

IVANCIA DONATO DE LUNA SOUSA

**ESTUDOS HEMOSTÁTICOS SECUNDÁRIOS CAUSADOS PELA PEÇONHA
BRUTA, FRAÇÕES PROTEICAS E PROTEÍNAS ISOLADAS DA PEÇONHA DE**
Crotalus durissus terrificus

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB

2017

IVANCIA DONATO DE LUNA SOUSA

**ESTUDOS HEMOSTÁTICOS SECUNDÁRIOS CAUSADOS PELA PEÇONHA
BRUTA, FRAÇÕES PROTEICAS E PROTEÍNAS ISOLADAS DA PEÇONHA DE
*Crotalus durissus terrificus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Priscila Marchi Salvador

Co-Orientadora: Hilzeth Luna Freire Pessôa

João Pessoa – PB

2017

S725e Sousa, Ivancia Donato de Luna.
Estudos hemostáticos secundários causados pela
peçonha bruta, frações proteicas e proteínas isoladas da
peçonha de *Crotalus durissus terrificus* / Ivancia Donato de
Luna Sousa. - João Pessoa, 2017.
107 f. : il. -

Orientadora: Daniela Priscila Marchi Salvador.
Coorientadora: Hilzeth Luna Freire Pessôa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. Ofidismo. 3. Tempo
de Protrombina. 4. TTPA. 5. Proteínas anticoagulantes.
I. Título.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

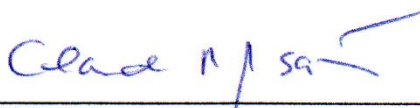
IVANCIA DONATO DE LUNA SOUSA

Dissertação de Mestrado avaliada em 29/03/2017 às 14h00

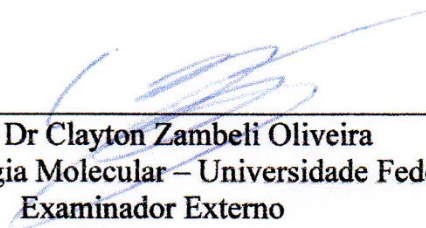
BANCA EXAMINADORA



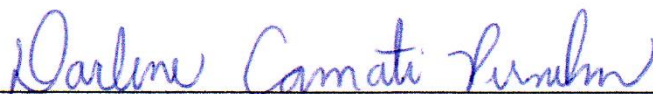
Profª Drª Daniela Priscila Marchi Salvador
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Orientadora



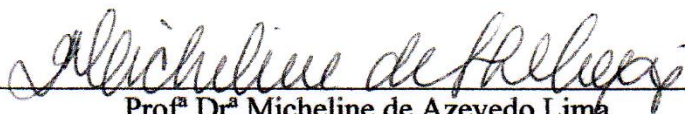
Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Fisiologia e Patologia – Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno



Profª Dr Clayton Zambeli Oliveira
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo



Profª Drª Darlene Camati Persuhn
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Suplente



Profª Drª Micheline de Azevedo Lima
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Suplente

*A Deus, que em mim me foi sustento e me deu
coragem para questionar realidades e propor
sempre um novo mundo de possibilidades.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Davi A. Donato, pela paciência e inocente compreensão.

A Minha mãe que, mesmo de idade avançada e doente, teve forças para me ajudar.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Daniela Priscila Marchi Salvador, pela orientação, amizade e dedicação ao trabalho.

A Prof^a Dr^a Hilzeth Luna Freire Pessôa pela co-orientação.

Agradeço a Ayrton Ramos Barbosa pela colaboração nos experimentos de coagulação e por sempre estar ao meu lado nas horas mais difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Diana, Sarah e Otacílio, pelo auxílio nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes pela contribuição científica e por disponibilizar toda infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, para a realização dos experimentos de cromatografia e eletroforese.

A Prof^a MSc. Paula H. Santa-Rita e a Universidade Católica Don Bosco – UCDC, Campo Grande, MS, por disponibilizarem amostras de peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*.

Ao Prof. Dr. Andreimar M. Soares da Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ, Porto Velho, RO, por colaborar, prontamente, no envio das proteínas utilizadas nos experimentos de coagulação.

A Prof^a Dr^a Micheline de Azevedo Lima pela amizade, apoio e valiosas sugestões.

A todas as minhas clientes da “Cia das Unhas” pela compreensão, paciência e apoio.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo imprescindível apoio financeiro.

Lista de Abreviaturas

ACN – Acetonitrila

CA – Crotoxina A ou Crotapotina

CB – Crotoxina B ou PLA₂ básica

CIVD – Coagulação Intravascular Disseminada

CTM – Crotamina

CTX – Crotoxina

CVX – Convulxina

GRX – Giroxina

MM – Massa Molecular

PAI – Inibidor do Ativador de Plasminogênio

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PBS – Tampão Fosfato Salina

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino

TFA – Ácido Trifluoroacético

TP – Tempo de Protrombina

TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

UFLC – Ultra Flow Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Fluxo)

PB – Peçonha Bruta

Lista de Figuras

FIGURA 01 - Espécime adulto de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	14
FIGURA 02 - Composição proteica da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	14
FIGURA 03 - Hemostasia Secundária.....	18
FIGURA 04 - Mecanismo de ação da heparina.....	23
FIGURA 05 - Atividade fármaco-receptor de diferentes classes de anticoagulantes e seus mecanismos de ação sobre a trombina e/ou Fator Xa.....	24
FIGURA 06 - Cromatograma da cromatografia líquida de fase reversa da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	33
FIGURA 07 - Perfil eletroforético das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	34
FIGURA 08 - Avaliação da atividade coagulante da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i> em plasma citratado humano.....	36
FIGURA 09 - Avaliação visual do coágulo formado pela presença da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	37
FIGURA 10 - Aspecto físico comparativo entre o plasma citratado humano e os coágulos formados pela presença de 4,0 µg de peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e de Reagente 1 do teste de coagulação PT HEMOSTASIS.....	37
FIGURA 11 - Avaliação da atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença da fração proteica #7 (Fr7) obtida da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	38
FIGURA 12 - Avaliação do Tempo de Protrombina em plasma humano citratado na presença das quantidades de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg das seis frações proteicas (Fr01 até Fr06) obtidas da peçonha bruta de <i>C. d. terrificus</i> que não apresentaram a formação de coágulo, mesmo após cinco horas de incubação em temperatura constante de 37°C.....	40

FIGURA 13 - Atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença das proteínas Giroxina (GRX) e Convulxina (CVX) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.42

FIGURA 14 - Avaliação do Tempo de Protrombina em plasma humano citratado na presença das quantidades de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg das proteínas Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB), Crotoxina (CTX) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que não apresentaram a formação de coágulo.....43

FIGURA 15 - Avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (teste de coagulação APTT HEMOSTASIS), em plasma humano citratado, na presença das proteínas Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que não apresentaram a formação de coágulo.....45

FIGURA 16 - Estrutura tridimensional da Hirudina (PDB_ID #2HIR) e da Crotamina (PDB_ID #1H5O).....48

FIGURA 17 - Resultado comparativo do tempo de formação de coágulo no plasma humano citratado na presença da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, da fração proteica #7 (Fr7) e da Giroxina.....49

Lista de Tabelas

TABELA 01 - Fatores de coagulação, suas respectivas denominações e funções.....17

TABELA 02 - Quantidade proteica (estimada por absorbância a 280nm) contida em cada fração, obtida pela cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*.....34

TABELA 03 - Valor da Relação (R) calculado para as quatro quantidades avaliadas (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) de cada fração proteica #1 a #6 (*Fr1*, *Fr2*, *Fr3*, *Fr4*, *Fr5* e *Fr6*) isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, seus valores correspondentes à Relação Normalizada Internacional (RNI) e a porcentagem da Atividade de protrombina (A%).....40

