom and purified proteins from *Crotalus durissus terrificus* snake venom as they affect coagulation factors of the extrinsic, intrinsic, and common clotting pathways in citrated human plasma. Coagulant activity and/or anticoagulant crude venom, and purified proteins were all analyzed directly in citrated human plasma, and Prothrombin Time (PT), Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) and coagulation factors were analyzed using commercial kits. Clots formed by the presence of crude venom and Gyroxin presented as flexible hyaline masses in punctiform distribution. The evaluation of clot formation time in the presence of the isolated proteins (Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine) with commercial assays (PT and APTT) made it possible to infer that these proteins interfere in all pathways of the coagulation cascade. Crotoxin B can inhibit prothrombinase complex formation by direct interaction with factor Xa. However, regarding ophidism (snake venom poisoning) by *C. d. terrificus*, Gyroxin acts directly, breaking down fibrinogen to fibrin and increasing the amount plasminogen activator (an inhibitor), which results in the formation of thrombi. The Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and proteins can act in prothrombinase complex formation, and Crotamine interacts with negatively charged regions of differing coagulation factors in all coagulation pathways, and possesses a whole set of activities causing dysfunction, activation and/or inhibition of natural anticoagulants and disturbing hemostasis.

Keywords: ophidism, Brazilian rattlesnake, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, anticoagulant proteins

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 2 |
| 2.1. Acidentes Ofídicos | 2 |
| 2.2. Hemostasia Secundária | 3 |
| 2.2.1. Via Intrínseca | 3 |
| 2.2.2. Via Extrínseca | 3 |
| 2.2.3. Via Comum | 4 |
| 2.3. Parâmetros Qualitativos da Hemostasia | 4 |
| 3. OBJETIVOS | 6 |
| 3.1. Objetivo Geral | 6 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 6 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODO | 7 |
| 4.1. Peçonha Bruta e Proteínas isoladas | 7 |
| 4.2. Obtenções do Plasma, dos Kits de Coagulação e Aspectos Éticos | 7 |
| 4.3. Atividade Coagulante | 8 |
| 4.4. Tempo de Protrombina (TP) | 9 |
| 4.5. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) | 10 |
| 4.6. Análise Estatística dos Dados | 10 |
| 5. RESULTADOS E DISCURSSÃO | 11 |
| 5.1. Avaliação da Atividade Coagulante | 11 |
| 5.2. Avaliação da Atividade Anticoagulante | 12 |
| 6. DISCUSSÃO | 16 |
| 7. CONCLUSÃO | 20 |

| | |
|--|----|
| 8. REFERÊNCIAS | 21 |
| ANEXO 01: Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicas | 26 |
| ANEXO 02: Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB | 29 |
| ANEXO 03: PT HEMOSTASIS, Ref. 501 (lote #5005) - "instruções de uso" | 34 |
| ANEXO 04: Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%) | 38 |
| ANEXO 05: APTT HEMOSTASIS, Ref. 502 - "instruções de uso" | 41 |
| ANEXO 06: Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – CEP/CCS/UFPB CAAE: #60251516.0.0000.5188 | 47 |

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema da via da coagulação com as vias extrínseca, intrínseca e comum. ARMSTRONG, A. W.; GOLAN, D. E.. Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy, , New York, pp.362, 2016, Wolters Kluwer Health 5
- Figura 2.** Avaliação das atividades coagulantes da peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus*, da proteína isolada Giroxina e dos kits coagulação de PT e APTT HEMOSTASIS de sobre o plasma citratado humano. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) (n = 3) - ns: $p > 0,05$; ■ ou □: $p < 0,01$; ■■ ou □□: $p < 0,001$; ■■■ ou □□□: $p < 0,0001$ e ■■■■ ou □□□□: $p < 0,0001$ (★ PT e ☆ APTT). 11
- Figura 3.** Aparência física do plasma humano citratado (a); do coágulo formado na presença de 4,0 μ g da peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus* (observar que o plasma não está completamente coagulado e o coágulo formado encontra-se aderido ao frasco (b); coágulo formado pelo kit de coagulação PT HEMOSTASIS (c); e coágulo formado pelo kit de coagulação APPT HEMOSTASIS (d). 12
- Figura 4.** Avaliação do tempo de protrombina para a formação do coágulo do plasma humano citratado na presença das proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, complexo de Crotoxina e Crotamina isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 3) - ■■■■: $p < 0,0001$. 13
- Figura 5.** Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada analisado em plasma humano citratado na presença de proteínas Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina isoladas da peçonha de *Crotalus durissus* que não apresentaram formação de coágulo após duas horas de incubação sob temperatura constante de 37°C. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 3) - □□□□: $p < 0,0001$. 14

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valor da razão (R) calculado para a Crotoxina A, Crotoxina B, complexo Crotoxina e proteínas Crotamina purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*; o R corresponde à Razão Normalizada Internacional (INR) e atividade da protrombina está expressa em porcentagem (A%).

15

1. INTRODUÇÃO

As peçonhas das serpentes consistem em uma mistura complexa de substâncias farmacologicamente e bioquimicamente ativas (proteínas, enzimas, peptídeos e compostos inorgânicos) que podem apresentar diferentes atividades fisiológicas, hematológicas e neurológicas (MELANI et al., 2015). O estudo de atividades biológicas desencadeadas pelo envenenamento ofídico pode contribuir para descobrir e descrever diversos mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos causados pela peçonha, bem como possibilitar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças (VIEIRA et al., 2013; MELANI et al., 2015).

Os sintomas e efeitos do ofidismo crotálico são tanto locais como sistêmicos. Os sintomas locais incluem parestesia, edema discreto, e mais raramente hemorragia enquanto os efeitos sistêmicos incluem alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório e urinário (BUCARETCHI et al., 2013). A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* é composta por proteínas que são precursores da coagulação, como Convulxina e Giroxina, e por proteínas como o complexo Crotoxina, Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina que atuam sistemicamente como anticoagulantes (MELANI et al., 2015).

Os efeitos na hemostasia secundária causados pela mordedura da serpente *Crotalus durissus terrificus* são semelhantes aos observados em coagulopatias adquiridas (VIEIRA et al., 2013; BUCARETCHI et al., 2002). Existem vários relatos na literatura que comparam os efeitos do ofidismo com a doença de Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD) (HAN et al., 1996; LEE et al., 1996; KIN et al., 2008; MADUWAGE e ISBISTER, 2014).

O objetivo deste estudo foi descrever, *in vitro*, os efeitos coagulantes e anticoagulantes da peçonha bruta e de proteínas isoladas da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre um *pool* de plasma citratado humano; e inferir em quais fatores de coagulação das vias extrínseca, intrínseca e comum essa peçonha e as proteínas isoladas estão atuando.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Acidentes ofídicos

A estimativa global de acidentes ofídicos é de 2,5 milhões de casos por ano (FUNASA, 2001). A terapia atual consiste na administração de soro antiofídico, o qual, muitas vezes, não atua satisfatoriamente contra os efeitos locais e sistêmicos (ALMEIDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2015).

Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), as serpentes do gênero *Crotalus* (*cascavéis*) são responsáveis por aproximadamente 7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões (FUNASA, 2001).

A composição da peçonha e os aspectos clínicos e laboratoriais decorrentes do ofidismo causado pelas subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *C. d. collilineatus* são os mais estudados. (ALMEIDA *et al.*, 2015; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). MELANI e colaboradores (2015) caracterizaram a composição molecular da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e descreveram diversas atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por suas biomoléculas.

As ações e interações que causam os efeitos tóxicos e farmacológicos fazem da peçonha de serpentes, bem como de seus constituintes, um atrativo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou ferramentas a serem utilizadas no estudo de alvos moleculares presentes em estados fisiopatológicos, bem como o seu estudo sistemático além de favorecer novos aspectos para a elaboração de um diagnóstico específico principalmente para o ofidismo, uma vez que hoje a identificação se faz pelo relato do paciente acometido, sendo este muito impreciso pela grande biodiversidade de espécies existente em nosso país

2.2. Hemostasia secundária

A hemostasia secundária, também denominada via da coagulação, é uma série de modificações de um conjunto de proteínas do plasma que tem por

objetivo final formar um coágulo de fibrina estável no local da lesão vascular. Essas proteínas, denominadas Fatores de Coagulação, circulam no sangue sob a forma inativa (exceto o fator IV que é o mineral Cálcio) e são numeradas de I a XIII, na ordem pelo qual foram descobertas (VIEIRA,2014).

A formação do coágulo de fibrina envolve três vias metabólicas: a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum. Para ativar um fator de coagulação, é necessária uma enzima, um substrato e um cofator ou acelerador da reação (LOPES *et al.*, 2005; CAGNOLATI *et al.*, 2007; LEIRIA *et al.*, 2007).

2.2.1. - Via Extrínseca

A Via Extrínseca é assim denominada por não conter na circulação sanguínea o fator tissular (Fator III), o qual é liberado apenas quando ocorre uma lesão. Após a lesão tecidual, o Fator IIIa que é ativado pelo fator IIa, une-se ao Fator VII ativando-o em VIIa e, na presença do co-fator cálcio (Fator IV), promovem a ativação do Fator X em Xa iniciando, assim, a via comum da coagulação (ARMSTRONG & GOLAN, 2016; SILVA, 2012; USTINOV *et al.*, 2016).

2.2.2. – Via Intrínseca

A Via Intrínseca possui esta denominação porque todos os seus fatores estão presentes na corrente sanguínea. Essa via é iniciada quando o Fator XII é ativado, através de processos enzimáticos que transformam pré-caliceína em caliceína. O XIIa ativa o Fator XI em XIa na presença do cininogênio de alta massa molecular (HMWK). A ativação do Fator XII também pode ser feita *in vitro* através do contato direto com o recipiente. Ativados os Fatores XIIa e XIa + cálcio, ocorrerá a ativação Fator IX; o fator IXa, na presença de cálcio, formará um complexo com o fator VIIIa (ativado pela trombina – Fator IIa) e o complexo VIIIa/IXa ativará o Fator X (BARROS *et al.*, 2015; ARMSTRONG & GOLAN, 2016; LIU *et al.*, 2016; SILVA, 2012).

2.2.3. – Via Comum

O Fator Xa é o ponto de início da Via Comum de coagulação e de interseção das duas vias extrínseca e intrínseca. O fator V é ativado pelo Fator IIa; o Fator Va complexa com o Fator Xa e, na presença de Ca^{2+} , cliva a

protrombina (Fator II) em trombina (Fator IIa). A trombina desencadeia quatro importantes atividades na cascata de coagulação: 1. Converte, na presença de cálcio, o fibrinogênio em fibrina, a qual se polimeriza e forma o coágulo primário; 2. Ativa, na presença de cálcio, o Fator XIII; o XIIIa forma um polímero com a fibrina e forma o coágulo estável; 3. Catalisa a ativação dos fatores V, VII e VIII por retroalimentação; 4. Ativa as plaquetas, que liberam seus grânulos, formando a agregação plaquetária e gerando micropartículas derivadas das plaquetas (PINTÃO & GARCIA, 2003; USTINOV *et al*, 2016).

A formação do coágulo é o resultado de alterações complexas nos fatores de coagulação que culminam na transformação do fibrinogênio, pelo Fator IIa na presença de cálcio, em fibrina. Por consequência, é formado um coágulo estável, composto ligações cruzadas de fibrina + Fator XIIIa e a hemorragia é cessada (BUCARETCHI *et al.*, 2013; FONSECA, 2005).

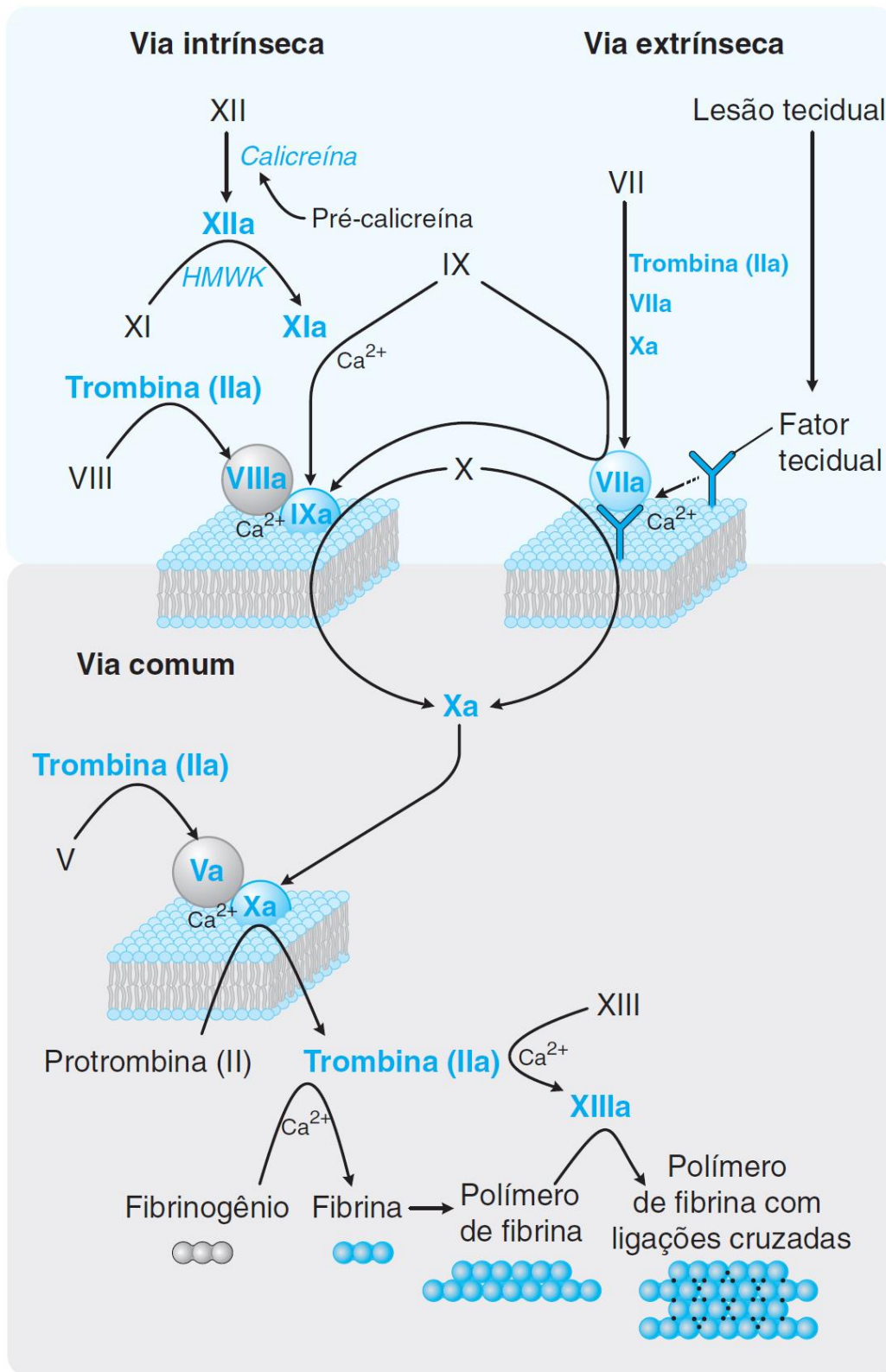


Figura 1: ARMSTRONG, A. W.; GOLAN, D. E.. Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy, , New York, pp.362, 2016, Wolters Kluwer Health

2.3. Parâmetros Qualitativos da Hemostasia

Testes de coagulação comerciais como os utilizados para avaliar o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) podem ser aplicados para identificar quais Fatores de Coagulação estão comprometidos e, assim, caracterizar a perturbação da hemostasia secundária.

O teste de coagulação para avaliar o Tempo de Protrombina foi desenvolvido por Quick, em 1935. O TP é utilizado para investigar coagulopatias, como exame pré-operatório e no controle de administração de anticoagulantes orais (QUICK *et al*, 1935).

O TP determina o tempo de coagulação do plasma citratado após a adição da tromboplastina tecidual (Fator III) que ativa a via extrínseca e a via comum, excluindo, portanto, a participação dos Fatores VIII, IX, XI e XII. O Fator III, ativado pela trombina, ativa, na presença de cálcio, o Fator VII. O Fator VIIa ativa o Fator X e, o Fator Xa inicia a via comum da coagulação. Dessa forma, o teste de TP monitora a atividade dos Fatores I, II, V, VII e X (REIS *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2007; DELABRANCHE *et al.*, 2016).

A avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) é o teste de coagulação utilizado para detectar a deficiência de fatores de coagulação relacionados à via intrínseca (Fatores VIII, IX, XI e XII) e comum (Fatores I, II, V e X). O TTPA consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma citratado após a adição da cefalina, um fator de contato (Fator XIIa), que ativa reações da via intrínseca da coagulação. Deve-se ressaltar que a cefalina não possui atividade de fator tissular, portanto, não é capaz de ativar o fator VII, fato este que gerou sua denominação de tromboplastina parcial (DIAS *et al.*, 2007; LEIRIA *et al.*, 2007; USTINOV *et al*, 2016).