TABELA 04 - Valor da Relação (R) calculado para as quatro quantidades avaliadas (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) da Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB), Crotoxina (CTX) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, seus valores correspondentes à Relação Normalizada Internacional (RNI) e a porcentagem da Atividade de Protrombina (A%).....44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 ACIDENTES OFÍDICOS.....	13
1.2 EMBASAMENTO TEÓRICO.....	17
1.2.1 Hemostasia Secundária.....	17
1.2.2 Parâmetros Qualitativos da Hemostasia.....	20
1.2.3 Principais Doenças da Hemostasia Secundária.....	21
1.2.4 Mecanismo de Ação de Alguns Anticoagulantes Comerciais.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	27
3.1 PLASMA HUMANO CITRATADO.....	27
3.2 PEÇONHA BRUTA E PROTEÍNAS ISOLADAS.....	27
3.3 FRAÇÕES DA PEÇONHA.....	28
3.3.1 Cromatografia Líquida de Fase Reversa.....	28
3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	29
3.4 ATIVIDADE COAGULANTE.....	30
3.4.1 Peçonha Bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	30
3.4.2 Tempo de Protrombina (TP)	30
3.4.3 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)	31
3.4.4 Análise Estatística dos Dados.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 OBTENÇÃO DAS FRACÇÕES PROTEICAS DA PEÇONHA.....	33
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE	36
4.2.1 Peçonha Bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	36
4.2.2 Frações Isoladas da Peçonha Bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	38
4.2.3 Proteínas Isoladas da Peçonha Bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	41
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	51

ANEXOS

RESUMO

Acidentes ofídicos (ofidismo) são listados, pela Organização Mundial de Saúde, como doença tropical negligenciada e são considerados um problema de saúde pública. Dentre as atividades desencadeadas pelo emponhamento por *Crotalus durissus terrificus*, a coagulante é curiosa e contraditória, pois a peçonha apresenta, em sua composição, proteínas precursoras da coagulação e proteínas anticoagulantes. O presente trabalho descreve, *in vitro*, a atuação da peçonha bruta, de frações proteicas e proteínas purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre os fatores de coagulação da hemostasia secundária do plasma humano. A atividade coagulante e/ou anticoagulante da peçonha bruta, frações proteicas e proteínas purificadas foram avaliadas diretamente sobre o plasma citratado humano e as alterações no Tempo de Protrombina (TP) e no Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) foram aferidos com kits comerciais. Os coágulos formados na presença da peçonha bruta, da fração proteica #7 e da Giroxina apresentaram-se como uma massa hialina de textura flexível e pontual. A avaliação do tempo de formação dos coágulos na presença das frações proteicas #1 até #6 e das proteínas isoladas Crotoxina, Crotoxina A, Crotoxina B e Crotamina, após a aplicação dos testes comerciais (PT e APTT), possibilitou inferir que essas proteínas interferem em todas as vias da cascata de coagulação. Por conseguinte, as proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, Crotoxina e Crotamina podem atuar de forma semelhante a alguns anticoagulantes inibidores direto de trombina, do fator Xa e do ativador da antitrombina III. Ainda, a Crotoxina B pode inibir a formação do complexo protrombinase por interação direta com o fator Xa. Consequentemente, o conteúdo proteico da peçonha de *C. d. terrificus* pode atuar de forma sinérgica na coagulação e na disfunção e/ou inibição dos anticoagulantes naturais desequilibrando a hemostasia.

PALAVRAS-CHAVE: Ofidismo; Tempo de Protrombina; Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada; Proteínas Anticoagulantes.

ABSTRACT

Snakebites (Ophidism) are listed by the World Health Organization as a neglected tropical disease and are considered a public health problem. Among the activities triggered by envenoming from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, the coagulant one is intriguing and contradictory, curious and contradictory, since the venom has, in its composition, coagulation precursor proteins and anticoagulant proteins. The present work describes, in vitro, the performance of crude venom, protein fractions and purified proteins of *Crotalus durissus terrificus* venom on the coagulation factors of human plasma secondary hemostasis. The coagulant and / or anticoagulant activity of crude venom, protein fractions and purified proteins were evaluated directly on human citrated plasma. Changes in Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) were measured with commercial kits. Clots formed in the presence of crude venom, protein fraction # 7 and Gyroxin displayed as a hyaline flexible mass and steady state. The evaluation of the clot formation time in the presence of the protein fractions # 1 to # 6 and isolated proteins (Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine), after the commercial tests (PT and APTT), allowed to infer that these proteins interfere in all pathways of the coagulation cascade. Therefore, the Crotoxin A, Crotoxin B, Crotoxin and Crotamine proteins may act similarly to some anticoagulants direct inhibitors of thrombin, factor Xa and antithrombin III activator. Moreover, Crotoxin B can inhibits the formation of the prothrombinase complex by direct interaction with factor Xa. Consequently, the protein content from *C. d. terrificus* snake venom can act synergistically in coagulation and dysfunction and / or inhibition of natural anticoagulants unbalancing hemostasis.

KEYWORDS: Ophidism; Prothrombin Time; Activated Partial Thromboplastin Time; Anticoagulants Proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. 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, em muitas vezes, não atua satisfatoriamente contra os efeitos locais e sistêmicos (ALMEIDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2015).

A peçonha de serpentes é constituída por uma complexa mistura de substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas (proteínas, enzimas, peptídeos e compostos inorgânicos) as quais podem apresentar diferentes atividades fisiológicas, hematológicas e neurotransmissoras. O estudo das atividades desencadeadas pelo emponhamento contribuiu para a descoberta de vários mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos de atuação da peçonha, além de possibilitar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças (FUNASA, 2001; VIEIRA, 2014).

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

Os sinais e sintomas apresentados pelo ofidismo causado pelo gênero *Crotalus* são tanto locais quanto sistêmicos; dos locais, os mais frequentes são dor, edema e hemorragia, enquanto que os sistêmicos incluem alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório e urinário (OWNBY, 1982). A peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel sul americana mais estudada (FIGURA 01), apresenta atividade coagulante de pequena intensidade (FUNASA, 2001; LEIS & CHEBABO, 2001). 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 patologia.

A composição da peçonha e os aspectos clínicos e laboratoriais decorrentes do ofidismo causado pelas subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *C.d collineatus* são os mais estudados (ALMEIDA *et al.*, 2015; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). MELANI *et al.* (2015) caracterizaram a composição molecular da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (FIGURA 02) e descreveram as atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por suas biomoléculas.



FIGURA 01 - Espécime adulto de *Crotalus durissus terrificus*. Disponível em <<http://cobrasserpentes.blogspot.com.br/2012/09/cascavel.html>>, acesso em 19/08/2016.

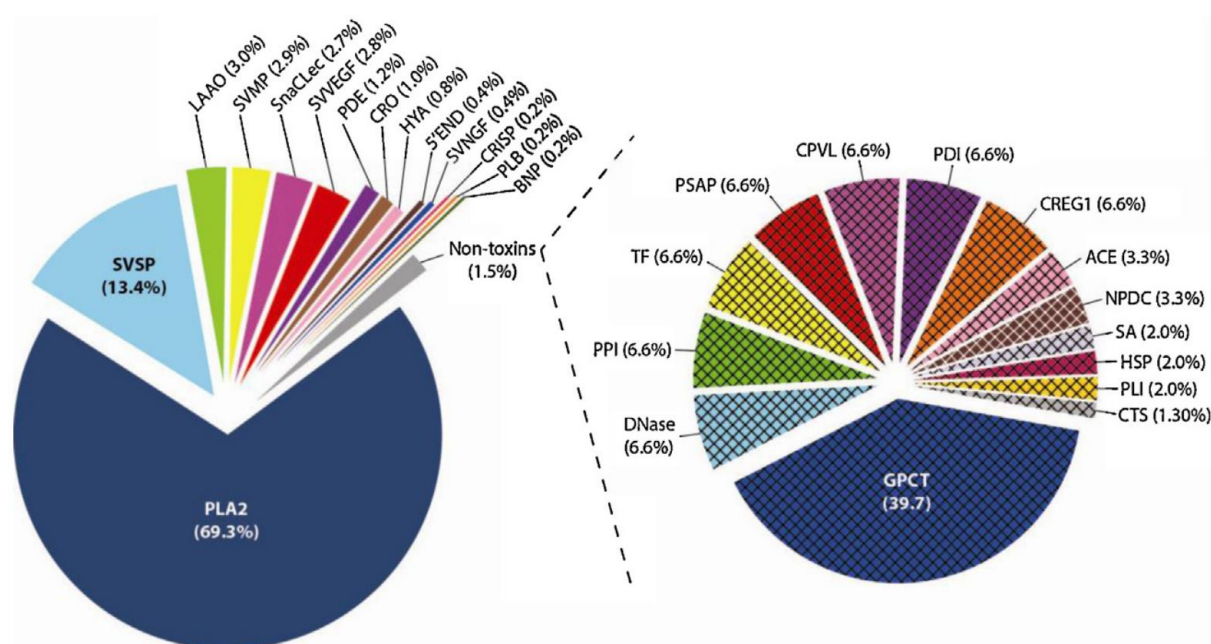


FIGURA 02 - Composição proteica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Componentes tóxicos: Fosfolipase A₂ (PLA₂ incluindo crotoxina), Serino proteinase (SVSP), L-aminoácido oxidase (LAAO), Metaloprotease (SMVP), Lectina do tipo C (SnaCLec), Fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF), Fosfodiesterase (PDE), Crotamina (CRO), Hialuronidase (HYA), ecto-5'-nucleotidase (extremidade 5'), Fator de crescimento do nervo (SVNGF), Proteína secretória rica em cisteína (CRISP), Fosfolipase B (PLB), Potenciadores de bradicinina e Peptídeos natriuréticos do tipo C (BNP); Componentes não-tóxicos: Peptídeo glutaminilo ciclotransferase (GPCT), Alfa-desoxirribonuclease-2 (DNase), Peptidil-prolilcic-trans isomerase (PPI), Transferrina (TF), Polipeptídeo proativador (PSAP), CPVL serino carboxipeptidase (CVLP), Dissulfureto isomerase proteína (PDI), Peptídeo de genes 1 estimulado por E1A (CREG1), Enzima conversora da angiotensina (ACE), Proteína 1 de proliferação neural e diferenciação/controla (NPDC), Albumina sérica (AS), Proteína de choque térmico (HSP), Inibidor de fosfolipase A₂ (PLI), e Catepsina (CTS). Fonte: MELANI *et al*, 2015.

✓ *Crotoxina* (CTX): principal componente ativo da peçonha de *C. d. terrificus*. Foi a primeira toxina animal isolada (FAURE & BON, 1987; SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT,

1938) e caracterizada como uma neurotoxina de ação pré-sináptica que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina (neurotransmissor responsável pela transmissão do estímulo nervoso). A CTX é um complexo heterodimérico formado por dois componentes ligados não covalentemente. A Crotoxina A (CA) ou crotapotina, possui ponto isoelétrico (*pI*) de 3,4 (componente ácido) e massa molecular entre 8 e 9kDa (HENDON, 1976; AIRD *et al.*, 1986, 1990). A Crotoxina B (CB) ou fosfolipase A₂ (Asp49-PLA₂), possui *pI* de 8,6 (componente básico), massa molecular entre 14 e 16kDa (MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2008) e foi descrita por SOARES *et al.* (2001) como um potente anticoagulante. Estas duas subunidades agem de forma sinérgica. A crotoxina B bloqueia a transmissão neuromuscular inibindo a liberação de acetilcolina causando paralisia motora e respiratória (VITAL-BRAZIL & EXCELL, 1971). A crotapotina é enzimaticamente inativa, porém atua como uma chaperona para a CB inibindo a sua atividade enzimática e neurotóxica até que o complexo crotoxina atinja o local de atuação do componente básico (BREITHAUPT, 1976; HABERMANN & BREITHAUPT, 1978). A crotapotina potencializa a toxicidade da fosfolipase A₂ “*in vivo*” mas, inibe sua atividade hemolítica “*in vitro*” (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RÜBSAMEN *et al.*, 1971). Diversas isoformas, tanto da CA como da CB foram isoladas e sequenciadas (FAURE *et al.*, 1994; FAURE & BON, 1988). A análise da sequência de resíduos de aminoácidos de isoformas CB indicou a presença de duas isoformas principais que diferem entre si por oito resíduos de aminoácidos. Estas substituições resultam em modificações de atividades enzimáticas e farmacológicas: uma das isoformas, apresenta baixa atividade enzimática e alto potencial letal, enquanto que a outra é menos tóxica, contudo exerce elevada atividade enzimática (FAURE *et al.*, 1994; FAURE & BON, 1987, 1988).

✓ *Crotamina* (CTM): toxina capaz de induzir a despolarização do potencial da membrana por se ligar aos canais de sódio causando o influxo deste cátion em células musculares (CAMILLO *et al.*, 2001; MARCUSSI *et al.*, 2011; PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, 1981; TOYAMA & CARNEIRO, 2000). MANCIN *et al.* (1998) descreveram uma CTM neurotóxica, de massa molecular de 4,88 kDa, capaz de induzir um efeito analgésico dependente de dose e tempo através de um mecanismo de ação opioide, 30 a 50 vezes mais potente do que a morfina. KERKIS *et al.* (2004) relataram que a Crotamina pode penetrar em células em divisão e se alocar no núcleo.

✓ *Giroxina* (GRX): caracterizada como uma serinoprotease neurotóxica, monomérica e de massa molecular estimada em 34kDa (RAW *et al.*, 1986). A GRX apresenta atividade semelhante à trombina; possui um único domínio tripsina semelhante ao subdomínio serinoprotease da trombina apresentando atividades esterásica (BARRABIN *et al.*, 1978)

amidásica e fibrinogenolítica (ALEXANDER *et al.*, 1988). A maioria das enzimas similares à trombina, como a Giroxina, clivam somente a cadeia A α do fibrinogênio, próximo aos resíduos de aminoácidos Arg¹⁶-Gly¹⁷, localizados na região N-terminal, formando o fibrinopeptídeo A, o que origina uma forma frouxa (ou solúvel) de fibrina (ALEXANDER *et al.*, 1988; KAMIGUTI *et al.*, 1998; YONAMINE *et al.*, 2009, 2014). Além de atuar sobre a coagulação, a GRX apresenta acentuada atividade neurotóxica, diferenciando-a de outras serinoproteases existentes. BARRIO (1961) descreveu que a GTX apresenta capacidade de induzir, em animais de experimentação, alterações de equilíbrio típicas de fenômenos motores causando uma síndrome convulsiva, caracterizada por movimentos rotacionais em volta do eixo central do corpo.

✓ *Convulxina* (CVX): descrita por PRADO-FRANCESCHI e VITAL-BRAZIL (1981) como uma neurotoxina de massa molecular de 68kDa indutora de distúrbios respiratórios e circulatórios e por MURAKAMI *et al.* (2003) como uma glicoproteína heterodimérica da família das lectinas tipo C. Atua como um potente ativador de plaquetas de ação trombótica (ativa plaquetas através de receptores de colágeno de plaquetas p62), porém não interfere nos fatores da cascata de coagulação (POLGAR *et al.*, 1997; MURAKAMI *et al.*, 2003).

Dentre as atividades desencadeadas pelo envenenamento por *C. d. terrificus*, a mais contraditória é a coagulante. A peçonha é composto por proteínas que são precursoras da coagulação, como a Convulxina e Giroxina e por proteínas que atuam sistematicamente como anticoagulantes, como o complexo Crotoxina, a Crotoxina B e a Crotamina. A GRX cliva a cadeia A α do fibrinogênio formando o fibrinopeptídeo A os quais se polimerizam e originam uma rede frouxa de fibrina (CAMILLO *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2011). Esta rede anormal é instável e mais susceptível à ação de agentes fibrinolíticos. A não coagulação sanguínea, parcial ou total, observada em casos graves de pacientes acometidos por acidentes crotálicos pode ser decorrente do consumo do fibrinogênio, o que leva a uma atividade hemorrágica pronunciada (FUNASA, 2001; YONAMINE *et al.*, 2009; BARROS, 2010; BUCHI, 2010).

Contudo, diversos questionamentos se fazem pertinentes. Por que e como a peçonha bruta (e algumas proteínas isoladas como a Giroxina e Convulxina) de *Crotalus durissus terrificus* apresenta atividade coagulante *in vitro* e *in vivo*, pode causar hemorragia? Qual ou quais mecanismos e interações proteicas pode(m) desencadear tal atividade hemorrágica?

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.