Inibidores da coagulação que afetam o TTPA podem ter uma ação imediata ou ser tempo-dependente. O aumento do TTPA pode estar relacionado à deficiência do Fator XII, no entanto, essa deficiência não causa hemorragia, mas pode estar relacionada com trombooses. Na presença da

heparina, um anticoagulante com ação depende de antitrombina III, o TTPA aumenta proporcionalmente à dose utilizada (SERRALVO *et al*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro*, a ação da peçonha bruta e de proteínas isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre os fatores de coagulação das vias extrínseca, intrínseca e comum da cascata de coagulação.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar, *in vitro*, o efeito coagulante da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* sobre o plasma citratado humano.

- Analisar, *in vitro*, o efeito coagulante e/ou anticoagulante de proteínas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* sobre o plasma citratado humano.

- Determinar o Tempo de Protrombina (TP) e a porcentagem de atividade protrombínica, *in vitro*, das proteínas anticoagulantes isoladas da peçonha de *C. d. terrificus*.

- Aferir, *in vitro*, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) para a formação de coágulos plasmáticos na presença de proteínas anticoagulantes isoladas da peçonha de *C. d. terrificus*.

- Descrever os efeitos *in vitro* do veneno bruto e das proteínas purificadas da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre fatores de coagulação das vias extrínseca, intrínseca e comum no plasma humano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Peçonha Bruta e Proteínas Isoladas

O *pool* de peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi coletado, liofilizado e cedido pela Prof^a. MSc. Paula Helena Santa Rita, coordenadora do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB (Anexo 1), conforme “Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB” e “Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicos” (Anexo 2).

As proteínas Giroxina, Convulxina, Crotamina, Crotoxina, Crotoxina A e Crotoxina B foram purificadas da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*, caracterizadas bioquimicamente, liofilizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rondônia, RO. A Giroxina foi purificada em dois passos cromatológicos utilizando filtração em gel em coluna de afinidade Sephadex G-75 e Benzamidina-Sepharose 6B de acordo com SEKI et al. (1980). As proteínas Convulxina, Crotamina e complexo Crotoxina foram isoladas em coluna de gel filtração Sephadex G-75 como descrito por TOYAMA et al. (2000). A Crotoxina A (ou Crotapotina) foi purificada por cromatografia líquida usando uma coluna C18 de fase reversa de acordo com OLIVEIRA et al. (2003). Crotoxina B (ou A fosfolipase A₂ básica) foi isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose como descrito por SOARES et al. (1998).

A peçonha bruta e as proteínas isoladas de *C. d. terrificus* foram acondicionados a -10°C e, para realização dos experimentos de coagulação ou para análise do grau de anticoagulação, foram solubilizadas em Tampão Fosfato Salina (PBS - 10x, pH 7,4) e utilizadas imediatamente (durante a realização dos experimentos, as amostras solubilizadas foram mantidas a 0°C para evitar a desnaturação de proteínas).

4.2. Obtenções do Plasma, dos Kits de Coagulação e Aspectos Éticos.

Para obtenção do *pool* de plasmas, foi coletado o sangue de voluntários sadios por meio de punção venosa (não traumática) na veia do

antebraço utilizando sistema à vácuo (tubos de ensaio contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9)). O citrato de sódio age como um quelante, ligando-se aos íons de cálcio e interrompendo a cascata de coagulação (AMORIN *et al*, 2010). Antes da coleta do sangue venoso, os doadores permaneceram em jejum por, no mínimo, quatro horas e não fizeram uso de medicação nos dez dias anteriores à coleta. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 RPM por 5 minutos; o plasma foi separado em tubos do tipo falcon de 15mL e imediatamente utilizados para a realização dos experimentos de coagulação e/ou anticoagulação.

Os kits de coagulação PT HEMOSTASIS Ref. 501 (lote #5005) e APTT HEMOSTASIS Ref. 602 (fabricados pela Labtest Diagnóstica S.A.) foram adquiridos comercialmente e empregados na avaliação respectiva do Tempo de Protrombina e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada.

Todos os procedimentos experimentais e as coletas de sangue venoso foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW sob o número CAAE 70983317.0.0000.5183, de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução 466/12 - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

4.3. Atividade de Coagulante

A avaliação da atividade coagulante foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita por ALVARADO & GUTIÉRREZ (1988) (modificado) utilizando plasma humano citratado.

Para avaliar o efeito coagulante da peçonha bruta e/ou proteínas isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, alíquotas de plasma foram distribuídas em frascos de vidro e acondicionadas a 37°C.

Quatro diferentes concentrações da peçonha bruta de *C. d. terrificus* (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg, solubilizadas em Tampão PBS) foram adicionados separadamente a cada frasco e o tempo de formação do coágulo (em segundos) foi registrado.

4.4. Tempo de Protrombina (PT)

A análise das variações do TP permitiu detalhar a ação das proteínas nas vias extrínseca e comum da cascata de coagulação através da ativação ou inativação dos fatores I, II, V, VII e X (LOPES et al., 2005; WEITZ, 2011; ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

O kit de coagulação TP HEMOSTASIS foi utilizado para avaliar o tempo de coagulação do plasma humano citratado após adição de tromboplastina e cálcio. Os ensaios foram realizados em temperatura constante de 37°C seguindo a metodologia proposta pelo fabricante (Anexo 3).

Para avaliar o tempo de protrombina, frascos contendo plasma humano citratado e tampão PBS (controle) ou proteínas isoladas foram incubados durante 120 minutos a 37°C. Após a incubação, o Reagente 1 (tromboplastina extraída do cérebro de coelho em tampão tricina e cloreto de cálcio) foi adicionado a cada frasco e o cronometro foi disparado. O frasco foi homogeneizado e, decorridos nove segundos, foi iniciada a observação em intervalos menores que um segundo. O cronometro foi imediatamente interrompido e o tempo de formação do coágulo foi registrado.

O grau de anticoagulação foi determinado pela Razão de TP (R) de acordo com a Equação #1. O valor R obtido foi expresso como um valor da Razão Normalizada Internacional (INR). Os valores de INR para cada valor de R e as porcentagens de atividade de protrombina (A%) foram encontrados na tabela de conversão que acompanhou o teste de coagulação PT HEMOSTASIS (Ref. 501, lote #5005) (Anexo 4). O valor do INR, determinado pela WHO, para pessoas saudáveis está entre 1,0 e 1,08 e corresponde a 100% de atividade de protrombina (WHO, 1999).

$$R = \frac{\text{Tempo de coagulação, em segundos, da Amostra}}{\text{Tempo de coagulação, em segundos, do Controle}} \quad \text{Equação \#1}$$

A avaliação da redução do valor da atividade de protrombina (em porcentagem, rA%) para cada amostra analisada foi calculada de acordo com a Equação # 2.

$$rA\% = 100\% - A\% \quad \text{Equação \#2}$$

4.5. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

A avaliação do TTPA foi utilizada para detectar as deficiências dos Fatores de Coagulação associadas às vias intrínsecas (VIII, IX, XI e XII) e comuns (I, II, V e X) da cascata de coagulação (LOPES et al., 2005; WEITZ, 2011; ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

A determinação do tempo de coagulação do plasma humano citratado (após a adição de cálcio na presença de ácido elágico) foi realizada em temperatura constante de 37°C, utilizando o kit de coagulação APTT HEMOSTASIS, seguindo a metodologia proposta pelo fabricante (Anexo 5).

Para avaliar o TTPA tanto do controle (tampão PBS) quanto na presença das proteínas isoladas, utilizou-se o *pool* de plasma humano citratado com PBS, ou proteínas isoladas foram incubadas por 120 minutos. Após incubação, o Reagente 1 (ácido elágico e fosfolípido isolado do cérebro de coelho) foi adicionado, homogeneizado e incubado a 37°C durante 4 minutos. Decorrido o tempo de incubação, o cloreto de cálcio foi adicionado, homogeneizado e o cronometro acionado com os frascos mantidos a 37°C. Após 20 segundos, os frascos foram observados em intervalos menores que um segundo e quando ocorreu a formação de coágulos, o cronômetro foi imediatamente interrompido e a tempo marcado.

4.6. Análise Estatística de Dados

Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente utilizando o teste One-way ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (ns: $p > 0,05$; ■: $p < 0,01$; ■■: $p < 0,001$; ■■■: $p < 0,0001$ e ■■■■: $p << 0,0001$). Todos os resultados foram avaliados usando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade coagulante

In vitro, o veneno bruto apresentou atividade coagulante de ação rápida. Observou-se que o tempo para a formação do coágulo (em segundos) foi inversamente proporcional à quantidade da peçonha bruta avaliada (Figura 2).

Os resultados dos tempos de coagulação na presença da peçonha bruta foram comparados aos obtidos pelos kits de coagulação com PT e APTT HEMOSTASIS. Os tempos de coagulação na presença da peçonha bruta nas quantidades de 0,5 e 1,0 μ g foram semelhante aos valores obtidos nos ensaios de coagulação APTT e PT HEMOSTASIS e não apresentaram diferenças significativas. Os tempos de coagulação do plasma citratado humano pela ação da peçonha bruta nas quantidades de 2,0 e 4,0 μ g em relação aos kits comerciais foram significativamente mais baixos (Figura 2). A Giroxina apresentou formação de coágulo (Figura 2), enquanto que a Convulxina (em todas as quantidades avaliadas) induziu a formação de coágulos no plasma citratado humano depois de dez minutos (média aproximada de 650 segundos). VARGAFTIG (1983) afirmou que o Convulxina é uma substância agregante como a trombina, fator Von Willebrand, colágeno e fibrinogênio. POLGAR et al.(1997) descreveu a Convulxina como um potente ativador da ação trombótica das plaquetas, mas que não interfere nos fatores da cascata da coagulação. A convulxina não pode ser classificada como coagulante, embora em nossos estudos, mesmo em diferentes quantidades avaliadas, essa proteína induziu a formação de coágulos. Efeito só observado devido a utilização do citrato de sódio como anticoagulante que quelata cálcio reversivelmente, em contrapartida, se usado anticoagulante EDTA, um inibidor irreversível da atividade dos fatores de coagulação, a formação do coágulo não seria observado. Da mesma forma que a atividade da Convulxina seria revertida com o uso EDTA (MURAKAMI et al., 2003). Por este fato os tempos não foram assinalados e também não plotados no gráfico da figura 2.

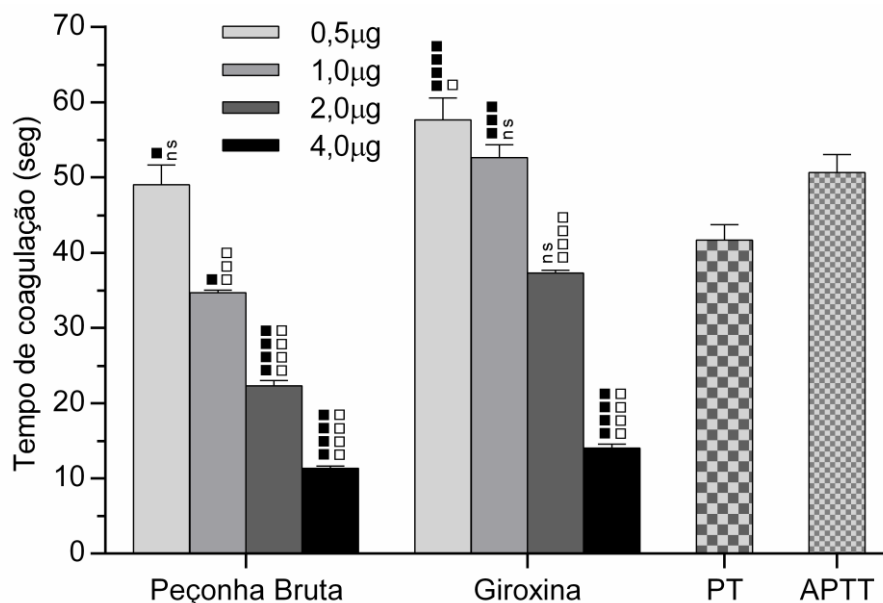


Figura 2. Avaliação das atividades coagulantes da peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus*, da proteína isolada Giroxina e dos kits coagulação de PT e APTT HEMOSTASIS de sobre o plasma citratado humano. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ($n = 3$) - ns: $p > 0,05$; ■ ou □: $p < 0,01$; ■■ ou □□: $p < 0,001$; ■■■ ou □□□: $p < 0,0001$ e ■■■■ ou □□□□: $p < 0,0001$ (★ PT e ☆ APTT).

A aparência física do plasma humano citratado é apresentado na Figura 2a. A aparência física do coágulo formado na presença da peçonha bruta (PB) pôde ser descrita como uma massa hialina, flexível e puntiforme (Figura 2b). Em contrapartida, os coágulos formados pelo emprego dos kits comerciais PT e APTT HEMOSTASIS mostraram-se opacos, rígidos e não puntiformes (Figura 2 c e d, respectivamente). A distribuição puntiforme do coágulo formado na presença da peçonha bruta pode permitir a formação de pequenos trombos que facilmente podem aderir às paredes interiores dos frascos (*in vitro*), ou dos vasos sanguíneos (*in vivo*) o que pode provocar estenoses causando bloqueio do fluxo sanguíneo (Figura 3d).

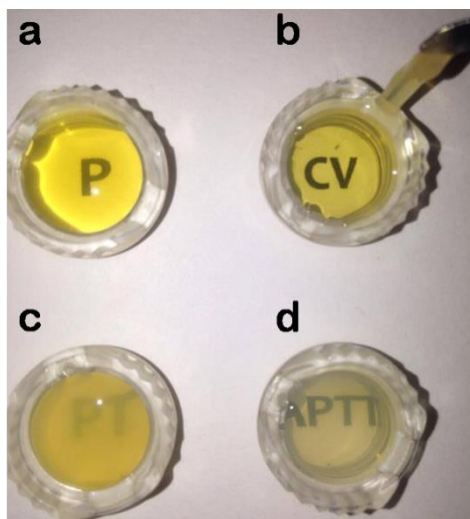


Figura 3. Aparência física do plasma humano citratado (a); do coágulo formado na presença de 4,0 μ g da peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus* (observar que o plasma não está completamente coagulado e o coágulo formado encontra-se aderido ao frasco (b); coágulo formado pelo kit de coagulação PT HEMOSTASIS (c); e coágulo formado pelo kit de coagulação APPT HEMOSTASIS (d).

5.2. Avaliação da Atividade Anticoagulante

As seis proteínas purificadas do veneno de *C. d. terrificus* - Giroxina, Convulxina, Crotamina, complexo Crotoxina, Crotoxina A e Crotoxina B foram submetidos a avaliações de atividade coagulante em plasma humano citratado.

Após duas horas de incubação, em temperatura constante de 37°C, do plasma citratado humano na presença das proteínas Crotamina, complexo Crotoxina, Crotoxina A e Crotoxina B, não foi observada a formação de coágulos. No entanto, foi aferido se essas proteínas interferiam na hemostasia secundária através da avaliação do tempo de protrombina (Figura 4).

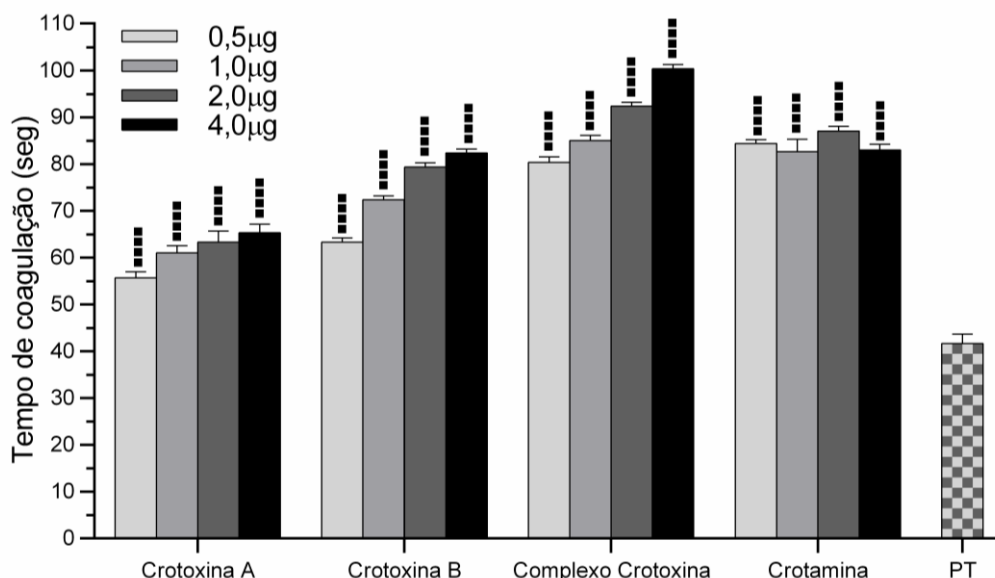


Figura 4. Avaliação do tempo de protrombina para a formação do coágulo do plasma humano citratado na presença das proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, complexo de Crotoxina e Crotamina isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 3) - ■■■■: $p < 0,0001$.

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada também foi determinado para avaliar em que via da cascata da coagulação, e, mais especificamente, sobre a qual os fatores de coagulação as proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, complexo Crotoxina e Crotamina atuavam (Figura 5).

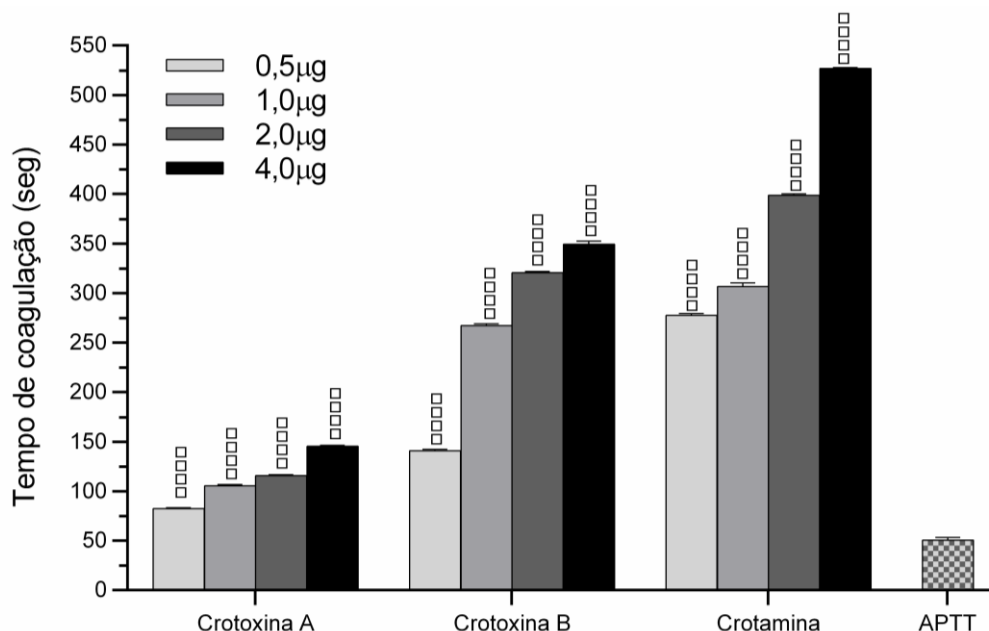


Figura 4. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada analisado em plasma humano citratado na presença de proteínas Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina isoladas da peçonha de *Crotalus durissus* que não apresentaram formação de coágulo após duas horas de incubação sob temperatura constante de 37°C. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 3) - □□□□: $p < 0,0001$.

As médias de TP e TTPA para a formação do coágulo pelos kits comerciais (PT e APTT HEMOSTASIS) foram, respectivamente, 42 e 51 segundos. A média da TP para a formação de coágulos na presença de Crotoxina A, Crotoxina B e complexo Crotoxina foram, respectivamente, 61, 74, 89 segundos. No entanto, a média do TTPA para a coagulação plasmática na presença de Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina foram, respectivamente, de 112, 297 e 378 segundos. No ensaio de coagulação para medir o TTPA não houve formação de coágulo na presença do complexo Crotoxina, mesmo após 120 minutos de monitoramento.

Para todas as proteínas avaliadas, o ensaio de coagulação TTPA apresentou tempo maior para obtenção do coágulo plasmático quando comparado ao ensaio de coagulação TP. Os valores de TP e TTPA na formação de coágulo plasmático induzido pela presença de Crotoxina A foram inferiores quando comparados as demais proteínas. Na presença de Crotoxina B, os valores de TTPA apresentaram aumentos mais significativos em relação aos de TP: em quantidades maiores, os valores TTPA aumentaram até sete vezes e os valores do TP duplicaram. O prolongamento do TTPA na presença de Crotamina foi diretamente proporcional à quantidade analisada, enquanto que os valores de TP duplicaram em todas as quantidades avaliadas.

O grau de anticoagulação do plasma humano citratado na presença do complexo Crotoxina, Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina após duas horas de incubação em temperatura constante de 37°C foi obtido usando a Equação #1 e a redução da atividade de protrombina (A%) foi calculada de acordo com a Equação #2 (Tabela 1).

Tabela 1. Valor da razão (R) calculado para a Crotoxina A, Crotoxina B, complexo Crotoxina e proteínas Crotamina purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*; o R corresponde à Razão Normalizada Internacional (INR) e atividade da protrombina está expressa em porcentagem (A%).

| Proteínas isoladas | Quantidades | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|------|----|-------|------|----|-------|------|----|-------|------|----|
| | 0.5µg | | | 1.0µg | | | 2.0µg | | | 4.0µg | | |
| | R | INR | A% | R | INR | A% | R | INR | A% | R | INR | A% |
| Crotoxina A | 1,33 | 1,29 | 58 | 1,46 | 1,38 | 50 | 1,52 | 1,43 | 46 | 1,57 | 1,47 | 44 |
| Crotoxina B | 1,52 | 1,43 | 46 | 1,73 | 1,60 | 37 | 1,90 | 1,74 | 32 | 1,97 | 1,79 | 30 |
| Complexo Crotoxina | 1,92 | 1,75 | 32 | 2,04 | 1,85 | 29 | 2,22 | 1,99 | 26 | 2,41 | 2,13 | 22 |
| Crotamina | 2,00 | 1,82 | 30 | 1,98 | 1,80 | 30 | 2,07 | 1,87 | 28 | 1,98 | 1,80 | 30 |

Os valores de INR para cada valor de R e as porcentagens de atividade de protrombina (A%) foram obtidos da tabela de conversão que acompanhou o teste de coagulação PT HEMOSTASIS (Ref. 501, lote #5005) (Anexo III). O valor do INR para pessoas saudáveis deve estar entre 1,0 e 1,08 e corresponde a 100% de atividade de protrombina (WHO, 1999).

Todas as quantidades das proteínas avaliadas apresentaram a porcentagem de atividade protrombínica (A%) que excederam 40%. O plasma humano citratado na presença de Crotoxina B apresentou maior viscosidade. No entanto, não foi observada formação de coágulos. Em todas as proteínas testadas, os valores de A% foram diretamente proporcionais à quantidade avaliada. O rA% de plasma humano citratado na presença de Crotoxina foi acima de 70% para todas as grandezas medidas, não apresentando dependência de dose.

Quando o plasma humano citratado foi incubado com o complexo Crotoxina em quantidades de 2,0 e 4,0 μ g, foi observado que o mesmo tornou-se mais fluido em relação ao plasma na presença de tampão PBS (controle). Fato que corroborou com os resultados de TP, indicando uma redução de mais de 70% na atividade de protrombina para todas as quantidades avaliadas.

6. DISCUSSÃO

A atividade coagulante da peçonha bruta da serpente *Crotalus durissus terrificus* e o Giroxina foram analisados em plasma humano citratado e os resultados permitem deduzir que o tempo de formação do coágulo diminui em relação à quantidade de peçonha bruta ou Giroxina utilizado. Isso corrobora BARRIO (1961), que relatou que a Giroxina é a toxina responsável pela atividade coagulante do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Os coágulos formados pela peçonha bruta são hialinos, podendo ser explicado pela presença de Giroxina em sua composição (BARRIO, 1961; SEKI et al., 1980; BARROS et al., 2011; MELANI et al., 2015). A giroxina promove a quebra incomum do fibrinogênio em fibrinopeptídeo A, produzindo uma forma solúvel de fibrina que é mais suscetível à ação de agentes fibrinolíticos (BARRIO, 1961; SEKI et al., 1980; ALEXANDER et al., 1988; BARROS et al., 2011). BUCARETCHI et al. (2002) relataram que a completa falta de coagulação sangüínea em casos graves de ofidismo de cascavel poderia ser devido ao consumo de fibrinogênio pela Giroxina.

Entretanto, a coagulação incompleta observada no plasma citratado humano pode estar relacionada à composição da peçonha, pois essas apresentam proteínas anticoagulantes, tais como Crotoxina A, Crotoxina B, complexo Crotoxina e Crotamina em sua composição (BREITHAUPT et al., 1974; HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; MANCIN et al., 1998; TOYAMA et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2003; VIEIRA et al., 2013; MELANI et al., 2015).

Segundo WEITZ et al.(2011), *in vitro*, o sangue de indivíduos saudáveis coagula em 4-8 minutos. Quando o citrato é adicionado para evitar a coagulação, os coágulos de plasma re-calcificados formam-se em 2-4 minutos. Dez minutos, no máximo, é o tempo necessário para descrever uma proteína capaz de causar coagulação.

Em nossas análises, a Crotoxina A mostrou atividade anticoagulante significativa. A crotoxina B mostrou considerável atividade anticoagulante, principalmente sob a atuação na via extrínseca da cascata de coagulação. O complexo Crotoxina apresentou atividade anticoagulante intensa em ambas às vias de coagulação.

Crotoxina A, a parte ácida do complexo não apresenta ação neurotóxica, agindo como um inibidor natural não tóxico e não enzimático da crotoxina B, aumentando letalidade da peçonha e diminuindo a atividade catalítica e anticoagulante da crotoxina B (FAURE et al., 2003). Tal inibição pode ocorrer pois a Crotoxina A atua como uma chaperona da Crotoxina B (BREITHAUPT et al., 1974; HABERMANN e BREITHAUPT, 1978).

FAURE et al.(2011) relataram que a Crotoxina A interage de maneira sinérgica com a Crotoxina B para formar o complexo Crotoxina. A estrutura cristalina do complexo crotoxina revelou detalhadamente região de interação entre a Crotoxina A e B. Os aminoácidos que compõem as cadeias α e β da Crotoxina A participam de praticamente todos os contatos com a Crotoxina B. A α -hélice 1, a hélice curta, o loop que precede o loop de ligação de Ca^{2+} , o loop que precede a folha β e o loop de terminal C são as regiões envolvidas na estabilização do complexo crotoxina, e estão situados na face central canônica da crotoxina B.

A maioria das PLA_2S das peçonhas de serpentes são proteínas básicas que podem inibir a coagulação através de vários mecanismos: *i.* Hidrolisando e destruindo de fosfolípidios pró-coagulantes; *ii.* Competindo (efeito antagonista) com proteínas de coagulação para ligação à superfície lipídica; e *iii.* Interagindo com o FXa, prevenindo a formação do complexo FXa / FVa e retardando a formação de trombina (FAURE et al., 2007; FAURE et al., 2011).

Vários estudos, como os realizados por: DIAZ et al. (1995) com uma PLA_2 básica (miotoxina IV) isolada da peçonha de *Bothrops asper*; KERNS et al. (1999) com um PLA_2 básica (CM-IV) isolada da peçonha de *Naja nigricollis* e MOUNIER et al. (2000) com a PLA_2 básica humana do grupo IIA (hGIIA) sugerem que as fosfolipases A_2 inibem a formação do complexo protrombinase (composto pelos fatores Va e Xa na presença de Ca^{2+}). Esses estudos reportaram que as PLA_2S básicas inibem a atividade da protrombinase na ausência de fosfolípido pró-coagulante através da interação direta com o fator Xa (DIAZ et ai, 1995;. KERNS et al, 1999;. MOUNIER et al, 2000). Além disso, MOUNIER e colaboradores (2001) observaram que a Crotoxina B apresentou inibição da protrombinase de maneira similar àquela observada para as proteínas miotoxina IV, CM-IV e hGIIA.

Os resíduos de triptofano nas posições 31 e 70 são estruturalmente conservados em todas as isoformas de Crotoxina B. Esses resíduos desempenham um papel importante na estabilização do complexo Crotoxina (FAURE et al., 2011) e na estrutura quaternária da Crotoxina B (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). Em contrapartida as regiões das hélices α 2 e 3, da folha β e do final do loop de terminal C estão todas expostas na superfície da estrutura oligomérica da Crotoxina B. Arranjo estrutural que possibilita a interação entre a Crotoxina B e o Fator Xa inibindo, conseqüentemente, a formação do complexo protrombinase e a coagulação.

A crotamina é um polipeptídeo básico composto por 42 resíduos de aminoácidos (MANCIN et al., 1998; TOYAMA et al., 2000). A estrutura cristalográfica da crotamina indicou que todos os seus resíduos carregados positivamente e hidrofóbicos estão expostos, em lados opostos, a superfície do solvente, permitindo que este se complexa com várias proteínas alvo (CORONADO et al., 2013).

Nos experimentos de TP que avaliaram a ação das proteínas crotálicas na via extrínseca, a presença da Crotamina causou um maior tempo para a formação do coágulo plasmático. Ao contrário as outras proteínas avaliadas apresentaram um alto grau de anticoagulação observado para o TP de forma independente da quantidade avaliada. Esta marcante ação anticoagulante da Crotamina pode estar relacionada à sua capacidade de interagir de maneira eletrostática e não específica com regiões carregadas negativamente de diferentes fatores de coagulação em todas as vias de coagulação.

A incapacidade de coagulação parcial ou total do sangue observada em casos graves de envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* pode ser explicado por perturbação da hemostasia secundária. Isso se deve à ação de proteínas que inibem a trombina ou ativam a anti-trombina III e inativam os fatores de coagulação IXa, Xa, XIa e XIIa.

No entanto, a análise dos nossos resultados nos permitiu inferir que o envenenamento crotálico desencadeia uma coagulopatia secundária chamada Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD).

A CIVD começa quando os fatores III e VIIa se complexam. Esse complexo ativa o Fator X, desencadeando a via de coagulação comum. Na via

comum, a protrombina é convertida em trombina (ARMSTRONG e GOLAN, 2016; GANDO et al., 2016; THACHIL, 2016). A presença de trombina quebra o fibrinogênio em fibrina; aumento dos níveis de inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) ativando diretamente os fatores V e VIII (CHANG et al., 2016; ARMSTRONG e GOLAN, 2016; THACHIL, 2016).

A crotoxina B pode substituir o fator Va no complexo normal protrombinase, o que resulta em um complexo inativo de Crotoxina B / FXa, prevenindo a formação de trombina. A não ativação do plasminogênio gera acúmulo de fibrina (ARMSTRONG e GOLAN, 2016; GANDO et al., 2016; THACHIL, 2016). As proteínas Crotoxina A, complexo Crotoxina e Crotamina podem atuar como anticoagulantes naturais promovendo a disfunção e/ou inibição de fatores de coagulação, desestabilizando a hemostasia e resultando em manifestações hemorrágicas.

Por outro lado, Giroxina, uma proteína trombina-*like*, atua diretamente na quebra do fibrinogênio em fibrina (BARRIO, 1961; SEKI et al., 1980; ALEXANDER et al., 1988; BARROS et al., 2011) aumentando os níveis de PAI, o que conseqüentemente promove a formação de trombos.

Quando a formação de trombina ou a sua neutralização pelo sistema anti-trombina excede os mecanismos de controle da hemóstasia, cria-se um paradoxo no qual a hemorragia e a trombose ocorrem ao mesmo tempo.

7. CONCLUSÃO

A atividade coagulante *in vitro* da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* é causado pela presença da Giroxina, a qual promove a formação de coágulos hialinos de distribuição puntiforme e textura flexível.

Avaliação do TP e TTPA do plasma citratado humano na presença das proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, complexo Crotoxina e Crotamina indicaram alterações significativas no tempo de formação dos coágulos. Fato esse que nos permitiu sugerir que essas proteínas interferem na hemostasia secundária: a Crotoxina B e o complexo Crotoxina inibem a formação do complexo protrombinase através da interação direta com o Fator Xa; a crotamina interage com as regiões carregadas negativamente de diferentes fatores de coagulação, conseqüentemente atuando em todas as vias de coagulação.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J.. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, 26, 953-960, 1988.
- ALMEIDA, C. de S.; ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S.; JACYSYN, J. F.; FAQUIM-MAURO, E. L. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. *PLoS One*, 10, e0121427, 2015.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M.. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.*, 36, 563-565, 1988.
- ARMSTRONG, A. W.; GOLAN, D. E.. Pharmacology of Hemostasis and Thrombosis, in: Golan, D.E., ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. (Eds.), Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy, Wolters Kluwer Health, New York, pp.372-394, 2016.
- BARRIO, A.. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoam.*, 11, 224-232, 1961.
- BARROS, L.C.; SOARES, A.M.; COSTA, F.L.; RODRIGUES, V.M.; FULY, A.L.; GIGLIO, J.R.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I.A.; BARRAVIERA, S.R.C.S.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA-JUNIOR R.S.. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 17, 23-33, 2011.
- BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E.. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Eur. J. Biochem.*, 49, 333-345, 1974.
- BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E.M.; BRANCO, M.M.; FERNANDES, L.C.R.; HYSLOP, S.. Coagulopathy as the main systemic manifestation after envenoming by a juvenile South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: case report. *Clin. Toxicol.*, 51, 505-508, 2013.
- BUCARETCHI, F.; HERRERA, S.R.F.; HYSLOP, S.; BARACAT, E.C.E.; VIEIRA, R.J.. Snakebites by *Crotalus durissus ssp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 44, 133-138, 2002.