1.2. EMBASAMENTO TEÓRICO

A hemostasia refere-se ao mecanismo fisiológico que previne a perda de sangue que ocorre após alguma lesão vascular no organismo e induz a formação de um coágulo, permitindo a cicatrização. A formação de um coágulo localizado na área de lesão vascular ocorre em quatro estágios que se superpõem cronologicamente. Primeiramente, ocorre vasoconstrição localizada que, imediatamente, desencadeia hemostasia primária ativando as plaquetas, as quais aderem à matriz subendotelial exposta formando um tampão hemostático primário (CAGNOLATI *et al.*, 2007; ARMSTRONG & GOLAN, 2016)

1.2.1 Hemostasia Secundária

A hemostasia secundária, também denominada cascata da coagulação, é uma série de modificações de um conjunto de proteínas do plasma que tem por objetivo formar um coágulo de fibrina estável no local da lesão vascular. Essas proteínas, denominadas Fatores de Coagulação (TABELA 01), 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).

Fatores de Coagulação	Denominação	Função(ões)
Fator I	Fibrinogênio	Formação do coágulo (fibrina)
Fator II	Protrombina	Em sua forma ativada (IIa) ativa os fatores I, V, VIII, XIII, proteína C e plaquetas
Fator III	Tromboplastina / fator tecidual	Ativa o fator VII; a presença de Ca^{2+} é necessária para que ocorra esta ativação
Fator IV	Cálcio	Necessário para que os fatores se liguem aos fosfolipídios
Fator V	Ativador protrombina, ou Pró-acelerina ou fator lábil	Cofator do fator X com o qual forma o complexo protrombinase
Fator VII	Pró-convertina ou fator estável	Quando ativado, ativa os fatores IX e X
Fator VIII	Fator anti-hemofílico	Cofator do fator IX com o qual forma o complexo tenase
Fator IX	Fator de Christmas	Ativa o fator X e forma o complexo tenase com o fator VIII
Fator X	Fator de Stuart-Prower	Ativa o fator II e forma o complexo protrombinase com o fator V
Fator XI	Antecedente tromboplastínico do plasma	Ativa os fatores XII, IX e pré-caliceína
Fator XII	Fator de Hageman	Ativa a pré-caliceína e o fator XI
Fator XIII	Estabilizador de fibrina	Estabiliza a fibrina ligando-se de forma cruzada

TABELA 01 - Fatores de coagulação, suas respectivas denominações e funções. Adaptada de ARMSTRONG & GOLAN (2016).

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 necessário uma enzima, um substrato e um cofator ou acelerador da reação (LOPES *et al.*, 2005; CAGNOLATI *et al.*, 2007; LEIRIA *et al.*, 2007).

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 (BARROS *et al.*, 2015). 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 (FIGURA 03) (ARMSTRONG & GOLAN, 2016; SILVA, 2012; USTINOV *et al.*, 2016).

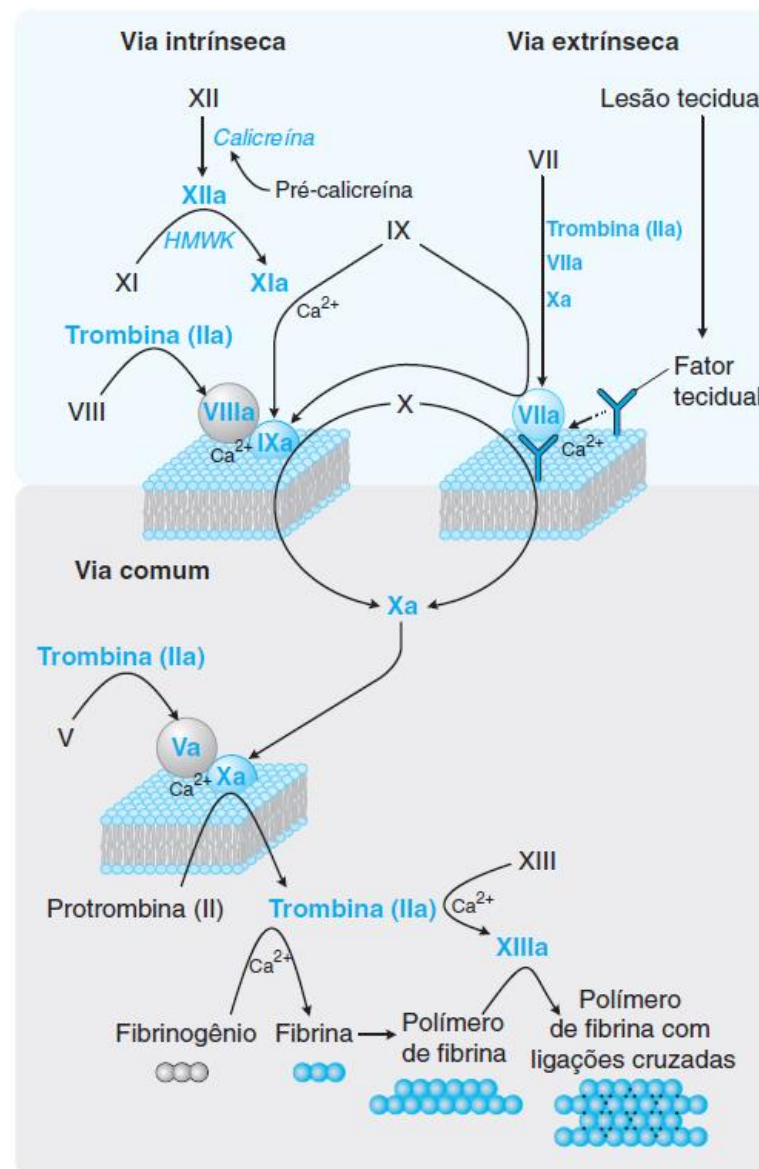


FIGURA 03 - Hemostasia Secundária. Indicação das vias Intrínseca, Extrínseca e Comum da cascata de coagulação, bem como os Fatores que atuam em cada via (Fonte: (ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

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 (FIGURA 03) (BARROS *et al.*, 2015; HOSPITAL ALBERT EINSTEIN, 2012; ARMSTRONG & GOLAN, 2016; LIU *et al.*, 2016; SILVA, 2012).

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 (FIGURA 03) (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).

Após a formação do coágulo e o controle da hemorragia, o excesso de fibrina local é removido por fibrinólise pela atuação de duas proteínas: o plasminogênio e a plasmina (GANDO *et al.*, 2016; ICHIKAWA *et al.*, 2016).

A plasmina é uma serino protease que degrada a rede de fibrina. Essa proteína está presente no organismo sob a forma de um precursor inativo, o plasminogênio. Por ação de ativadores endógenos ou exógenos, a estrutura molecular do plasminogênio é alterada e, este é convertido à plasmina. A ação proteolítica da plasmina é maior no substrato da fibrina do que do fibrinogênio gerando polipeptídeos e peptídeos denominados de produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina (PDFF). Um desses PDFF é a antiplasmina-alfa 2, um

anticoagulante que bloqueia a ação da trombina e impede a fibrinólise generalizada (ARMSTRONG & GOLAN, 2016; KOAMI *et al.*, 2016; LIBOUREL *et al.*, 2016).

1.2.2 Parâmetros Qualitativos da Hemostasia

O teste de coagulação para medir o Tempo de Protrombina (TP) 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).

O uso de anticoagulantes orais (inibidores diretos ou indiretos de trombina ou do Fator Xa) causa o aumento do TP devido à redução dos níveis do Fator VII que, por conseguinte, reduz a quantidade dos Fatores X e II. A redução dos níveis dos Fatores VII, X e II é observada, respectivamente, após 6, 40 e 60 horas do início da anticoagulação (REIS *et al.*, 2005).

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 trombozes (DIAS *et al.*, 2007; LEIRIA *et al.*, 2007; MCCLEARY & KINI, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Na presença da heparina, um anticoagulante com ação depende de antitrombina III, o TTPA aumenta proporcionalmente à dose utilizada (SERRALVO *et al.*, 2015).

1.2.3 Principais Doenças da Hemostasia Secundária

As coagulopatias ou doenças da coagulação podem ser genético-hereditárias ou adquiridas e, ao serem diagnosticadas, podem ser devidamente tratadas (CHANG *et al.*, 2016; DABIRI *et al.*, 2016). Testes de coagulação como o TP e TTPA podem ser aplicados para identificar quais fatores de coagulação estão comprometidos e, assim, caracterizar a patologia.

Doenças da rota extrínseca da coagulação

A verificação do TP prolongado e do TTPA normal é indício de uma deficiência do Fator VII. Essa deficiência pode ter origem genético-hereditária ou ser adquirida pelo uso de cumáricos, doenças hepáticas, deficiência de vitamina K ou inibidor adquirido do Fator VII (DELABRANCHE *et al.*, 2016; LEHMBERG *et al.*, 2016; RIZZATTI & FRANCO, 2001).