- CAGNOLATI, D.; SANKARANKUTTY, A. K.; ROCHA, J. P. S.; BEER, A.; SILVA, O. C. e. **Hemostasia e Distúrbio da Coagulação**. p.28, 2007. Disponível em: <http://rca.fmrp.usp.br/servico/gastro/documentos/cirurgia/gastro/capitulos/hemostasia_revisado>. Acessado em: 15 de maio de 2018.
- CHANG, Y.; DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; BAIYEE EBOT, E.; POWERS, J.G.; PHILLIPS, T.. Coagulation disorders and their cutaneous presentations: pathophysiology. *J. Am. Acad. Dermatol.*,74, 783-792, 2016.
- CORONADO, M.A.; GABDULKHAKOV, A.; GEORGIECA, D.; SANKARAN, B. MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; BETZEL, C.). Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Cryst.*,69, 1958-1964, 2013.
- DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; CHANG, Y.; BAIYEE EBOT, E.; POWERS, J.G.; PHILLIPS, T.. Coagulation disorders and their cutaneous presentations: diagnostic work-up and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.*,74, 795-804, 2016.
- OLIVEIRA, D.G.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.; HAVT, A.; NOBRE, A.C.; MARANGONI, S.; CÂMARA, P.R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; BELIAM, L.O.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*,42, 53-62, 2003.
- DIAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIERREZ, J. M.. Purification and characterization of Myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. *Nat. Toxins.*, 3, 26-31, 1995.
- FAURE, G.; GOWDA, V.T.;MAROUN, R.C. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A₂ by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC Struct. Biol.*, 7, 82, 2007.
- FONSECA, F. V. Isolamento e caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de l-aminoácido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 2005.
- FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, 2001. (FUNASA, Org.). Brasília: Disponível em:

- <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf>
Acessado em: 10 maio 2018.
- GANDO, S.; LEVI, M.; TOH, C.-H.. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 2, 16037, 2016.
- HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H.. The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*, 16, 19-30, 1978.
- HAN, B.G.; CHOI, S.O.; KIM, H.Y.; KANG, N.K.; RYU, J.S.; LEE, K.H.. A study of the complication of poisonous snakebite. *Korean J. Intern. Med.*, 50, 399-404, 1996.
- HOSPITAL ALBERT EINSTEIN (Org.). Protocolo de anti-coagulação oral. Diretrizes assistenciais. Disponível em: <http://www.proac.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/Protocolo_de_Anti-coagulacao_Oral.pdf>.
Acessado em: 08 de maio de 2018.
- KERNS, R.T.; KINI, R.M.; STEFANSSON, S.; EVANS, H.. Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 36, 107-113, 1999.
- KIM, J.S.; YANG, J.W.; KIM, M.S.; HAN, S.T.; KIM, B.R.; SHIN, M.S.; LEE, J.I.; HAN, B.G.; CHOI, S.O.. Coagulopathy in patients who experience snakebite. *Korean J. Intern. Med.*, 23, 94-99, 2008.
- LEE, J.A.; KIM, S.Y.; HYUN, S.C.; PARK, S.M.; PARK, J.S.; KIM, G.T.. Clinical features in snakebite. *J. Korean Soc. Emerg. Med.*, 7, 580-589, 1996.
- LEIRIA, T. L. L.; PELLANDA, L. C.; MAGALHÃES, E.; LIMA, G. G. De. Controle do tempo de protrombina em sangue capilar e venoso em pacientes com anticoagulação oral: correlação e concordância. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 89, p. 1-5, 2007.
- LEIS, L. B.; CHEBABO, A. Serviço de doenças infecciosas e parasitárias do hospital universitário clementino fraga filho. Diretrizes Diagnósticas de Acidentes com Animais Peçonhentos. Rio de Janeiro: 2001. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj8zdHs_tXPAhVDhJAKHVy3ATcQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.hucff.ufrj.br%2Fdownload-de-arquivos%2Fcategory%2F26-

- dip%3Fdownload%3D332%3Arotinas&usg=AFQjCNHDXnX7L4NOkhiOkch
hT6skCBYFQ&bvm=bv.135475266,d.Y2l>. Acesso em 20 maio 2018.
- LOPES, S.T.A.; EMANUELLI, M.P.; SCHMIDT, C.; RAISER, A.G.; MAZZANTI, A.; ALVES, A.S. Reference ranges of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) in dogs. *Cienc. Rural.*, 35, 381-384, 2005
- MADUWAGE, K.; ISBISTER, G.K.. Current treatment for Venom-Induced Consumption Coagulopathy resulting from snakebite, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e3220, 2014.
- MANCIN, A.C.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELÁ, I.R., GIGLIO, J.R.. The analgesic activity of crothamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon*, 36, 1927-1937, 1998.
- MELANI, R.D.; ARAUJO, G.D.T.; CARVALHO, P.C.; GOTO, L.; NOGUEIRA, F.C.S.; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G.B.. Seeing beyond the tip of the iceberg: a deep analysis of the venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics.*, 8, 144-156, 2015.
- MOUNIER, C.M.; BON, C.; KINI, R.M.. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A₂: protein versus phospholipid-dependent mechanism of action. *Haemostasis.*, 31, 279-287, 2001.
- MOUNIER, C.M.; LUCHETTA, P.; LECUT, C.; KODURI, R.S.; FAURE, G.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; SINGER, A.; GHOMASHCHI, F.; BÉGUIN, S.; GELB, M.H.; BON, C.. Basic residues of human group IIA phospholipase A₂ are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition: comparison with other mammalian secreted phospholipases A₂. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4960-4969, 2000.
- MURAKAMI, M.T., ZELA, S.P., GAVA, L.M., MICHELAN-DUARTE, S., CINTRA, A.C.O.; ARNI, R.K. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha 4\beta 4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 478-482, 2003.
- OWNBY, C. L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: *Rattlesnake Venoms*, **Marcel Dekker Inc**, A.T. Tu (Ed.), New York, pp.163-209, 1982.
- POLGAR, J.; CLEMETSON, J.M.; KEHREL, B.E.; WIEDEMANN, M.; MAGNENAT, E.M.; WELLS, T.N.; CLEMETSON, K.J.. Platelet activation

- and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J. Biol. Chem.*, 272, 13576-13583, 1997.
- SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A; Purification of gyroxin from a South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 18, 235-247, 1980.
- SOARES, A.M; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon*, 36, 503-514,1998.
- THACHIL, J.. Disseminated intravascular coagulation - new pathophysiological concepts and impact on management. *Expert Rev. Hematol.*, 8, 803-814, 2016.
- TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R.L., CORSO, G., BOSCHERO, A.C.. Biochemical characterization of two crotoamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1474, 56-60, 2000.
- VARGAFTIG, B.B.. Platelet activation by non-coagulant snake venom components. *Toxicon*, 20, 279-287, 1982.
- VIEIRA, L.F.; MAGRO, A.J.; FERNANDES, C.A.H.; DE SOUZA, B.M.; CAVALCANTE, W.L.G.; PALMA, M.S.; ROSA, J.C.; FULY, A.L.; FONTES, M.R.M.; GALLACCI, M.; BUTZKE, D.S.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Biochimie*, 95, 2365-2375, 2013.
- WEITZ, J.I.. Blood Coagulation and Anticoagulant, Fibrinolytic, and Antiplatelet Drugs, in: BRUNTON; L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.C; (Eds), GOODMAN & GILMAN'S **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Mc Graw Hill Medical, New York, pp.849-876, 2011.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. 48th Report. WHO Tech. Rep. Ser., 889, 70-95, 1999.

ANEXO 01

Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicas



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Valorizando talentos



Missão Salesiana de Mato Grosso
Universidade Católica Dom Bosco
Instituição Salesiana de Educação Superior
Biotério MSMT – UCDB / β ioToxX



Campo Grande-MS, 07 de Março de 2014.

TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 02 eppendorf, contendo 0,7145 gramas e 0,8171 gramas de veneno liofilizado de serpentes do gênero *Bothrops mattogrossensis* e *Crotalus durissus* código/nº: B. m/s8-0021, oriundas do plantel do Biotério/UCDB com o número de registro 718.682, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, localizado no campus da Universidade Católica Dom Bosco, situada na Av. Tamandaré, 6000, Bairro Jd. Seminário, CEP 79117-900, Cx.P. 100 em Campo Grande – Mato Grosso do Sul.

Paula Helena Santa Rita
Biotério/UCDB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Valorizando talentos




Missão Salesiana de Mato Grosso
Universidade Católica Dom Bosco
Instituição Salesiana de Educação Superior
Biotério MSMT – UCDB / β ioToxX



Campo Grande-MS, 20 de Maio de 2014.

TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 03 frascos contendo 04 gramas cada um de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* código/nº: B. m/s8-0021, oriundas do plantel do Biotério/UCDB com o número de registro 718.682, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, localizado no campus da **Universidade Católica Dom Bosco**, situada na Av. Tamarandé, 6000, Bairro Jd. Seminário, CEP 79117-900, Cx.P. 100 em Campo Grande – Mato Grosso do Sul.


Paula Helena Santa Rita
Biotério/UCDB
Médica Veterinária
CRMV-MS 3385
Biotério - UCDB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Av. Tamarandé, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

ANEXO 02

Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB

ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA QUE ENTRE SI CELEBRAM, DE UM LADO, A UNIVERSIDADE CATÓLICA DO BOSCO - UCDB E, DE OUTRO, UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB

A UNIVERSIDADE CATÓLICA DO BOSCO, mantida pela MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO, pessoa jurídica de direito privado, associação civil sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ/MF sob nº 03.226.149/0015-87, estabelecida na Av. Tamandaré, 6.000, em Campo Grande/MS, doravante designada simplesmente UCDB, neste ato representada por seu Magnífico Rector **Pe. José Mariano**, portador do RG nº 219039 SSP/MS, e do CPF nº 127554511-49, e de outro lado, a UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 24.098.477/0001-10, sediada na Cidade Universitária, bairro Castelo Branco, em João Pessoa/PB, doravante designada simplesmente CP-**Lab - UFPB**, neste ato representada por sua Magnífica Rectora professora **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, portadora da Cédula de Identidade nº 394.612 SSP-PB, CPF nº 323.157.164-20, domiciliada na cidade de João Pessoa/PB, resolvem celebrar o presente Acordo de Cooperação Técnica e Científica, regido pelas cláusulas e condições seguintes:

CLÁUSULA PRIMEIRA - DO OBJETO

O presente Acordo objetiva a conjugação de esforços entre as partes, mediante utilização de recursos técnicos e/ou materiais disponíveis, para a implementação de atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação voltadas à formação de recursos humanos e obtenção de resultados científicos na área de Biologia Molecular Estrutural com a utilização de toxinas isoladas de venenos de serpentes e/ou venenos brutos.

SUBCLÁUSULA PRIMEIRA - A implementação dos objetivos deste Acordo será realizada em conformidade com as descrições constantes do documento anexo denominado **Plano de Trabalho**, o qual, uma vez rubricado pelas partes, passa a integrar o presente instrumento, independentemente de transcrição sob a forma de termos aditivos.

SUBCLÁUSULA SEGUNDA - As atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação incluem a participação em cursos, seminários, congressos, palestras, e outras atividades inerentes e correlatas à área de Biologia Molecular Estrutural.

CLÁUSULA SEGUNDA - DO LOCAL DE EXECUÇÃO

As atividades de qualificação e capacitação, bem como outras atividades inerentes e necessárias para a consecução do objeto deste instrumento, poderão ser executadas nas áreas físicas, complexos educacionais e de treinamentos estabelecidos em ambas as instituições.

CLÁUSULA TERCEIRA - DA COORDENAÇÃO

A Coordenação do objeto deste Acordo ficará, por parte da UFPB, sob a responsabilidade da Professora **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR**, Matrícula SIAPE 1775477, Coordenadora do Laboratório de Cristalografia de Proteínas; CP-**Lab** do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, a qual será responsável por todas as ocorrências relacionadas à sua execução, determinando o que for necessário para a regularização das faltas ou incorreções observadas.

CLÁUSULA QUARTA - DAS OBRIGAÇÕES

Visando à consecução dos objetivos propostos, além das demais obrigações constantes desse instrumento, as partes comprometem-se especificamente a:

I - OBRIGAÇÕES DA UCDB:

- a) Permitir que técnicos, pesquisadores (docentes) e discentes integrantes do seu quadro de pessoal desenvolvam ações voltadas ao desenvolvimento dos objetivos propostos com efetivação do presente Acordo;
- b) Possibilitar acesso à infraestrutura disponível no *campus* necessárias para execução dos objetivos propostos no presente Acordo;
- c) Disponibilizar e ceder material biológico (veneno bruto e/ou toxinas isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*) para realização de experimentos biológicos propostos nos objetivos do presente Acordo;
- d) Captar, capacitar e qualificar recursos humanos para executar ações (extração de peçonhas de serpentes) relacionadas ao cumprimento dos objetivos propostos no presente Acordo.

II - OBRIGAÇÕES DO UFPB, através do CP-Lab**:**

- a) Disponibilizar discentes integrantes de projetos de pesquisa coordenados pela Prof.ª **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR** e/ou por docentes colaboradores para desenvolverem ações voltadas à execução dos objetivos propostos no presente acordo e seus termos aditivos;
- b) Disponibilizar pesquisadores (docentes), mediante autorização do setor de locação competente e respeitando a compatibilidade entre a carga horária acadêmica e as horas dispensadas as atividades abrangidas por este acordo;
- c) Permitir acesso à infraestrutura e aos materiais consumíveis disponíveis no Laboratório de Cristalografia de Proteínas - CP-**Lab** ou em demais laboratórios parceiros para proporcionar condições necessárias para executar os objetivos propostos no presente Acordo;
- d) Realizar experimentos de avaliação de efeitos biológicos de venenos brutos e de suas respectivas frações purificadas isolados de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na ausência e/ou na presença inibidores naturais e/ou

sintéticos bem como clucidar e analisar estruturas oligoméricas de proteínas isoladas de peçonhas de serpentes por cristalografia de raios X;

- e) Realizar estudos computacionais (topológicos, docking, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLAVs isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desconhecidas por estas cruzinas;
- f) Captar e caracterizar e qualificar recursos humanos para realização de ensaios biológicos e caracterização biofísicoquimicamente dos venenos brutos e as frações isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
- g) Publicar os resultados obtidos no decorrer da execução da presente parceria em eventos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.

CLÁUSULA QUINTA – DOS RECURSOS HUMANOS

Os recursos humanos utilizados pelas partes convenientes na execução deste Acordo, na condição de empregado, autônomo, empreiteiro, ou a qualquer outro título, nenhuma vinculação ou direito terá em relação à outra parte, ficando a cargo exclusivo da parte conveniente a integral responsabilidade no que se referem a todos os direitos das pessoas que contratar, mormente os trabalhadores previdenciários, inexistindo qualquer solidariedade entre as partes neste sentido.

CLÁUSULA SEXTA – DA TRANSFERÊNCIA DE RECURSOS

Para execução do presente Acordo não haverá transferência ou repasse de recursos financeiros de quaisquer naturzas entre as instituições convenientes.

SUBCLÁUSULA ÚNICA – Havendo a necessidade de transferência de recursos as partes deverão celebrar instrumento específico para tal finalidade.

CLÁUSULA SÉTIMA – DA VIGÊNCIA

O presente instrumento terá vigência de 5 (cinco) anos, a contar da data de sua assinatura.

SUBCLÁUSULA ÚNICA - O presente Acordo poderá, a qualquer tempo, ser denunciado, mediante aviso prévio de 45 (quarenta e cinco) dias.

CLÁUSULA OITAVA - DA RESCISÃO

Por decisão, em comum acordo por ambos os convenientes, o presente poderá ser rescindido ou, ainda, o mesmo poderá ser anulado por descumprimento de quaisquer de suas cláusulas ou condições por um dos contratados e, a parte prejudicada poderá rescindir o presente Acordo, mediante simples comunicação, escrita e fundamentada, à outra, respondendo a parte inadimplente pelas perdas

e danos decorrentes, ressalvadas as hipóteses de caso fortuito ou de força maior, devidamente caracterizadas.

CLÁUSULA NONA – DO FORO

Para a solução de quaisquer controvérsias porventura oriundas da execução deste Acordo, em relação às quais não tenha havido entendimento amigável, as partes elegem o Foro da Justiça Federal da Cidade de João Pessoa-PB, com renúncia expressa a qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

Estando assim justas e contratadas, firmam o presente instrumento em 03 (três) vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo nomeadas e subscritas.

Campo Grande/MS, 21 de outubro de 2014.