Doenças da rota intrínseca da coagulação

As doenças da rota intrínseca da coagulação são caracterizadas por um TTPA prolongado e um TP normal. As doenças genético-hereditárias incluem: Hemofilias A, B e C (deficiência dos Fatores VIII, IX e XI, respectivamente); Angioedema Hereditário tipo III e Moléstia de Hageman (deficiência do Fator XII); deficiência do Fator XIII (coágulos formados são instáveis e mais susceptíveis à degradação pela plasmina), deficiência do Fator Fletcher (ausência de pré-calicreína), Doença de von Willebrand (diminuição ou disfunção do Fator de von Willebrand devido à diminuição dos níveis séricos do Fator VIII) e deficiência do Cininogênio de Alto Massa Molecular (CHANG *et al.*, 2016). Já, os distúrbios adquiridos podem ser decorrentes de anticoagulantes como a heparina e o lúpico ou inibidores dos Fatores VIII, IX e XI (BUCARETCHI *et al.*, 2013; RIZZATTI & FRANCO, 2001; LEHMBERG *et al.*, 2016).

Doenças da rota comum da coagulação

Os TTPA e o TP prolongados podem ser indícios de deficiências adquiridas ou genético-hereditárias de um dos Fatores I, II, V ou X (GANDO *et al.*, 2016). A ocorrência de deficiências genético-hereditárias dos Fatores I, II, V e X são extremamente raras: deficiência do Fator I - causa hemorragias de intensidade leve à grave e podem ser de dois tipos:

hipofibrinogenemia ou afibrinogenemia; deficiência do Fator II - apresenta quadro clínico heterogêneo, com sangramentos de leve à moderada intensidade; deficiência do Fator V Leiden - interfere na atuação da proteína C, na sua forma ativada, e causa uma predisposição à hipercoagulabilidade e à trombose; deficiência do Fator X - altera a produção de trombina a qual converte o fibrinogênio em fibrina e, também, ativa o fator estabilizador da fibrina (Fator XIII) para formar o coágulo de fibrina hemostático. Doenças adquiridas como a deficiência de vitamina K, doenças hepáticas, anticoagulante lúpico ou heparina, inibidores dos Fatores II, V ou X e Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD) também podem causar um prolongamento do TP e do TTPA (LIBOUREL *et al.*, 2016; RIZZATTI & FRANCO, 2001; SANO-MARTINS & DAIMON, 1992).

A CIVD ou coagulopatia de consumo é uma síndrome secundária adquirida caracterizada pela ativação desordenada da coagulação que pode ser causada por distúrbios hemodinâmicos. Para desencadear a CIVD é necessário que o Fator III (Fator tissular) e o Fator VIIa formem o complexo III/VIIa, o qual vai desencadear a via extrínseca e comum da coagulação e ativar a protrombina, a qual será convertida em trombina. A presença de trombina, além de quebrar o fibrinogênio em fibrina, aumenta os níveis do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI) e ativa diretamente os Fatores V e VIII. A não ativação do plasminogênio não permite a fibrinólise gerando um acúmulo de fibrina. Ainda, para formar fibrina, é necessário o consumo de quase todos os fatores de coagulação; o acúmulo de fibrina desregula a hemostasia que, conseqüentemente, causará inibição ou disfunção dos anticoagulantes naturais como antitrombina III, proteína C, proteína S e inibidor da via do fator tissular resultando em manifestações hemorrágicas. Contudo, o acúmulo de fibrina depositado na microvasculatura forma trombos que podem causar o tromboembolismo venoso (PINTÃO & GARCIA, 2003; LOPES *et al.*, 2005; GANDO *et al.*, 2016; LIBOUREL *et al.*, 2016).

1.2.4 Mecanismo de Ação de Alguns Anticoagulantes Comerciais

Inibidor da Trombina e do Fatores IXa, Xa, XIa e XIIa

Heparina não fracionada: mucopolissacarídeo de carga negativa; seu mecanismo de ação é dependente de antitrombina III. A antitrombina III inativa a trombina e inibe os Fatores IXa, Xa XIa e XIIa (LANGELOH *et al.*, 2012; ICHIKAWA *et al.*, 2016).

A heparina não fracionada atua de duas formas: 1. Como superfície catalítica da antitrombina III, permitindo a interação da antitrombina III tanto com a trombina como os Fatores ativados IX, X, XI e XII e 2. Induzindo mudança conformacional no sítio catalítico da antitrombina III, tornando-o mais específico para interagir com a trombina e os Fatores IXa, XIa e XIIa (FIGURA 04) (ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

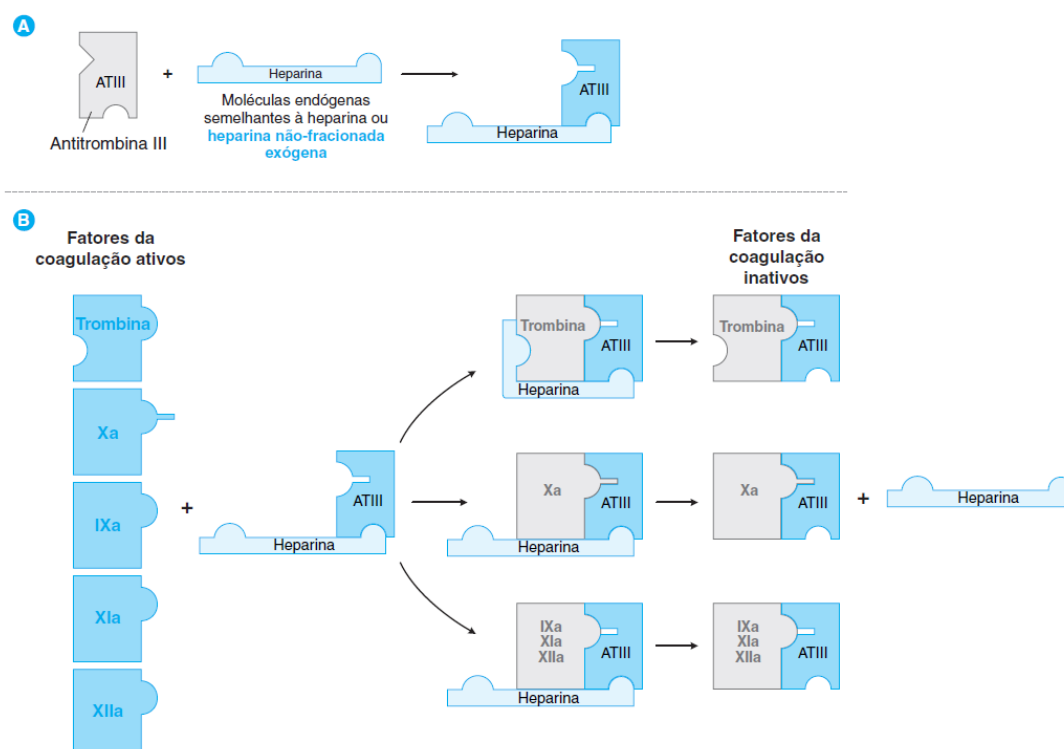


FIGURA 04 – Mecanismo de ação da heparina. (A) Complexo Antitrombina III (ATIII) e Heparina; (B) A ligação da heparina à ATIII induz alteração conformacional da ATIII e permite sua interação com a Trombina ou com um dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa. (Fonte: ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

Quando a concentração de heparina no plasma é de 0,1 a 1,0 unidade/mL, a trombina e os Fatores IXa e Xa são rapidamente inibidos pela antitrombina III resultando no prolongamento do TTPA, porém o TP é muito pouco alterado (LANGELOH *et al.*, 2012; ARMSTRONG & GOLAN, 2016; SERRALVO; ZAMBOTI; FAVERO, 2015; ICHIKAWA *et al.*, 2016).

Inibidores do Fator Xa

1. *Heparina de baixo massamolecular*: atua como superfície catalítica da antitrombina III mas, não promove a interação desta com a trombina, no entanto induz mudança conformacional na antitrombina III para permitir sua interação com a trombina ou com os Fatores IXa, XIa e XIIa (ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

2. *Fondaparinux*: pentassacarídeo sintético análogo à heparina de baixo massamolecular que inibe, seletivamente, a ação do Fator Xa. O fondaparinux induz mudança conformacional na antitrombina III para que esta interaja com o Fator Xa (FIGURA 05) (LANGELOH *et al.*, 2012; ARMSTRONG & GOLAN, 2016; ICHIKAWA *et al.*, 2016).

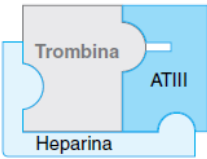
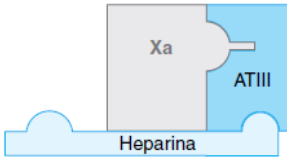
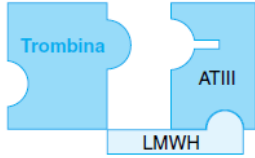
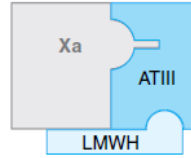
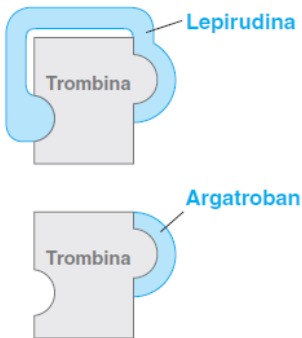
Classe de Anticoagulante	Efeito sobre a Trombina	Efeito sobre o Fator Xa
Heparina não-fracionada (cerca de 45 unidades de sacarídeo, PM ~13.500)	 Liga-se à antitrombina III (ATIII) e trombina (inativa a trombina)	 Liga-se à antitrombina III (ATIII) através de pentassacarídeo (suficiente para inativar o fator Xa)
Heparinas de baixo peso molecular (LMWH) (cerca de 15 unidades de sacarídeo, PM ~ 4.500)	 Liga-se à antitrombina III (ATIII) mas não à trombina (inativa precariamente a trombina)	 Liga-se à antitrombina III (ATIII) através de pentassacarídeo (suficiente para inativar o fator Xa)
Inibidores seletivos do fator Xa	Nenhum efeito sobre a trombina	 Fondaparinux Liga-se à antitrombina III (ATIII) através de pentassacarídeo (suficiente para inativar o fator Xa)
Inibidores diretos da trombina	 Lepirudina Argatroban Inativa seletivamente a trombina	Nenhum efeito sobre o fator Xa

FIGURA 05 - Atividade fármaco-receptor de diferentes classes de anticoagulantes e seus mecanismos de ação sobre a trombina e/ou Fator Xa (Fonte: ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

Inibidores Diretos da Trombina

1. *Lepirudina*: polipeptídio recombinante derivado da hirudina, uma proteína isolada da sanguessuga medicinal. Esse fármaco interage, com alta afinidade, a dois sítios na molécula de trombina: o sítio catalítico e o “exossítio” (sítio de orientação à substratos proteicos; quando esta região não está disponível, impede a ativação dos Fatores I e XIII) (ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

2. *Bivalirudina e Argatroban*: fármacos inibidores específicos da trombina devido à interação com o sítio catalítico da molécula (FIGURA 05) (ARMSTRONG & GOLAN, 2016; TUMMALA *et al.*, 2016).

A sintomatologia causada pelo empecoamento por *Crotalus durissus terrificus* coincide com alguns sintomas observados no desencadeamento de coagulopatias adquiridas. Há diversos relatos na literatura de Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD) causada por ofidismo (HAN *et al.*, 1996; KIN *et al.*, 2008; MADWAGE, 2014; LEE, 1996).

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever, *in vitro*, a atuação da peçonha bruta, de frações proteicas e proteínas purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre os fatores de coagulação das vias extrínseca, intrínseca e comum da cascata de coagulação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar e descrever o perfil proteico da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*.
- Avaliar o efeito coagulante da peçonha bruta, de frações proteicas e de proteínas purificadas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*, *in vitro*, sobre o plasma citratado humano.
- Determinar o Tempo de Protrombina (TP), na formação de coágulo do plasma citratado humano, na presença de frações proteicas e de proteínas purificadas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*.
- Determinar o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), na formação de coágulo do plasma citratado humano, na presença de frações proteicas ou de proteínas purificadas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*.
- Correlacionar o grau de anticoagulação do plasma citratado humano na presença de proteínas ou frações proteicas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* com as atividades farmacológicas desencadeadas por anticoagulantes comerciais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PLASMA HUMANO CITRATADO E KITS DE COAGULAÇÃO

O sangue de voluntários sadios foi colhido em tubos de ensaio à vácuo 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).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000rpm por 15 minutos; o plasma foi separado em tubos do tipo falcon de 15mL e imediatamente utilizados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – CEP/CCS/UFPB sob o número CAAE: 60251516.0.0000.5188 (ANEXO 01), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e da Resolução 466/12 - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Os kits de coagulação PT HEMOSTASIS Ref. 501 (lote #5005) e APTT HEMOSTASIS Ref. 602, comercializados pela Labtest Diagnóstica S.A., utilizados para avaliar, respectivamente, o Tempo de Protrombina e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada foram adquiridos comercialmente.

3.2. 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, conforme “Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB” (ANEXO 02) e “Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicos” (ANEXO 03).

As proteínas Giroxina, Convulxina, Crotamina, Crotoxina, Crotoxina A e Crotoxina B foram purificadas da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*, caracterizadas bioquimicamente e cedidas pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rondônia, RO.

A Giroxina (GRX) foi purificada utilizando-se dois passos cromatográficos: gel filtração em coluna Sephadex G-75 e afinidade em coluna Benamidina-Sepharose 6B, de

acordo com SEKI *et al.* (1980). A Convulxina (CVX), a Crotamina (CTM) e a Crotoxina (CTX) foram isoladas em coluna Sephadex G-75 por cromatografia de gel filtração conforme descrito por TOYAMA *et al.* (2000). A Crotoxina A (CA) ou Crotapotina foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa utilizando coluna C18, de acordo com DE OLIVEIRA *et al.* (2003). A Crotoxina B (CB) ou Fosfolipase A₂ básica foi isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sefarose conforme descrito por SOARES *et al.* (1998).

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

3.3. FRAÇÕES DA PEÇONHA DE *Crotalus durissus terrificus*

3.3.1. Cromatografia Líquida de Fase Reversa

O perfil cromatográfico da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido por Cromatografia Líquida de Fase Reversa utilizando cromatógrafo UFLC (Ultra Flow Liquid Chromatography – LC-6AD, Shimadzu Corporation) e coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (M) - comprimento da coluna: 25cm x 4,6mm, diâmetro do poro: 100Å, diâmetro da partícula: 5µm) utilizando a metodologia proposta por CALVETE e colaboradores (2007).

Para obter as frações proteicas foram utilizados 6,35mg da peçonha bruta de *C. d. terrificus* solubilizado em 500µL de 0,05% de Ácido Trifluoroacético (TFA) / 5% Acetonitrila (ACN) centrifugado a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. A coluna foi previamente equilibrada com o Tampão A (0,1% de TFA em água destilada e deionizada) e a eluição foi realizada com gradiente de 0% a 100% Tampão B (66,5% de ACN em 0,1% de TFA). O gradiente linear empregado para eluição das frações foi de 0% de Tampão B por cinco minutos seguidos por 0 a 30% de Tampão B durante 10 minutos; 30 a 70% de Tampão B durante 60 minutos; 70 a 100% Tampão B por 10 minutos e 100% de Tampão B por 5 minutos. O fluxo de eluição empregado foi de 1,0mL/min. Os picos proteicos foram monitorados através da determinação da absorbância a 280nm e as frações obtidas foram coletadas automaticamente sob temperatura constante de 4°C, acima de 25mAU.

A concentração teórica das frações proteicas foi aferida em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) com absorbância (ABS) de 280nm, considerando 1 ABS = 1,0mg/mL. A quantidade proteica, em miligramas, contida em cada fração foi estimada através da multiplicação da concentração medida pelo espectrofotômetro e a quantidade de cada fração proteica coletada, em mililitros.

3.3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas com gel de separação a 13% de Bis-Acrilamida em um sistema desnaturante e reduzido conforme adaptações da técnica descrita por LAEMMLI (1970).