Peláeos Marston
Reitor da Universidade Católica Dom Bosco


Margareth de Pátima Formiga Melo Diniz
Reitora da Universidade Federal da Paraíba

Testemunhas:

1. _____ 2. _____

MT



PLANO DE TRABALHO
Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPA

I - IDENTIFICAÇÃO

| | | |
|--|----------------|--------------------|
| CONCEDENTE | | CNPJ |
| UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO | | 03.226.149/0015-87 |
| RESPONSÁVEL | CPF | RG |
| JOSE MARCONI | 127.554.511-49 | 219.039 SSP/MS |
| CONVENIENTE | | CNPJ |
| UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA | | 24.098.477/0001-10 |
| ENDEREÇO | CEP | |
| CIDADE UNIVERSITÁRIA, CASTELO BRANCO, JOMO PESSOA/PB | 58051-900 | |
| ESFERA ADMINISTRATIVA | | |
| Administração Pública Federal | | |
| RAMO DE ATUAÇÃO | | |
| EDUCAÇÃO SUPERIOR | | |
| REPRESENTANTE LEGAL | CPF | RG |
| Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz | 323.157.164-20 | 394.612 SSP-PB |
| OBJETO | | |
| Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> . | | |


mm

PLANO DE TRABALHO
Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPA

II - OBJETO/JUSTIFICATIVA

| |
|---|
| OBJETO |
| Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> . |
| JUSTIFICATIVA |
| O presente convenio possibilitará a extração de venenos de serpentes para realização de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> na tentativa de melhor compreender o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação de/destas enzimas. |



III - METAS

| Meta | Descrição das metas e etapas | Data Inicial | Data Final |
|------|--|----------------|--------------|
| 1 | Revisar e caracterizar biologicamente os venenos brutos de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> . | outubro/2014 | outubro/2015 |
| 2 | Isolar frações proteicas que compõem peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> . | outubro/2014 | outubro/2015 |
| 3 | Caracterizar efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos das frações proteicas isoladas nos desmorbamentos de ratos pretos e/ou frações proteicas isoladas na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos através de ensaios biológicos. | outubro/2014 | outubro/2015 |
| 4 | Crystallizar e/ou co-crystallizar (na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos) frações proteicas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> isoladas no decorrer do presente projeto e/ou disponibilizadas por colaboradores. | junho/2015 | outubro/2015 |
| 5 | Caracterizar dados de difração de raios X dos cristais obtidos nas reações experimentais MX1 ou MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS/Campinas-SP. | março/2015 | outubro/2015 |
| 6 | Elucidar e analisar a(s) estrutura(s) tridimensional(is) das P.L.A.s cristalizadas que geraram boas conjunções de dados de difração de raios X. | abril/2015 | outubro/2015 |
| 7 | Determinar regiões de reconhecimento de P.L.A.s isoladas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> frente aos soro(s) antiofídico(s) soro(s) e antiofídico(s). | junho/2015 | outubro/2015 |
| 8 | Ampliar as regras imunológicas das diferentes P.L.A.s tóxicas e etológicas que reagem com os diferentes soro(s) antiofídico(s) e realizar um estudo comparativo entre as P.L.A.s isoladas de reações de serpentes da família Viperidae. | junho/2015 | outubro/2015 |
| 9 | Revisar estudos de graduação e pós-graduação a fim de inserir na comunidade científica e repassar a metodologia experimental utilizada para obtenção de estruturas oligoméricas de macromoléculas biológicas. | outubro/2014 | outubro/2015 |
| 10 | Realizar estudos computacionais (topologia, docking, de distâncias moleculares e filogenéticas) para avaliar as características pertinentes às P.L.A.s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas. | fevereiro/2015 | outubro/2015 |
| 11 | Divulgar os resultados parciais e/ou completos obtidos no decorrer das atividades de pesquisa em artigos científicos de alto impacto científico, dissertações de mestrado e teses de doutorado. | outubro/2014 | outubro/2015 |

(Handwritten mark)

IV - DECLARAÇÃO DO CONVENIENTE E APROVAÇÃO DO COORDENANTE

Declaração

Na qualidade de representante legal, declaro para fins de prova junto a Universidade Federal da Paraíba, para os efeitos e sob penas da lei, que inexistiu qualquer débito em mora ou situação de inadimplência com o Tesouro Nacional ou qualquer órgão ou entidade da Administração Pública Federal, Direta e Indireta, que impeça a celebração do presente Acordo de Cooperação Técnica.

Pede Deferimento,

Campo Grande - MS, 21 de outubro de 2014.

JOSE MARIANI
 Reitor da UCDB

Aprovação

Aprovo,
 João Pessoa - PB, 21 de outubro de 2014.

MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ
 Reitora da UFPA

ANEXO 03

PT HEMOSTASIS, Ref. 501 (lote #5005) - “instruções de uso”

PT HEMOSTASIS

Instruções de uso

Ref.: 501
MS 10006901/134

Tempo de protrombina

Finalidade - Sistema para determinação do tempo de protrombina (TP) e medição dos fatores do complexo protrombólico (fatores II, V, VII, X).

[Semente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio - A trombólise (fator tissular, fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formado, com o fator VII, um complexo estavelmente dependente do cálcio. O fator VII é transformado em uma enzima ativa (fator VIIa), que atua sobre o fator X gerando o fator Xa e este juntamente com fosfolípidos do fator tissular, transforma a protrombina em trombina. Esta, por sua vez, atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação de fibrina émoscopicamente demonstrada pelo espalhamento de um colóide. O TP é o tempo necessário para formação de fibrina após a mistura de trombólise, plasma e cálcio. Os resultados são obtidos através da comparação entre os tempos de coagulação do plasma de pacientes e do plasma de referência, representando a medida da atividade dos fatores do complexo protrombólico (fatores II, V, VII, X).

Características do sistema - O reagente PT Hemostas - Labtest contém trombólise extraída do cérebro de coelho que tem grande estabilidade às influências físicas ou combinadas dos fatores II, fator V, fator VII e fator X, quando combinada com outras trombólises de cérebro de coelho. Sua elevada sensibilidade à presença dos FPKs (Fibrin Gen Induced by Vitamin K Absence or Antagonism), com respostas bassas, próximas das trombólises humanas, propicia excelente confiabilidade no controle da terapêutica anticoagulante.

Uma importante característica do reagente Labtest está relacionada à sua estabilidade ao Tercer Reagente de Referência Internacional para Trombólise (código 818/30) da OMS e ao Índice de Sensibilidade Internacional (SI) estabelecido em relação à Primeira Preparação de Referência Internacional (PR) de Trombólise (humana) 67/40. Assim, os resultados obtidos com o PT Hemostas são substancialmente equivalentes aos que seriam encontrados se os TP fossem realizados com a PR 67/40, fazendo com que os resultados sejam padronizados em nível mundial.

Metodologia - Complexométrica - Dúplex.

Reagente

1. LITIO - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.
Material liofilizado contendo extracto de cérebro de coelho >2%, em solução fisiológica 7,6 mmol/L, cloreto de cálcio 22,2 mmol/L, água solúvel 2,15 mmol/L e estabilizadores. Ver valor de SI impresso no rótulo do frasco.

01 Português - Ref.: 501

O reagente não aberto, quando armazenado nas condições indicadas é estável até a data de expiração impressa no rótulo. Após aberto e reconstruído, o reagente deve ser manipulado de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e mecânica que podem provocar redução da estabilidade.

Preparo do reagente - Adicionar ao frasco do Reagente 1 o volume exato de água destilada ou descalcificada indicado no rótulo.

Reconstituir a Tampa, homogeneizar suavemente a dose em pouso a temperatura ambiente (entre 15 - 25 °C) durante 15 minutos. Antes de utilizar, homogeneizar suavemente. Não agitar por inversão ou vigorosamente.

O reagente reconstruído é estável 7 dias entre 2 - 8 °C, 8 horas a 37 °C e 24 horas a temperatura ambiente (entre 15 - 25 °C).

Após a reconstrução, durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e mecânica que podem provocar redução da estabilidade. Para preservar o desempenho, manter o reagente fora de temperatura de armazenamento (2 - 8 °C) somente pelo tempo mínimo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Não congelar.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.

O reagente contém água salgada que é tóxica. Não ingerir e, no caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A água pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descalcificar o reagente.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-termostático a temperatura constante (37 °C);
2. Pipetas para medir amostras e reagente;
3. Cronômetro.

Influências pré-analíticas - O TP pode estar aumentado em indivíduos em uso de corticosteróides, contraceptivos orais (tabaco na enciclopédia, hepatite A, varicela, bem como na presença de EDTA. A redução do TP pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, barbitúricos, fenobarbital, contraceptivos orais (fornecido de ressonância em anticoagulantes orais), vitamina K e cálcio. (Ver item Modificação de Ação dos Anticoagulantes Orais).



Amostra

Usar plasma citado em tubo com soroletor anticoagulante 100 mmol/L (0,2%).

Para ser citado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que descreva procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento de amostras. Condições que não foram aprovadas por este teste em amostras coletadas em outros locais podem ser muito maiores que as aprovadas durante o procedimento de validação.

Conservar em que a estabilidade de amostras é influenciada para a maioria das análises, recomenda-se a utilização de procedimentos que se seguem:

1. Utilizar sempre porções menores e evitar aglomeração, pH muito baixo, hemólise, hemaglutinação, presença de gordura, fibrina, fibrinogênio de fontes e separação de flocos fibrinogênio. A água deve penetrar facilmente na rede no primeiro teste. Quando a água não penetra, o sangue pode não fluir. Não agitar, mas manter o TP em banho de aquecimento até o teste (quebra-se a coagulação).
2. Coletar a amostra com sempre de plástico e centrifugar em tubo de plástico. O uso de material de vidro não esterilizado pode causar a coagulação e obter resultados o TP após envolver a água, lavar e pipetar com o tubo em seco. Usando as pipetas apropriadas e pipetar em um único passo.
3. No caso de sistema de coleta à vácuo, usar tubo de plástico de vidro adequado. Ao receber o sangue, o tubo deve ser imediatamente agitado vigorosamente. A pipetagem em um tubo sem anticoagulante ou um tubo contendo citrato (citrate azul) que deve ser descartado. A segunda amostra coletada em tubo contendo citrato (sangue azul) será utilizada para a análise. No caso de coleta manual, a amostra para testes de coagulação devem ser coletadas após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante e antes de coletar o tubo contendo EDTA.
4. Misturar 5 partes de sangue com 1 parte de citrato a 0,1 mL de sangue e 1 gota de trombolina (Labtest Ref.: 50). Homogeneizar 3 ou 4 vezes por inversão suave. Não mexer no tubo, pois o Fator V é muito sensível a este procedimento.
5. Em pacientes que apresentem hematomas, evitar que 50% a 100% entre os volumes de sangue e de anticoagulante deve ser utilizada para garantir a validade do teste. Para calcular o volume de anticoagulante necessário em função do hematócrito e do volume de sangue, utilizar a fórmula que se segue:

VOLUME de anticoagulante (mL) = 0,01016 x VOLUME de sangue (mL) x (100 - Hematócrito)

Exemplo

Para um hematócrito de 50%, usar 0,22 mL de citrato e completar para 3,0 mL com sangue. Para usar trombolina (Labtest Ref.: 50), adicionar 2 gotas a 0,5 mL de sangue usar na proporção indicada no rótulo.

6. Centrifugar 300 g por 10 minutos a 4 °C. Usar 15 minutos. Não é necessário remover o plasma do tubo. Manter o tubo sempre até a execução do teste para evitar mudança do pH da amostra, que pode interferir nos resultados.

7. Manter as amostras entre 18 - 24 °C, realizar o TP até 4 horas após a coleta. Não enviar o plasma, pois pode haver alteração do Fator VII pelo sistema fibrinolítico, incluindo Plasminol, o TP Caso esteja possível a de congelamento rápido, o plasma pode ser congelado a 20 °C, aquecer por 2 minutos a 70 °C, resfriar por 6 meses. Significa congelar o material em alíquotas de 0,2 mL e, para evitar variação do material dentro o período de armazenamento, utilizar frascos adequados para congelamento (vialoxite). As amostras devem ser descongeladas rapidamente a 37 °C, e analisadas imediatamente.
8. A presença de coágulo indica que o teste não foi realizado.

Amostras de sangue devem ser conservadas como procedimentos indicados. Portanto, se material não estiver disponível para análise, deve ser descartado e o material coletado, armazenado e enviado ao laboratório.

Interferências

Amostras séricas, plasmáticas e hemolizadas podem modificar os resultados de modo irregular.

Pre-sifonamento

O sifonamento pode ocorrer se aplica a técnica manual. O reagente pode ser utilizado para determinação de TP utilizando equipamentos automáticos e semi-automáticos. Recomenda-se seguir cuidadosamente as instruções de operação propostas pelos fabricantes.

1. Primeiro o sistema de referência analisado de referência (gotas) de plasma obtidas, colar de, no frasco, 3 frascos de vidro. Não usar plasma de referência de origem diferente de outros frascos ou em uso de conservantes orais. Deve-se obter o tempo de plasma de referência para cada lote de PT Hemostático. Os blocos Plásticos de Laboratório recomendam manter um registro dos lotes de PT Hemostático e dos tempos de plasma de referência.
2. Realizar o teste em labor de vidro pré-avaliado amostra.
3. A temperatura do banho-maria deve estar entre 36 - 38 °C.
4. Incluir 0,1 mL do plasma a ser analisado (identificado, controle ou paciente) por meio de um método em modo (l) manual.
5. Adicionar 0,2 mL do Reagente 1 (preparado rapidamente a 37 °C) o deixar imediatamente o cronômetro. Mediar suavemente e manter no banho-maria por 5 segundos.
6. Remover o tubo, incluir o sucessivamente em frascos manuais que 1 segundo e observar a formação de um coágulo que retorna a movimento fibrinolítico. Para desenvolver o coágulo e registrar o tempo.



02 Português - Ref.: 501

Calculos

Relação dos tempos de Protrombina (PI), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%)

Os resultados podem ser obtidos na Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%).

Localizar na Tabela P ou de Referência, o valor que mais se aproxime do tempo de coagulação obtido em mgm, o valor que mais se aproxime do tempo de coagulação obtido para o pool de referência. Em seguida, localizar na coluna correspondente tempo de coagulação da Amostra Teste. Os resultados da amostra teste, expressos em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade % podem ser obtidos na mesma linha em que se localiza o tempo em segundos da amostra teste, nas três últimas colunas da tabela.

A R e a RNI também podem ser calculadas usando as seguintes equações:

$R = \frac{\text{Tempo em segundos do plasma do paciente}}{\text{Tempo em segundos do pool de referência}}$

$RNI = R^{1,23}$

A utilização de R permite padronizar os resultados, com eliminação das variáveis introduzidas pelo custo da amostra e exclusão da metodologia.

RNI = R^{1,23}

Calibração e rastreabilidade. O PT Hemosstet foi calibrado com o Terceiro Reagente de Referência Internacional para Trombotrombina (Código 881790) de OMS e tem ligação de Simplicidade Internacional (SI) estabelecido em relação à Primeira Referência de Referência Internacional (PT) de Trombotrombina (Número 67/40¹).

Controle interno da qualidade. O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade por defini claramente os requisitos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações de qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das análises. Medidas de controle devem ser adotadas para avaliar a precisão e desvio da qualidade. Sugere-se utilizar as especificações CLIA para o erro total².

A comparação dos resultados obtidos com PT Hemosstet e outros fabricantes só deve ser realizada utilizando a RNI. A diferença relativa aceitável é igual a 10%.

Valores de referência. Esses valores devem ser usados apenas como orientação. Recomendamos que cada laboratório estabeleça, na população analisada, sua própria lista de valores de referência.

Atividade de Protrombina: maior que 70%. Valores acima de 100% não têm significado patológico; eventos são relatados como 100%.

A RNI em pessoas saudáveis encontra-se entre 1,0 e 1,08.

Controle de terapêutica anticoagulante. A utilização da RNI e especificamente indicada para estabelecer a taxa terapêutica nos pacientes em uso de anticoagulantes orais. A tabela abaixo indica os resultados a serem obtidos em diversas indicações terapêuticas³:

| Indicação Terapêutica | RNI | Variação |
|--|-----|-----------|
| Anticoagulação pre e peri-operatória (inicializada com atividade de 2 semanas): | 2,5 | 2,0 - 3,0 |
| • Cirurgias de colônias | 2,0 | 1,5 - 2,5 |
| • Outras cirurgias | 2,5 | 2,0 - 3,0 |
| Prevenção de trombose venosa profunda ou secundária | 2,5 | 2,0 - 3,0 |
| Trombose venosa alta, artéria pulmonar, prevenção de trombose venosa recorrente. | 3,0 | 2,0 - 4,0 |
| Prevenção de trombo-embolia arterial e portadora de válvulas cardíacas mecânicas | 3,5 | 3,0 - 4,5 |

Uma RNI maior que 5,0 está associada a risco elevado de hemorragia.

Segundo a OMS⁴, todos os resultados, independentemente da unidade do teste, devem ser relatados em atividade e em RNI, a todos os profissionais ligados ao uso de anticoagulantes orais devem ser encorajados a utilizar RNI e atividades e atividades de protrombina como processo de avaliação do grau de anticoagulação.

Modificação de ação dos anticoagulantes orais⁵. A ação dos anticoagulantes orais pode ser modificada por medicamentos e alterações fisiológicas de seguintes formas:

Potencializadores: álcool, fibrinolíticos, indometacina, ceftriaxona, sacubazina, ácido valérico, ácido valérico, D-oximetil, glicoxima, salina e antídotos, ceftriaxona, bicarbonato, benzocaina, indutores de MAO, tramadol, metformina, diazepam, RAS, feneladina, quina, quinina, dipirona, paracetamol, propilfenidol, glimepir e drogas hepatotóxicas.

Redutores: ácido barbitúrico, fenacetil, indometacina, imipramina, glicosídeos, estrogênio e contraceptivos orais, diureticos, álcool metílico, colestiramina, irritantes mucosas gastrointestinais.

Características de desempenho⁶

Estudos de comparação. O método proposto foi comparado com métodos similar, sendo obtidos os seguintes resultados:

| | Método Comparativo | Método Labtest |
|--|--------------------|----------------|
| Número de amostras | 97 | 97 |
| Tempo de protrombina (segundos) | 10,8 - 30,3 | 11,1 - 37,9 |
| Média das esfermitas (9 esfermitas) | 20,1 | 21,3 |
| Equação de regressão - Método Labtest = 1,05x Método Comparativo + 0,878 | | |

* A equação foi estimada utilizando o modelo de calibração de homogeneidade proposto pelo OMS que inclui o ponto de intercepto⁷.

Utilizando a equação de regressão, o erro sistemático total estimado no tempo de 13,0 segundos é igual a 0,6%, no tempo de 32,7 segundos é igual a 1,8% e no tempo de 60,3 segundos é igual a 3,3%.

Estudos de precisão. Os seguintes resultados foram obtidos nos estudos de precisão:

Reprodutibilidade - Imprecisão total

| | N | Média | DP | CV (%) |
|-----------|----|-------|-----|--------|
| Amostra 1 | 07 | 13,0 | 0,1 | 1,0 |
| Amostra 2 | 07 | 32,7 | 2,0 | 6,0 |
| Amostra 3 | 07 | 60,3 | 3,9 | 6,8 |

Reprodutibilidade - Imprecisão intra-ensaio

| | N | Média | DP | CV (%) |
|-----------|----|-------|------|--------|
| Amostra 1 | 40 | 12,9 | 0,10 | 0,8 |
| Amostra 2 | 40 | 39,0 | 0,92 | 2,1 |
| Amostra 3 | 40 | 69,5 | 1,30 | 2,2 |

Avaliação do erro total. O erro total (erro absoluto + erro sistemático) estimado no tempo de 13,0 segundos é igual a 2,6%, no tempo de 32,7 segundos é igual a 3,8% e no tempo de 60,3 segundos é igual a 7,2%. Os resultados indicam que o método atende a especificação CLIA para erro total (<15,0%)⁸.

Limite de detecção. Amostra de plasma normal foi diluída com plasma deficiente de fibrin II, VI e X, permitindo que as concentrações dos fatores variassem de 10 a 100%. Os seguintes resultados foram obtidos:

| (%) Fator | Fator II | Fator V | Fator VIII | Fator X |
|-----------|----------|---------|------------|---------|
| 100 | 11,6 | 11,6 | 11,6 | 11,7 |
| 90 | 11,6 | 13,2 | 12,9 | 12,8 |
| 40 | 11,7 | 13,9 | 12,8 | 13,3 |
| 30 | 12,3 | 14,9 | 13,5 | 14,1 |
| 20 | 12,8 | 15,9 | 13,9 | 14,8 |
| 10 | 14,1 | 18,3 | 15,2 | 17,9 |

Significado clínico. O PT está prolongado em todos os casos de deficiências congênitas ou adquiridas dos fatores II, V, VIII e X. As deficiências adquiridas ocorrem principalmente em: tratamento com anticoagulantes orais, deficiências da função de absorção de vitamina K, doenças neurológicas do eixo encéfalo-medula, tireoide hiperativa, síndrome da desregulação menstrual, endometriose, insuficiência hepática, fibrinólise e contaminação intravascular.

Na seguinte tabela a notação dos fatores II, VIII e X precede os sinais ônticos e os resultados encontrados são dependentes do ensaio e da intensidade de doença.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados confiáveis.

2. O laboratório deve ter como objetivo manter resultados estáveis e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água destilada ou desionada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no reagente final de referência, deve ser resistividade > 21 megohm/cm ou condutividade < 1 microseu/cm e concentração de sólidos < 1 mg/L. Quando a cultura de demonstração está com sua capacidade saturada ocorre produção de água ácida com liberação de vários íons, sais e substâncias com grande poder de redução ou redução que distorcem os resultados em pontos das do mesmo teste, alterando os resultados de modo impreciso. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia suger-se consultar <http://www.tco.org>.

Referências

- WHO Expert Committee on Biological Standardization, 48th Report, WHO Tech Rep Ser 1999: 889-90-95.
- Orskov L, Lee M, Biol Chem 1937: 119-134.
- International Committee for Standardization in Hematology, Thromb Haemostas 1976: 38-237-238.
- NCCLS, Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma Based Coagulation Assays, Approved Guidelines 4th Edition, NCCLS document 7-A, 2003.
- NCCLS, Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Standard 6th Edition, NCCLS document H3-A5, 2003.
- CLIA Requirements for Analytical Quality, Disponível em <<http://www.westgard.com/qla.htm>>.
- Loeber BA, Pader L, Semere E et al. Thromb Haemostas 1985: 54: 515-517.
- Henry Jopff F, Rosenthal GBM, Guerra CDC, Rev Ass Med Bras 1977: 23: 100-102.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization, 33rd Report, WHO Tech Rep Ser 1983: 687-81-105.
- Labtest: Dados de desempenho.

Apresentação

| Produto | Referência | Conteúdo |
|-------------|------------|--------------|
| PT-Hemostas | 501-5/2 | III 5 X 2 ml |

Informações ao consumidor

Termos e condições de garantia

A Labtest Diagnostica garante o desempenho deste produto dentro das especificações em relação ao desempenho técnico nos moldes estabelecidos nos cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nas instruções sob as seguintes condições:

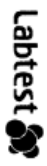
Labtest Diagnostica S.A.

CNPJ: 16.518.288 / 0001 - 38
Av. Paulo Nunes de Castro, 600 - Vila Alegre - CEP: 23040-200
Rio de Janeiro - RJ
Linha Sênior - Atendimento ao Cliente - www.labtest.com.br
Serviço de Apoio ao Cliente | (0800) 071 34 11 (ligação gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Produto desenvolvido em 2006
Pat. 1.70326

Copyright by Labtest Diagnostica S.A.
Reprodução não permitida sem autorização

05 Permaplas - Ref.: 501



ANEXO 04

Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e
Atividade de Protrombina (A%)

PT HEMOSTASIS

Ref: 501-5/2

Tabela de Conversão em Relação (R), Razão Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrusão (AS).
 Tabela de Conversión en Relación (R), Razón Internacional Normalizada (RNI) y Actividad de Protrusión (AS).
 Conversion Table in Prothrombin Ratio (PR), International Normalized Ratio (INR), and Prothrombin Activity (AS).

| Amostra / Muestra / Sample | Tempo de coagulação (segundos) / Tempo de coagulation (seconds) / Coagulation time (seconds) | | | | | | | | | | R | PR | RNI | RNI | INR | AS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 115 | 120 | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pool de Referência / Referencia Pool | 117 | 122 | 128 | 133 | 138 | 143 | 148 | 153 | 158 | 162 | 167 | 172 | 177 | 182 | 187 | 192 | 197 | 202 | 207 | 212 | 217 | 222 | 227 | 232 | 237 | 242 | 247 | 252 | 257 | 262 | 267 | 272 | 277 | 282 | 287 | 292 | 297 | 302 | 307 | 312 | 317 | 322 | 327 | 332 | 337 | 342 | 347 | 352 | 357 | 362 | 367 | 372 | 377 | 382 | 387 | 392 | 397 | 402 | 407 | 412 | 417 | 422 | 427 | 432 | 437 | 442 | 447 | 452 | 457 | 462 | 467 | 472 | 477 | 482 | 487 | 492 | 497 | 502 | 507 | 512 | 517 | 522 | 527 | 532 | 537 | 542 | 547 | 552 | 557 | 562 | 567 | 572 | 577 | 582 | 587 | 592 | 597 | 602 | 607 | 612 | 617 | 622 | 627 | 632 | 637 | 642 | 647 | 652 | 657 | 662 | 667 | 672 | 677 | 682 | 687 | 692 | 697 | 702 | 707 | 712 | 717 | 722 | 727 | 732 | 737 | 742 | 747 | 752 | 757 | 762 | 767 | 772 | 777 | 782 | 787 | 792 | 797 | 802 | 807 | 812 | 817 | 822 | 827 | 832 | 837 | 842 | 847 | 852 | 857 | 862 | 867 | 872 | 877 | 882 | 887 | 892 | 897 | 902 | 907 | 912 | 917 | 922 | 927 | 932 | 937 | 942 | 947 | 952 | 957 | 962 | 967 | 972 | 977 | 982 | 987 | 992 | 997 | 1002 | 1007 | 1012 | 1017 | 1022 | 1027 | 1032 | 1037 | 1042 | 1047 | 1052 | 1057 | 1062 | 1067 | 1072 | 1077 | 1082 | 1087 | 1092 | 1097 | 1102 | 1107 | 1112 | 1117 | 1122 | 1127 | 1132 | 1137 | 1142 | 1147 | 1152 | 1157 | 1162 | 1167 | 1172 | 1177 | 1182 | 1187 | 1192 | 1197 | 1202 | 1207 | 1212 | 1217 | 1222 | 1227 | 1232 | 1237 | 1242 | 1247 | 1252 | 1257 | 1262 | 1267 | 1272 | 1277 | 1282 | 1287 | 1292 | 1297 | 1302 | 1307 | 1312 | 1317 | 1322 | 1327 | 1332 | 1337 | 1342 | 1347 | 1352 | 1357 | 1362 | 1367 | 1372 | 1377 | 1382 | 1387 | 1392 | 1397 | 1402 | 1407 | 1412 | 1417 | 1422 | 1427 | 1432 | 1437 | 1442 | 1447 | 1452 | 1457 | 1462 | 1467 | 1472 | 1477 | 1482 | 1487 | 1492 | 1497 | 1502 | 1507 | 1512 | 1517 | 1522 | 1527 | 1532 | 1537 | 1542 | 1547 | 1552 | 1557 | 1562 | 1567 | 1572 | 1577 | 1582 | 1587 | 1592 | 1597 | 1602 | 1607 | 1612 | 1617 | 1622 | 1627 | 1632 | 1637 | 1642 | 1647 | 1652 | 1657 | 1662 | 1667 | 1672 | 1677 | 1682 | 1687 | 1692 | 1697 | 1702 | 1707 | 1712 | 1717 | 1722 | 1727 | 1732 | 1737 | 1742 | 1747 | 1752 | 1757 | 1762 | 1767 | 1772 | 1777 | 1782 | 1787 | 1792 | 1797 | 1802 | 1807 | 1812 | 1817 | 1822 | 1827 | 1832 | 1837 | 1842 | 1847 | 1852 | 1857 | 1862 | 1867 | 1872 | 1877 | 1882 | 1887 | 1892 | 1897 | 1902 | 1907 | 1912 | 1917 | 1922 | 1927 | 1932 | 1937 | 1942 | 1947 | 1952 | 1957 | 1962 | 1967 | 1972 | 1977 | 1982 | 1987 | 1992 | 1997 | 2002 | 2007 | 2012 | 2017 | 2022 | 2027 | 2032 | 2037 | 2042 | 2047 | 2052 | 2057 | 2062 | 2067 | 2072 | 2077 | 2082 | 2087 | 2092 | 2097 | 2102 | 2107 | 2112 | 2117 | 2122 | 2127 | 2132 | 2137 | 2142 | 2147 | 2152 | 2157 | 2162 | 2167 | 2172 | 2177 | 2182 | 2187 | 2192 | 2197 | 2202 | 2207 | 2212 | 2217 | 2222 | 2227 | 2232 | 2237 | 2242 | 2247 | 2252 | 2257 | 2262 | 2267 | 2272 | 2277 | 2282 | 2287 | 2292 | 2297 | 2302 | 2307 | 2312 | 2317 | 2322 | 2327 | 2332 | 2337 | 2342 | 2347 | 2352 | 2357 | 2362 | 2367 | 2372 | 2377 | 2382 | 2387 | 2392 | 2397 | 2402 | 2407 | 2412 | 2417 | 2422 | 2427 | 2432 | 2437 | 2442 | 2447 | 2452 | 2457 | 2462 | 2467 | 2472 | 2477 | 2482 | 2487 | 2492 | 2497 | 2502 | 2507 | 2512 | 2517 | 2522 | 2527 | 2532 | 2537 | 2542 | 2547 | 2552 | 2557 | 2562 | 2567 | 2572 | 2577 | 2582 | 2587 | 2592 | 2597 | 2602 | 2607 | 2612 | 2617 | 2622 | 2627 | 2632 | 2637 | 2642 | 2647 | 2652 | 2657 | 2662 | 2667 | 2672 | 2677 | 2682 | 2687 | 2692 | 2697 | 2702 | 2707 | 2712 | 2717 | 2722 | 2727 | 2732 | 2737 | 2742 | 2747 | 2752 | 2757 | 2762 | 2767 | 2772 | 2777 | 2782 | 2787 | 2792 | 2797 | 2802 | 2807 | 2812 | 2817 | 2822 | 2827 | 2832 | 2837 | 2842 | 2847 | 2852 | 2857 | 2862 | 2867 | 2872 | 2877 | 2882 | 2887 | 2892 | 2897 | 2902 | 2907 | 2912 | 2917 | 2922 | 2927 | 2932 | 2937 | 2942 | 2947 | 2952 | 2957 | 2962 | 2967 | 2972 | 2977 | 2982 | 2987 | 2992 | 2997 | 3002 | 3007 | 3012 | 3017 | 3022 | 3027 | 3032 | 3037 | 3042 | 3047 | 3052 | 3057 | 3062 | 3067 | 3072 | 3077 | 3082 | 3087 | 3092 | 3097 | 3102 | 3107 | 3112 | 3117 | 3122 | 3127 | 3132 | 3137 | 3142 | 3147 | 3152 | 3157 | 3162 | 3167 | 3172 | 3177 | 3182 | 3187 | 3192 | 3197 | 3202 | 3207 | 3212 | 3217 | 3222 | 3227 | 3232 | 3237 | 3242 | 3247 | 3252 | 3257 | 3262 | 3267 | 3272 | 3277 | 3282 | 3287 | 3292 | 3297 | 3302 | 3307 | 3312 | 3317 | 3322 | 3327 | 3332 | 3337 | 3342 | 3347 | 3352 | 3357 | 3362 | 3367 | 3372 | 3377 | 3382 | 3387 | 3392 | 3397 | 3402 | 3407 | 3412 | 3417 | 3422 | 3427 | 3432 | 3437 | 3442 | 3447 | 3452 | 3457 | 3462 | 3467 | 3472 | 3477 | 3482 | 3487 | 3492 | 3497 | 3502 | 3507 | 3512 | 3517 | 3522 | 3527 | 3532 | 3537 | 3542 | 3547 | 3552 | 3557 | 3562 | 3567 | 3572 | 3577 | 3582 | 3587 | 3592 | 3597 | 3602 | 3607 | 3612 | 3617 | 3622 | 3627 | 3632 | 3637 | 3642 | 3647 | 3652 | 3657 | 3662 | 3667 | 3672 | 3677 | 3682 | 3687 | 3692 | 3697 | 3702 | 3707 | 3712 | 3717 | 3722 | 3727 | 3732 | 3737 | 3742 | 3747 | 3752 | 3757 | 3762 | 3767 | 3772 | 3777 | 3782 | 3787 | 3792 | 3797 | 3802 | 3807 | 3812 | 3817 | 3822 | 3827 | 3832 | 3837 | 3842 | 3847 | 3852 | 3857 | 3862 | 3867 | 3872 | 3877 | 3882 | 3887 | 3892 | 3897 | 3902 | 3907 | 3912 | 3917 | 3922 | 3927 | 3932 | 3937 | 3942 | 3947 | 3952 | 3957 | 3962 | 3967 | 3972 | 3977 | 3982 | 3987 | 3992 | 3997 | 4002 | 4007 | 4012 | 4017 | 4022 | 4027 | 4032 | 4037 | 4042 | 4047 | 4052 | 4057 | 4062 | 4067 | 4072 | 4077 | 4082 | 4087 | 4092 | 4097 | 4102 | 4107 | 4112 | 4117 | 4122 | 4127 | 4132 | 4137 | 4142 | 4147 | 4152 | 4157 | 4162 | 4167 | 4172 | 4177 | 4182 | 4187 | 4192 | 4197 | 4202 | 4207 | 4212 | 4217 | 4222 | 4227 | 4232 | 4237 | 4242 | 4247 | 4252 | 4257 | 4262 | 4267 | 4272 | 4277 | 4282 | 4287 | 4292 | 4297 | 4302 | 4307 | 4312 | 4317 | 4322 | 4327 | 4332 | 4337 | 4342 | 4347 | 4352 | 4357 | 4362 | 4367 | 4372 | 4377 | 4382 | 4387 | 4392 | 4397 | 4402 | 4407 | 4412 | 4417 | 4422 | 4427 | 4432 | 4437 | 4442 | 4447 | 4452 | 4457 | 4462 | 4467 | 4472 | 4477 | 4482 | 4487 | 4492 | 4497 | 4502 | 4507 | 4512 | 4517 | 4522 | 4527 | 4532 | 4537 | 4542 | 4547 | 4552 | 4557 | 4562 | 4567 | 4572 | 4577 | 4582 | 4587 | 4592 | 4597 | 4602 | 4607 | 4612 | 4617 | 4622 | 4627 | 4632 | 4637 | 4642 | 4647 | 4652 | 4657 | 4662 | 4667 | 4672 | 4677 | 4682 | 4687 | 4692 | 4697 | 4702 | 4707 | 4712 | 4717 | 4722 | 4727 | 4732 | 4737 | 4742 | 4747 | 4752 | 4757 | 4762 | 4767 | 4772 | 4777 | 4782 | 4787 | 4792 | 4797 | 4802 | 4807 | 4812 | 4817 | 4822 | 4827 | 4832 | 4837 | 4842 | 4847 | 4852 | 4857 | 4862 | 4867 | 4872 | 4877 | 4882 | 4887 | 4892 | 4897 | 4902 | 4907 | 4912 | 4917 | 4922 | 4927 | 4932 | 4937 | 4942 | 4947 | 4952 | 4957 | 4962 | 4967 | 4972 | 4977 | 4982 | 4987 | 4992 | 4997 | 5002 | 5007 | 5012 | 5017 | 5022 | 5027 | 5032 | 5037 | 5042 | 5047 | 5052 | 5057 | 5062 | 5067 | 5072 | 5077 | 5082 | 5087 | 5092 | 5097 | 5102 | 5107 | 5112 | 5117 | 5122 | 5127 | 5132 | 5137 | 5142 | 5147 | 5152 | 5157 | 5162 | 5167 | 5172 | 5177 | 5182 | 5187 | 5192 | 5197 | 5202 | 5207 | 5212 | 5217 | 5222 | 5227 | 5232 | 5237 | 5242 | 5247 | 5252 | 5257 | 5262 | 5267 | 5272 | 5277 | 5282 | 5287 | 5292 | 5297 | 5302 | 5307 | 5312 | 5317 | 5322 | 5327 | 5332 | 5337 | 5342 | 5347 | 5352 | 5357 | 5362 | 5367 | 5372 | 5377 | 5382 | 5387 | 5392 | 5397 | 5402 | 5407 | 5412 | 5417 | 5422 | 5427 | 5432 | 5437 | 5442 | 5447 | 5452 | 5457 | 5462 | 5467 | 5472 | 5477 | 5482 | 5487 | 5492 | 5497 | 5502 | 5507 | 5512 | 5517 | 5522 | 5527 | 5532 | 5537 | 5542 | 5547 | 5552 | 5557 | 5562 | 5567 | 5572 | 5577 | 5582 | 5587 | 5592 | 5597 | 5602 | 5607 | 5612 | 5617 | 5622 | 5627 | 5632 | 5637 | 5642 | 5647 | 5652 | 5657 | 5662 | 5667 | 5672 | 5677 | 5682 | 5687 | 5692 | 5697 | 5702 | 5707 | 5712 | 5717 | 5722 | 5727 | 5732 | 5737 | 5742 | 5747 | 5752 | 5757 | 5762 | 5767 | 5772 | 5777 | 5782 | 5787 | 5792 | 5797 | 5802 | 5807 | 5812 | 5817 | 5822 | 5827 | 5832 | 5837 | 5842 | 5847 | 5852 | 5857 | 5862 | 5867 | 5872 | 5877 | 5882 | 5887 | 5892 | 5897 | 5902 | 5907 | 5912 | 5917 | 5922 | 5927 | 5932 | 5937 | 5942 | 5947 | 5952 | 5957 | 5962 | 5967 | 5972 | 5977 | 5982 | 5987 | 5992 | 5997 | 6002 | 6007 | 6012 | 6017 | 6022 | 6027 | 6032 | 6037 | 6042 | 6047 | 6052 | 6057 | 6062 | 6067 | 6072 | 6077 | 6082 | 6087 | 6092 | 6097 | 6102 | 6107 | 6112 | 6117 | 6122 | 6127 | 6132 |