Para preparar um gel de separação a 13% de Bis-Acrilamida foram utilizadas as soluções: 2,165mL de Bis-Acrilamida a 30%; 0,5mL de Tris-HCl pH 8,8 a 1,5M; 50µL de SDS a 10%; 2,3mL de Água deionizada; 5µL de N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED) e 33,5µL de Persulfato de Amônio (PA) a 10%. O gel de empilhamento, a 4% de Bis-Acrilamida, foi preparado com 332,5 µL de Bis-Acrilamida a 30%; 250µL de Tris-HCl pH 6,8 a 0,5M, 25µL de SDS a 10%; 2,3mL de Água deionizada, 2,5µL de TEMED e 17µL de PA a 10%.

As amostras aplicadas na SDS-PAGE continham 10µL da fração obtida dissolvida em 5µL de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 a 0,05M; SDS a 10%; Azul de Bromofenol; Glicerol e β-mercaptoetanol). Após preparadas, as amostras foram aquecidas por cinco minutos a 100°C, rapidamente centrifugadas e aplicadas no gel.

As amostras foram separadas sob corrente constante de 25mA, em temperatura ambiente, utilizando Tampão de Corrida Tris-Glicina. O padrão de massa molecular utilizado foi o PageRuler Plus comercializado pela Thermo Scientific contendo 9 padrões de massa molecular entre 250 e 10kDa (250, 130, 100, 55, 35 e 15kDa em azul, 70 e 35 kDa em vermelho e 10kDa em verde). O gel foi corado com Azul de Coomassie Brilhante G-250, durante 2 horas, sob agitação a 40°C e descorado com água deionizada: etanol: ácido acético (6:3:1).

As análises do perfil cromatográfico da peçonha bruta e da SDS-PAGE das frações proteicas foram realizadas em colaboração com o Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador do Departamento de Física e Biofísica, Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, Instituto de Biociências (IBB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

3.4. ATIVIDADE COAGULANTE

3.4.1. Peçonha Bruta de *Crotalus durissus terrificus*

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

Para a realização dos experimentos de coagulação, 100 µL de plasma humano citratado foi distribuído em cada tubo de ensaio e mantido em banho-maria à 37°C. Quatro diferentes quantidades da peçonha bruta de *C. d. terrificus* (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg, solubilizados em PBS - 10x, pH 7,4) foram adicionadas, separadamente, em cada tubo de ensaio contendo o plasma e o tempo (em segundos) para a formação do coágulo foi anotado. Todos os experimentos para avaliação do tempo de coagulação foram realizados em triplicata.

3.4.2. Tempo de Protrombina (TP)

Para determinar o tempo de coagulação do plasma humano citratado após a adição de tromboplastina e cálcio em temperatura constante de 37°C foi utilizado o teste de coagulação PT HEMOSTASIS, Ref. 501 (lote #5005), seguindo a metodologia descrita nas “instruções de uso” (ANEXO 04).

Para avaliar o tempo de protrombina (TP) do plasma referência (controle) foi colocado, em tubo de ensaio de vidro, 100µL de plasma humano citratado + 8,0µL de Tampão Fosfato Salina (10x, pH 7,4) incubados em banho-maria, por 120 minutos, a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se 200µL do Reagente 1 (tromboplastina extraída do cérebro de coelho $\geq 2\%$ em tampão tricina 74,8 mmol/L, cloreto de cálcio 22,2 mmol/L, azida sódica 2,15mmol/L e estabilizantes) e o cronômetro foi disparado; o conteúdo do tubo foi homogeneizado e, após nove (9) segundos, o tubo foi removido do banho-maria para observação, em intervalos menores que 1 segundo, da formação do coágulo. O cronometro foi imediatamente parado e o tempo decorrido para a formação do coágulo foi registrado.

O TP do plasma citratado humano na presença das frações proteicas ou proteínas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* foi aferido conforme o descrito para o controle, substituindo-se o PBS pelas amostras (frações proteicas e proteínas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* que não coagularam o plasma citratado humano) em diferentes quantidades (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg).

Todos os experimentos para avaliar o tempo de coagulação do plasma humano citratado após a adição de tromboplastina e cálcio, em temperatura constante de 37°C (na presença ou ausência das amostras em análise), foram realizados em triplicata.

O grau de anticoagulação, foi avaliado pelo valor de Relação dos tempos de Protrombina (R), onde esse cálculo é a razão entre o resultado de um TP de referência (Controle) e o TP da amostra avaliada (Equação #1).

$$R = \frac{\text{Tempo em segundos do plasma da amostra}}{\text{Tempo em segundos do plasma de referência}} \quad \text{Equação \#1}$$

A Organização Mundial de Saúde, OMS, recomenda que o resultado obtido no TP, independentemente de sua finalidade, seja expresso em Relação Normalizada Internacional (RNI). O valor de RNI relativo a cada valor de R e a Atividade de Protrombina (A%) foram consultados na “*Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%)*” que acompanhou o teste de coagulação PT HEMOSTASIS Labtest Ref. 501 (lote #5005) (ANEXO 05). Ainda, a OMS preconiza que o valor de RNI em pessoas sadias deva ser entre 1,0 e 1,08.

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

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

3.4.3. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

A determinação do tempo de coagulação do plasma humano citratado após a adição de cálcio, na presença de uma cefalina (ácido elárgico), em temperatura constante de 37°C, foi realizada pelo teste de coagulação APTT HEMOSTASIS, Ref. 502, seguindo a metodologia descrita nas “instruções de uso” (ANEXO 06).

Para avaliar o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) tanto do plasma referência (controle) como das proteínas isoladas (Crotamina, Crotoxina, Crotoxina A e Crotoxina B) em diferentes quantidades (0,5µg; 1,0µg, 2,0µg e 4,0µg) foi colocado, em tubo de ensaio de vidro, 100µL de plasma humano citratado + 8,0µL de PBS (10x, pH 7,4) ou proteínas isoladas e incubados em banho-maria (37°C), por 120 minutos. Transcorrido o tempo

de incubação, adicionou-se 100µL do Reagente 1 ($\geq 99\mu\text{mol/L}$ de ácido elárgico, $\geq 0,007\%$ de fosfolípido de cérebro de coelho; 320 mmol/L de fenol, 0,005% de albumina bovina e estabilizantes), homogeneizou e incubou em banho-maria à 37°C, por 4 minutos; acrescentou-se 100µL do Reagente 2 (20 mMol/L de cloreto de cálcio e $\leq 0,095\%$ de azida sódica) e o cronômetro foi imediatamente disparado; o conteúdo do tubo foi homogeneizado e mantido no banho-maria a 37°C por mais 20 segundos; decorrido o tempo, o tubo foi removido do banho-maria para observar (em intervalos menores que 1 segundo) a formação do coágulo. O cronometro foi imediatamente parado e o tempo decorrido para a formação do coágulo foi registrado.

Todos os experimentos para avaliar o tempo de coagulação do plasma humano citratado após a adição de cálcio e o ácido elárgico (cefalina ou fator de contato), em temperatura constante de 37°C (na presença ou ausência das amostras em análise), foram realizados em triplicata.

3.4.4. Análise Estatística dos Dados

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente empregando-se o teste One-way ANOVA e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (ns: valor de $p < 0,05$; ★: valor de $p < 0,01$; ★★: valor de $p < 0,001$; ★★★: valor de $p < 0,0001$ e ★★★★★: valor de $p < 0,00001$). Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DAS FRACÇÕES PROTEICAS DA PEÇONHA DE *Crotalus durissus terrificus*

A peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* foi fracionado, por cromatografia líquida de fase reversa, em oito picos, denominados *Fr0* a *Fr7*. A *Fr0* foi coletada, automaticamente, antes dos cinco minutos iniciais, quando ainda não havia iniciado o gradiente linear (0% de Tampão B). (FIGURA 06).