| Lot#/Lot: 5005 | | ISI: 0.86 | | | | | | | | | | R | RNI | RNI | AS |
|---------------------------------------|------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|----|
| Amoeda / Moeda / Sample | | Tempo de coagulação (segundos) / Coagulation time (seconds) | | | | | | | | | | PR | INR | INR | AS |
| Pot de Referência / Referencia Pot | 11.5 | 12.0 | 12.5 | 13.0 | 13.5 | 14.0 | 14.5 | 15.0 | 15.5 | 16.0 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 100 | |
| | 27.0 | 28.2 | 29.4 | 30.6 | 31.7 | 32.9 | 34.1 | 35.3 | 36.4 | 37.5 | 2.35 | 2.09 | 23 | | |
| | 27.6 | 28.8 | 30.0 | 31.2 | 32.4 | 33.6 | 34.8 | 36.0 | 37.2 | 38.4 | 2.40 | 2.12 | 22 | | |
| | 28.2 | 29.4 | 30.6 | 31.9 | 33.1 | 34.3 | 35.5 | 36.8 | 38.0 | 39.2 | 2.45 | 2.16 | 22 | | |
| | 28.8 | 30.0 | 31.3 | 32.5 | 33.8 | 35.0 | 36.3 | 37.5 | 38.8 | 40.0 | 2.50 | 2.20 | 21 | | |
| | 29.3 | 30.5 | 31.9 | 33.2 | 34.4 | 35.7 | 37.0 | 38.3 | 39.5 | 40.8 | 2.55 | 2.24 | 20 | | |
| | 29.9 | 31.2 | 32.5 | 33.8 | 35.1 | 36.4 | 37.7 | 39.0 | 40.3 | 41.6 | 2.60 | 2.27 | 19 | | |
| | 30.5 | 31.8 | 33.1 | 34.5 | 35.8 | 37.1 | 38.4 | 39.8 | 41.1 | 42.5 | 2.65 | 2.31 | 19 | | |
| | 31.1 | 32.4 | 33.8 | 35.1 | 36.5 | 37.8 | 39.2 | 40.5 | 41.9 | 43.2 | 2.70 | 2.35 | 18 | | |
| | 31.6 | 33.0 | 34.4 | 35.8 | 37.1 | 38.5 | 39.9 | 41.3 | 42.6 | 44.0 | 2.75 | 2.39 | 18 | | |
| | 32.2 | 33.6 | 35.0 | 36.4 | 37.8 | 39.2 | 40.5 | 42.0 | 43.4 | 44.8 | 2.80 | 2.42 | 17 | | |
| | 32.8 | 34.2 | 35.6 | 37.1 | 38.5 | 39.9 | 41.3 | 42.8 | 44.2 | 45.6 | 2.85 | 2.46 | 17 | | |
| | 33.4 | 34.8 | 36.3 | 37.7 | 39.2 | 40.6 | 42.1 | 43.5 | 45.0 | 46.4 | 2.90 | 2.50 | 16 | | |
| | 33.9 | 35.4 | 36.9 | 38.4 | 39.8 | 41.3 | 42.8 | 44.3 | 45.7 | 47.2 | 2.95 | 2.54 | 16 | | |
| | 34.5 | 36.0 | 37.5 | 39.0 | 40.5 | 42.0 | 43.5 | 45.0 | 46.5 | 48.0 | 3.00 | 2.57 | 16 | | |
| | 35.1 | 36.6 | 38.1 | 39.7 | 41.2 | 42.7 | 44.2 | 45.7 | 47.2 | 48.7 | 3.05 | 2.61 | 15 | | |
| | 35.7 | 37.2 | 38.8 | 40.3 | 41.9 | 43.4 | 45.0 | 46.5 | 48.1 | 49.6 | 3.10 | 2.65 | 15 | | |
| | 36.2 | 37.8 | 39.4 | 41.0 | 42.5 | 44.1 | 45.7 | 47.3 | 48.8 | 50.4 | 3.15 | 2.68 | 15 | | |
| | 36.8 | 38.4 | 40.0 | 41.5 | 43.2 | 44.8 | 46.4 | 48.0 | 49.6 | 51.2 | 3.20 | 2.72 | 14 | | |
| | 37.4 | 39.0 | 40.6 | 42.3 | 43.9 | 45.5 | 47.1 | 48.8 | 50.4 | 52.0 | 3.25 | 2.76 | 14 | | |
| | 38.0 | 39.6 | 41.3 | 42.9 | 44.6 | 46.2 | 47.8 | 49.5 | 51.2 | 52.8 | 3.30 | 2.79 | 14 | | |
| | 38.5 | 40.2 | 41.9 | 43.6 | 45.2 | 46.9 | 48.6 | 50.3 | 51.9 | 53.6 | 3.35 | 2.83 | 14 | | |
| | 39.1 | 40.8 | 42.5 | 44.2 | 45.9 | 47.6 | 49.3 | 51.0 | 52.7 | 54.4 | 3.40 | 2.86 | 13 | | |
| | 39.7 | 41.4 | 43.1 | 44.9 | 46.6 | 48.3 | 50.0 | 51.8 | 53.5 | 55.2 | 3.45 | 2.90 | 13 | | |
| | 40.3 | 42.0 | 43.8 | 45.5 | 47.3 | 49.0 | 50.8 | 52.5 | 54.3 | 56.0 | 3.50 | 2.94 | 13 | | |
| | 40.8 | 42.6 | 44.4 | 46.2 | 47.9 | 49.7 | 51.5 | 53.3 | 55.0 | 56.8 | 3.55 | 2.97 | 13 | | |
| | 41.4 | 43.2 | 45.0 | 46.8 | 48.6 | 50.4 | 52.2 | 54.0 | 55.8 | 57.6 | 3.60 | 3.01 | 12 | | |
| | 42.0 | 43.8 | 45.6 | 47.5 | 49.3 | 51.1 | 52.9 | 54.8 | 56.6 | 58.4 | 3.65 | 3.04 | 12 | | |
| | 42.5 | 44.4 | 46.2 | 48.1 | 49.9 | 51.8 | 53.6 | 55.5 | 57.3 | 59.0 | 3.70 | 3.08 | 12 | | |
| | 43.1 | 45.0 | 46.9 | 48.7 | 50.6 | 52.5 | 54.4 | 56.2 | 58.1 | 59.9 | 3.75 | 3.12 | 12 | | |
| | 43.7 | 45.6 | 47.5 | 49.4 | 51.3 | 53.2 | 55.1 | 57.0 | 58.9 | 60.6 | 3.80 | 3.15 | 12 | | |
| | 44.3 | 46.2 | 48.1 | 50.0 | 52.0 | 53.9 | 55.8 | 57.7 | 59.7 | 61.4 | 3.85 | 3.19 | 11 | | |
| | 44.8 | 46.8 | 48.7 | 50.7 | 52.6 | 54.6 | 56.5 | 58.5 | 60.4 | 62.2 | 3.90 | 3.22 | 11 | | |
| | 45.4 | 47.4 | 49.4 | 51.3 | 53.3 | 55.3 | 57.3 | 59.2 | 61.2 | 63.0 | 3.95 | 3.26 | 11 | | |
| | 46.0 | 48.0 | 50.0 | 52.0 | 54.0 | 56.0 | 58.0 | 60.0 | 62.0 | 64.0 | 4.00 | 3.29 | 11 | | |
| | 46.6 | 48.6 | 50.6 | 52.6 | 54.7 | 56.7 | 58.7 | 60.7 | 62.8 | 64.8 | 4.05 | 3.33 | 11 | | |

03 Português - Español - Inglês - Ref.: 501-5/2



| Lot#/Lot: 5005 | | ISI: 0.86 | | | | | | | | | | R | RNI | RNI | AS |
|---------------------------------------|------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|----|
| Amoeda / Moeda / Sample | | Tempo de coagulação (segundos) / Coagulation time (seconds) | | | | | | | | | | PR | INR | INR | AS |
| Pot de Referência / Referencia Pot | 11.5 | 12.0 | 12.5 | 13.0 | 13.5 | 14.0 | 14.5 | 15.0 | 15.5 | 16.0 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 100 | |
| | 47.1 | 49.2 | 51.2 | 53.3 | 55.3 | 57.4 | 59.4 | 61.5 | 63.5 | 65.5 | 4.10 | 3.37 | 10 | | |
| | 47.7 | 49.8 | 51.9 | 53.9 | 56.0 | 58.1 | 60.2 | 62.2 | 64.3 | 66.3 | 4.15 | 3.40 | 10 | | |
| | 48.3 | 50.4 | 52.5 | 54.6 | 56.7 | 58.8 | 60.9 | 63.0 | 65.1 | 67.2 | 4.20 | 3.44 | 10 | | |

Para obtenção dos resultados/Para obtener los resultados/For obtain the results:

- Determinar o tempo de protrombina do pot de referência e da amoeda test.
Determinar el tiempo de protrombina del pot de referencia e de la muestra test.
Determine the prothrombin time of the reference pot and the test sample.
- Localizar o resultado obtido para o pot de referência na linha "Pot de Referência" e obter o tempo de coagulação designado em segundos.
Localizar el resultado obtenido para el pot de referencia en la línea "Pot de Referencia", después de obtener el tiempo de coagulación según se indica.
Find the obtained result for the reference pot in the "Reference Pot" line, where the coagulation time is shown in boldface.
- Localizar na coluna correspondente, o tempo de coagulação de "Amoeda Test".
Localizar en la columna correspondiente, el tiempo de coagulación de la "Muestra Test".
Find in the matching column the coagulation time for the "Test Sample".
- Os resultados de amoeda test, expressos em segundos (PR) e Índice ISI % podem ser obtidos na mesma linha em que se localiza o tempo em segundos da amoeda test, nos três últimos dígitos.
Los resultados de la muestra test, expresados en segundos (PR), Índice ISI % pueden ser obtenidos en la misma línea donde se localiza el tiempo en segundos de la muestra test, en los últimos tres dígitos de la línea.
The results for the test sample, expressed as PR, ISI and % can be found on the same line as the time in seconds for the test sample, in the last three columns of the table.

Edição/Edición/Edición: 2018/02/16

Ref.: 2209155015005

04 Português - Español - Inglês - Ref.: 501-5/2



ANEXO 05

APTT HEMOSTASIS, Ref. 502 - “instruções de uso”.

APTT HEMOSTASIS

Inst. UFGDs - 66 - Ufso

Ref.: 502
MS 10019010135

Tempo de tromboplastina parcial ativada

Finalidade - Reagente para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e medição dos fatores de coagulação baseados no tempo de tromboplastina parcial ativada.

Indicação para uso diagnóstico in vitro.

Princípio - O reagente contém ativador plasmatico (ácido estírico) dissociado e mecanismo de coagulação de via intrínseca através da ativação do fator XI (Hageman), que torna um complexo com o citrato do alto peso molecular (HMW) e com a pré-calceína (PK). O fator XI ativado atua sobre o fator XI gerando o fator XII que na presença de trombolíticos e calice paratormina o fator IX em uma enzima ativa (fator IXa) o fator X. Este fator ativado transforma a protrombina em trombina que atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação de fibrina é microscópicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. O TTPa é realizado incluindo o plasma citratado com o reagente contendo ativador e trombolíticos. Após a leitura de cálcio, faz-se a medição do tempo de formação do coágulo.

Característica do sistema - O produto APTT Hemostasis - Labtest contém substitutos de tromboplastinas plasmáticas que, juntamente com um ativador solúvel, ácido estírico, proporcionam condições ideais para a ativação por contato dos fatores da coagulação. Na intrínseca, a presença de ser soroável a deficiência de todos os fatores de coagulação, com exceção de fator VII, o sistema APTT Hemostasis detecta deficiências hemorrágicas separadas principalmente a deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII, XIII, XIV, e XV. O APTT Hemostasis pode ser utilizado também com sucesso para monitorar pacientes em terapia com heparina. O sistema é simplesmente sensível para detectar diferentes concentrações de seu anticoagulante, permitindo prolongamento do tempo de coagulação proporcional a concentração de heparina no plasma.

Metodologia

Reagente

- 1. ELET - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8°C.**
Contém ácido stárico 259 μmol/L, trombolítico de cálcio de cálcio 2400μM, Hec 320 mmol/L, albumina bovina 0,05%, estabilizadores e preservativos. Pronto para uso.
- 2. ELET - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8°C.**
Contém cálcio de cálcio 20 mmol/L e ácido stárico 50,05%.

O reagente não deve ser armazenado nas condições indicadas, sob condições de alta de exposição impressa no rótulo. Após abertura, os reagentes devem ser manipulados de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução de estabilidade.

O Reagente 1 deve permanecer aberto e fora da temperatura de armazenamento somente o tempo necessário para obter o volume a ser utilizado no teste. A exposição prolongada do Reagente 1 ao ar atmosférico pode comprometer o desempenho do mesmo. A estabilidade do Reagente 1 pode ser comprometida com a introdução de potências malfezentes.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.

O Reagente 2 contém ácido stárico que é tóxico. Não ingerir e, no caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

A caixa pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Evitar, evitar grandes volumes de água para dessecar o reagente.

Material necessário e não fornecido

1. Garfo metálico mantido a temperatura constante (37°C).
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

Influências pré-analíticas - O TTPa pode estar aumentado em indivíduos em uso de ácido acetilsalicílico, aspirina, cloxacilo, metotrexato e heparina. A leitura do TTPa pode ser observada em indivíduos em uso de anti-hemorrálicos, digitálicos, contraceptivos orais, heparidina e estrogênios conjugados. É importante também que a amostra seja colhida, preservada e armazenada conforme descrito no item AMOSTRA.

AMOSTRA

Usar plasma citado em citrato trissódico a uma 109mmol/L (3,2%). Deve ser citado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preservação e armazenamento da amostra. Erros técnicos que erros técnicos e amostras podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Considerando que a qualidade da amostra é fundamental para a exatidão dos resultados, recomenda-se a utilização dos procedimentos que se seguem:

1. Obter o sangue por punção venosa e evitar qualquer movimento prolongado, hemólise, formação de bolhas e exposição do líquido residual (tubo B). A agulha deve permanecer dentro do tubo no momento em que o sangue venoso é transferido. O sangue deve fluir livremente sem que seja necessário aplicar compressão longa ao punção. Não realizar o TTPa em amostra colhida por punção de diálise (puncção venosa transcateter).

2. Coletar a amostra com seringa de plástico e centrifugar em tubos de plástico. O uso de material de vidro não esterilizado para os tubos de coagulação e para armazenamento do TTPa. Após remover a agulha, utilizar o punço central da amostra na seringa, deixando as porções anterior e posterior para outros testes.

3. No caso de sistema de coleta a vácuo, usar tubo de plástico ou vidro esterilizado. Ao receber o tubo succionado para testes de coagulação, coletar para testes de coagulação dentro de um tubo sem anticoagulante ou em tubo contendo citrato (tampa azul) que deve ser desprotegido.

A segunda amostra colhida em tubo contendo citrato (tampa azul) será utilizada para a medição dos testes. No caso de coleta múltipla, a amostra para testes de coagulação deve ser colhida após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante e antes de coletar em tubo contendo EDTA.

4. Misturar 9 partes de sangue com 1 parte de citrato ou 3 mL de sangue a 1 mL de trombolítico (Labtest Ref.: 45). Homogeneizar 3 ml 4 vezes por período curto. Não usar oxalato, pois o fator V é muito sensível a este anticoagulante.

5. Em pacientes que apresentem hematócrito maior que 55% a leitura sobre o volume de sangue e de anticoagulante deve ser ajustada para garantir a leitura de referência. Para calcular o volume de anticoagulante necessário em função do hematócrito e do volume de sangue, utilizar a fórmula que se segue:

Volume de anticoagulante (mL) = 0,00165 x volume de sangue (mL) x (100 - hematócrito)

Exemplo - Para um hematócrito de 60% usar 0,22 mL de citrato e completar para 3,0 mL com sangue. Para usar trombolítico (Labtest Ref.: 45), adicionar 2 gotas a 0,5 mL de água e usar na proporção indicada pelo rótulo.

6. Centrifugar para 1 hora após a coleta a 2000 rpm ou 1500 g durante 15 minutos. Não é necessário remover o plasma do tubo. Manter o tubo tampado até a execução do teste para evitar mudança de pH da amostra, que pode interferir nos resultados.

7. Manter as amostras entre 2 - 26°C e manter o TTPa 48-64 horas após a coleta. Caso estas condições de congelamento não sejam atingidas, separar das células, após ser congelado a 20°C, negligenciar por 2 semanas ou 30°C congelar por 6 meses. Seguir sempre o manual detalhado de uso de 0,5 mL de água para evitar resquecimento do material durante o período de armazenamento, utilizar frascos adequados para congelamento (contidos 1). As amostras devem ser descongeladas rapidamente a 37°C e testadas imediatamente.

8. A presença de coágulos impede a leitura de amostra.

Amostras de sangue devem ser conservadas como procedimentos habituais. Permitir, ao menos, 30-60 minutos para estabilização para hemostase.

Para descrever os reagentes e o material utilizado, sugerimos aplicar as normas técnicas, estatísticas ou técnicas de produção ambiental.

Interferências

Amostras ictericas, lipêmicas e hemolizadas podem modificar os resultados de modo imprevisível.

Procedimento

O seguinte procedimento se aplica a técnica manual. O produto pode ser empregado para determinação de TTPa utilizando equipamentos automáticos e semi-automáticos. Recomendamos seguir exatamente as instruções de operação propostas pelo fabricante.

1. Realizar o teste utilizando tubos de vidro (quase sempre limpos).

2. A temperatura do banho-maria deve estar entre 36 - 38°C.

3. Pré-aquecer o Reagente 2 (20 mmol/L) a 37°C.

4. Incluir a 37°C, 0,1 mL do plasma a ser medido (contido no paciente) por no mínimo um minuto e em volume 10 minutos.

5. Adicionar 0,1 mL do Reagente 1, homogeneizar e incluir a 37°C por 3 a 5 minutos (tempo de ativação). Para obter resultados reprodutíveis o tempo de ativação deve ser padronizado para todas as amostras.

6. Adicionar 0,1 mL do Reagente 2 (previamente aquecido a 37°C) e deixar amornar durante o cronômetro. Manter o sistema a 37°C no banho-maria a 37°C por 15 a 20 segundos.

7. Remover o tubo, inclinar o sucessivamente em intervalos internos que 1 segundo e observar a formação de um coágulo que interfere a monitorização do líquido. Para medição de consumo e registrar o tempo.

Controle interno da qualidade - O laboratório deve manter um programa de controle interno de qualidade que abranja os seguintes aspectos: aptidão, validade, precisão, exatidão para especificações da qualidade e testes de laboratório, ações corretivas e registro dos eventos. Manter os controle devem ser utilizados para monitorar a precisão e da medição. Sempre se utilizar as especificações CLIA para o ensaio.

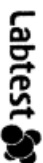
Intervalo de referência**

Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, seus próprios intervalos de referência.

01 Português - Ref.: 502



02 Português - Ref.: 502



| Idade | Intervalo (segundos) |
|--|----------------------|
| 2 meses | 20,3 - 45,9 |
| 5 meses | 28,1 - 45,9 |
| Gravidez a partir de 6 meses e adultos | 28,7 - 37,6 |

Características do desempenho¹

Estudos de comparação. O método proposto foi comparado com métodos similares, sendo obtidos os seguintes resultados:

| | Método Comparativo | Método Labtest |
|--|---------------------------------------|----------------|
| Número de amostras | 205 | 205 |
| Tempo de hemaglutinação parcial (estado líquido) | 21,9 - 200 | 21,0 - 167,8 |
| Média das amostras (segundos) | 34,6 | 32,7 |
| Equação de regressão | Labtest = 0,8233 x Comparativo + 4,25 | |
| Coefficiente de correlação | 0,985 | |

Utilizando a equação de regressão, o erro sistemático total estimado no tempo de 20,7 segundos é igual a 1,0% e no tempo de 65,0 segundos é igual a 1,2%.

Estudos de precisão. Os seguintes resultados foram obtidos nos estudos de precisão:

| Reprodutibilidade - Imprecisão Intra-ensaio | | | | |
|---|----|-------|------|--------|
| | N | Média | DP | CV (%) |
| Amostra 1 | 10 | 25,0 | 0,08 | 0,3 |
| Amostra 2 | 10 | 68,6 | 0,50 | 0,9 |

| Reprodutibilidade - Imprecisão total | | | | |
|--------------------------------------|---|-------|------|--------|
| | N | Média | DP | CV (%) |
| Amostra 1 | 5 | 25,7 | 0,19 | 0,7 |
| Amostra 2 | 5 | 65,0 | 0,79 | 1,2 |

Avaliação do erro total. - O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado no tempo de 25,7 segundos é igual a 3,13% e no tempo de 65,6 segundos é igual a 4,38%. Os resultados indicam que o método usado é especificação CLIA para erro total (51,5,0%)¹.

Sensibilidade à heparina. - O TTPA é utilizado para monitorar a terapia com heparina, considerando que o prolongamento do tempo de formação do coágulo é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de heparina.

03 Português - Ref.: 502

A ação anticoagulante da heparina depende de muitos fatores, tais como: nível adequado de antitrombina III, atividade plasmática e subseqüente precipitação do fibrinógeno. Medicamentos, taxa de metabolização e forma de administração da heparina e o tempo entre a coleta e realização do teste influenciam muito o resultado.

A sensibilização nativa do reagente APRT Hemostase para a heparina pode ser determinada estabelecendo-se uma curva de sensibilização à heparina. A curva deve ser construída adicionando-se quantidades conhecidas de heparina a um pool de plasma normal e realizando o teste para determinação do TTPA. O resultado deve realizar o teste de sensibilização utilizando a heparina de mesma fonte de administração do paciente e evitando-se em consideração as variáveis que influenciam no teste.

O exemplo abaixo ilustra a relação entre concentração de heparina e o tempo em segundos obtido com o reagente APRT Hemostase e um coagulômetro automático.

| Concentração de Heparina (unidades/ml) | TTPA (segundos) |
|--|-----------------|
| 0,0 | 24,3 |
| 0,1 | 27,2 |
| 0,2 | 33,6 |
| 0,3 | 42,1 |
| 0,4 | 53,0 |
| 0,5 | 65,5 |
| 0,6 | 77,9 |
| 0,7 | 93,7 |

Sensibilização à deficiência dos fatores de coagulação. Plasma com deficiência nativa e para os vários fatores foram avaliados com o reagente APRT Hemostase e o reagente demonstrou sensibilização adequada às deficiências dos fatores de coagulação conforme estabelecido na tabela a seguir.

| Fator | Atividade do fator% | TTPA (segundos) |
|--------------|---------------------|-----------------|
| VIII | <1 | 82,0 |
| VIII | 20 | 44,4 |
| IX | <1 | 83,5 |
| IX | 20 | 40,9 |
| XI | <1 | 134,2 |
| XI | 20 | 47,9 |
| XI | <1 | >200 |
| XI | 20 | 36,7 |
| Pré-calorina | <1 | 69,5 |

Significado clínico. O TTPA avalia os vias fibrinólise e confirma a capacidade de coagulação. O TTPA é reservado para avaliar as deficiências dos fatores VII, IX do que as deficiências dos fatores XI, XII ou fatores da via comum, mas, na maioria das vezes, a maioria entre 15% e 30% do normal prolonga o TTPA. O TTPA é usado para detecção de deficiências ou elevações dos fatores de coagulação da via fibrinólise de corrent, além de se prestar para monitoração de anticoagulação com heparina e para tratamento de anticoagulação excessiva.



Diferenças de via fibrinólise de causa de coagulação são caracterizados pelo TTPA prolongado e o tempo de Fibrinólise (TP) normal. Formas heterozigotas incluem a deficiência dos fatores VII ou IX (hemostase A ou B respectivamente), fator XI, XII, XIII, deficiência de um dos fatores de coagulação e fator XII. A deficiência dos três fatores não está associada com quadro de manifestação hemorrágica, constituindo-se apenas uma anomalia laboratorial. Distúrbios fibrinólíticos que cursam com TP normal e TTPA prolongado incluem o fibrinólise plasmática ou inibidores dos fatores VII, IX, XI, XII, além do uso de heparina.

Diferenças de via comum causam o prolongamento de TP e TTPA, os quais, quando heterozigotos, incluem formas mais de deficiência de um dos seguintes fatores: fator X, fator V, antitrombina ou fibrinogênio. Por outro lado, deficiências sintomáticas de alguns destes fatores geralmente são heterozigotas por outros sorotipos (na via fibrinólise e na via comum), como ocorre nas hemofílicas, na coagulopatia hereditária disseminada (DDV) ou na deficiência de von Willebrand Factor, quando o TP e o TTPA estão prolongados, torna-se importante a realização da dosagem de fibrinogênio e do tempo de formação (TF), que pode variar-se de acordo com o método empregado ou o teste empregado.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório utiliza um como objetivo termostático exatos e preciso. A estabilidade de água de qualidade adequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água utilizada ou estocada utilizando no laboratório deve ser a qualidade adequada e cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas amostras e para uso no diagnóstico final de rotina, deve ser resfriado a 21 graus Celsius ou controlado a 18-20 graus Celsius e congelado de imediato (<10 mg/L). Quando a coltura de células está com sua quantidade suficiente ocorre produção de água açúcares com formação de vários íons, ácidos e substâncias com grande poder de coagulação ou inibição que afetam os reagentes em alguns dias ou mesmo horas, afetando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle de qualidade de água.

3. Para uma revisão das técnicas hemostasiológicas e medicamentosas de referência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar <http://www.biol.org>.

Referências

- International Committee for Standardization in Hematology. Thrombolytic Assays. 1976; 38: 237-238.
- NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays. Approved Guidelines for Use. Edn. NCCLS document H71-A4, 2003.
- NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. Approved Standard (P16) Edition. NCCLS document H9-A5, 2003.
- NCCLS. Onco Stage Performance Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test. Approved Guidelines. NCCLS document H74-A, 1998.

04 Português - Ref.: 502

5. CLIA Requirements for Analytical Quality. Department of Health and Human Services. <<http://www.hhs.gov/ohrt/ohrt.htm>>.

6. Conway AJ, Hainthorn DE, Finn A, Bell F. Clin Lab Invest 1996; 21: 427-428.

7. Sanders MM, Choi RA, Roberts WL, Rodgers GM. Clinical Chemistry 2003; 49: 1780-1782.

8. Jacobs DS, DeMott WH, Oddy DK. Laboratory Test Handbook. 5a edição. Lab-Comp Inc. Hudson (New Jersey), 2001: 308-320.

9. Labtest. Outros de sangue.

| Apresentação | | Conteúdo |
|----------------|------------|----------------------|
| Produto | Referência | |
| APRT Hemostase | 502-1/4 | 1 X 4 mL 1 X 8 mL |

Estão disponíveis informações para sistemas automatizados e semi-automatizados.

Informações ao consumidor

(Termos e Condições de Garantia)

A Labtest Diagnostica garante o desempenho desse produto dentro das especificações para a data de expiração indicada nos rotulos desde que os critérios de utilização e armazenamento mencionados nos rotulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnostica S.A.

CNPJ: 16.518.256 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vila Alegre - CEP: 13000-000
Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil - www.labtest.com.br
Serviço ao Cliente | 0800 001 34 11 | Segunda-Feira até Sexta-Feira, das 08h às 18h

Equip. Immuno, 2007
Ref.: 17026



ANEXO 06

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – CEP/CCS/UEPB

CAAE: #60251516.0.0000.5188

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS HEMOSTÁTICOS COMPARADO ENTRE O VENENO BRUTO E PROTEÍNAS ISOLADAS DO VENENO DE Crotalus durissus terrificus

Pesquisador: Ivancia Donato de Luna Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 6025/1616 0 0000 5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.758.115

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa ESTUDOS HEMOSTÁTICOS COMPARADO ENTRE O VENENO BRUTO E PROTEÍNAS ISOLADAS DO VENENO DE Crotalus durissus terrificus- tem como responsável Ivancia Donato de Luna Sousa/Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular/CCEM/UFPB.

Descrição:

Sabe-se até o momento que o veneno de C. d. terrificus possui atividade coagulante in vitro, porém no organismo vivo as interações entre as proteínas do veneno fazem com que prevalença pequenas atividades hemorrágicas devido ao provável consumo de fibrinogênio, deixando-se a dúvida de se realmente tal fato está correto ou se não há interações entre as proteínas do veneno com alguns fatores de coagulação que possam ser suprimidos ou alterados que possam levar a incoagulabilidade do sangue em organismos vivos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

O presente projeto propõe estudos hemostáticos para descrever a atuação das proteínas presentes no veneno de Crotalus durissus terrificus sobre os fatores de coagulação das vias extrínseca, via intrínseca e via comum em humanos

Endereço: UNIVERSITARIO SIN
Bairro: CASTELO BRANCO
UF: PB
Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791
Fax: (83)3216-7791
CEP: 58.051-900
Email: elitace@ccs.ufpb.br

Página 01 de 03

Continuação do Parecer: 1.758.115

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos previstos envolvidos no projeto, visto que os testes realizados serão In Vitro com ensaios de plasma utilizando kits comerciais já preparados;

Benefícios:

O teste do TP e TTPA poderá auxiliar em uma possível resposta para essa questão, pois medirá em qual fator hemostático o veneno estará atuando na via bem como cada proteína isolada do veneno, sendo necessário investigação para um melhor esclarecimento da atuação do veneno sistematicamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O referido Projeto de Pesquisa está escrito e organizado com as diversas etapas necessárias para que o mesmo seja desenvolvido: apresentação, desenho do estudo, resumo, introdução, objetivos, riscos/benefícios, metodologia, cronograma, orçamento e outros. A documentação exigida pela Resolução 466/2012/CNS/MS que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos está incluída no Processo.

METODOLOGIA:

- 1-É um estudo de laboratório:isolar frações proteicas que compõem a peçonha das serpentes Crotalus durissus terrificus/fracionar o perfil cromatográfico dos venenos/isolar as proteínas/coletar sangue humano de doadores voluntários e sadios em jejum de no mínimo duas horas/realizar o teste de coagulação com o plasma obtidos do sangue de doadores voluntários/teste de protrombina/purificação, caracterização de efeitos biológicos do veneno bruto e de frações de peçonhas de serpentes/isolamento das proteínas e outros ensaios;
- 2-Preparação/Amostragem coleta de sangue-indivíduos/04;
- 3-Coleta de dados: resultados dos ensaios de laboratório;
- 4-Análise dos dados:as frações obtidas do veneno por cromatografia de fase reversa será feita uma eletroforese para identificação das bandas proteicas obtidas. Os dados obtidos dos testes de coagulação serão plotados em Gráficos utilizando o programa GraphPad Prism 6 e serão analisados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do presente Projeto encontram-se coerentes com o tema abordado no

Endereço: UNIVERSITARIO SIN
Bairro: CASTELO BRANCO
UF: PB
Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791
Fax: (83)3216-7791
CEP: 58.051-900
Email: elitace@ccs.ufpb.br

Página 02 de 03

Continuação do Parecer: 1.756.115

Projeto:

Não tem pendências, portanto Aprovado.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_772125.pdf | 23/09/2016 09:51:43 | Ivancia Donato de Luna Sousa | Aceito |
| TOLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | termo.doc | 23/09/2016 09:51:00 | Ivancia Donato de Luna Sousa | Aceito |
| Cronograma | cronogramavancia.docx | 23/09/2016 09:41:46 | Ivancia Donato de Luna Sousa | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRosto.pdf | 23/09/2016 09:41:10 | Ivancia Donato de Luna Sousa | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto.docx | 15/08/2016 22:22:19 | Ivancia Donato de Luna Sousa | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 03 de Outubro de 2016

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)