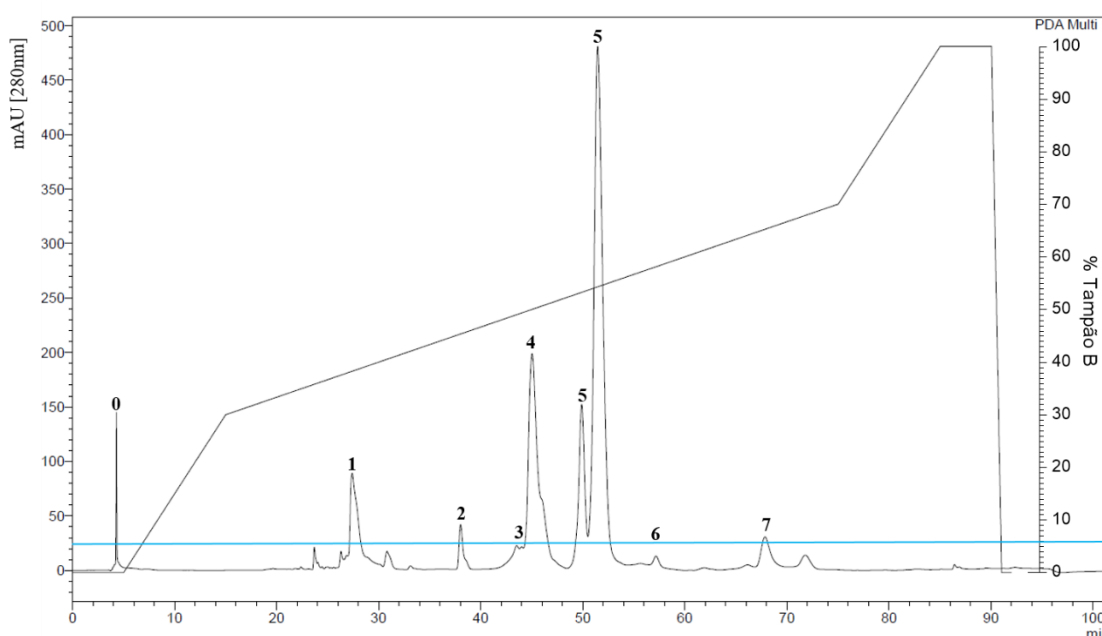


FIGURA 06 - Cromatograma da cromatografia líquida de fase reversa da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* obtidas por Cromatografia Líquida de Fase Reversa, utilizando uma coluna C-18. As frações foram coletadas, automaticamente, acima de 25mAU (linha azul) sob temperatura constante de 4° C (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A *Fr1* foi separada com 38% de Tampão B e, embora sejam observados muitos picos entre 25 e 30 minutos decorridos de experimentação, somente o pico principal, acima de 25mAU, foi coletado. As *Fr2*, *Fr3* e *Fr6* foram obtidas, em pouquíssimas quantidades, com 45%, 50% e 58% de Tampão B, respectivamente. A *Fr4* apresentou, ao menos, 2 picos superpostos recolhidos após 52% de Tampão B. A coleta da *Fr5* foi iniciada com 49 minutos e finalizada com 53 minutos decorridos, contendo, visivelmente, pelo menos 2 picos distintos. A *Fr7* foi eluída com 66% de tampão B.

A concentração teórica das frações proteicas obtidas foi avaliada por espectrofotometria com absorbância de 280nm. A quantidade proteica de cada fração (em

miligramas) foi calculada pela multiplicação da concentração aferida pelo espectrofotômetro e a quantidade em mililitros coletada (TABELA 02). A fração 0 (*Fr0*) não apresentou absorbância a 280nm e foi descartada.

Frações Proteicas	Quantidade (mg)
<i>Fr1</i>	0,58
<i>Fr2</i>	0,10
<i>Fr3</i>	0,05
<i>Fr4</i>	1,60
<i>Fr5</i>	6,80
<i>Fr6</i>	0,01
<i>Fr7</i>	1,02

TABELA 02 - Quantidade proteica (estimada por absorbância a 280nm) contida em cada fração, obtida pela cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A massa molecular (MM) da(s) proteína(s) contida(s) em cada fração foi(ram) estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições redutoras, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 13% (FIGURA 07).

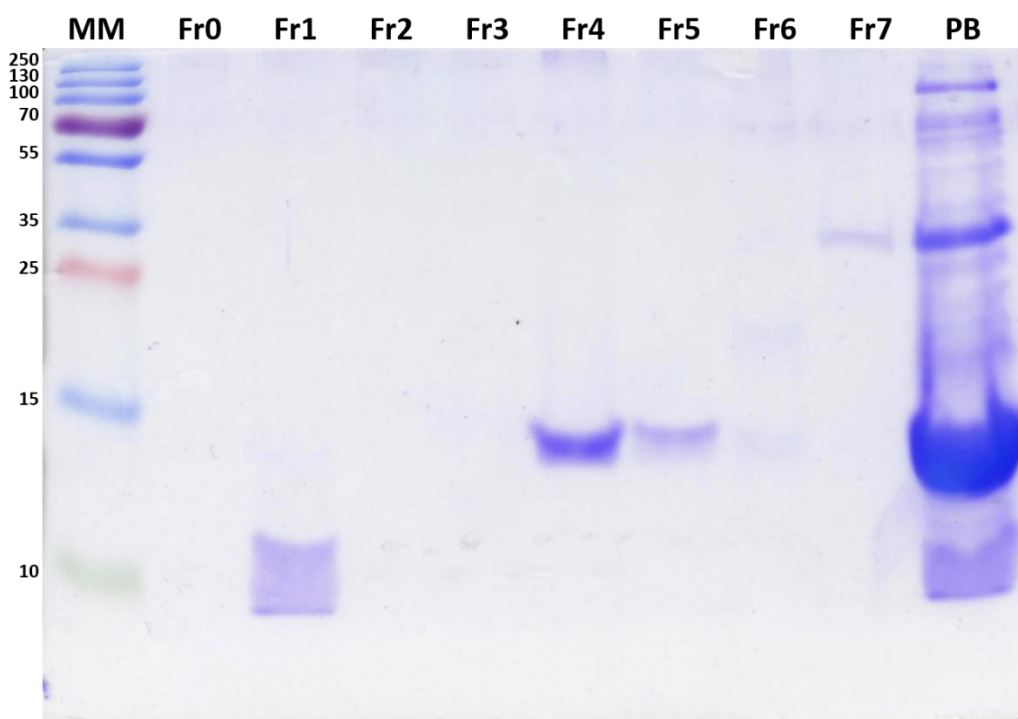


FIGURA 07 - Perfil eletroforético das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*. MM: padrão de massa molecular - PageRuler Plus®; *Fr0* – *Fr7*: frações proteicas; PB: peçonha bruta (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A análise da SDS-PAGE permitiu inferir que a *Fr1* é continha duas proteínas: uma delas com massa molecular de 9kDa e outra com massa molecular de, aproximadamente, 14kDa. Não é possível afirmar, através da coloração do gel por Azul de Coomassie Brilhante G-250, a presença de proteínas na *Fr2*. Embora a *Fr3* seja formada por uma pequena quantidade proteica, quando aplicada no gel, possibilitou observar a presença de uma proteína de massa molecular de 15kDa. A análise do perfil cromatográfico das *Fr4* e *Fr5* sugeriram a presença de, pelo menos, duas proteínas em cada fração; no entanto, duas únicas bandas proteicas, de massa molecular aproximada de 14kDa (*Fr5*) e 14,5kDa (*Fr4*), foram visíveis na SDS-PAGE. O pico cromatográfico referente à *Fr6*, embora tenha se apresentado como um único, quando analisado pela SDS-PAGE corada com Azul de Coomassie Brilhante g-250, indicou a presença de quatro bandas proteicas com massas moleculares estimadas em 14kDa, 23kDa, 33kDa e 67kDa. A análise do perfil cromatográfico e do perfil eletroforético da *Fr7* possibilitaram inferir que esta é formada por um único pico referente a uma proteína de massa molecular próxima de 34kDa.

Uma análise comparativa entre os valores de massa molecular estimados pela SDS-PAGE e os descritos na literatura, nos possibilita dizer que a banda proteica referente à massa molecular de 9kDa da *Fr1* representa a Crotopotina ou Crotoxina A, descrita por HENDON e FRAENKEL-CONRAT (1971), AIRD *et al.* (1986), AIRD *et al.* (1990) como uma proteína de caráter ácido e massa molecular entre 8kDa e 9kDa. As bandas proteicas de 14,5kDa (*Fr5*) e 14kDa (*Fr4*) condizem com isoformas da Crotoxina B, uma Fosfolipase A₂ básica com massa molecular de, aproximadamente, 14,2kDa (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; T.-W. JENG, R. A. HENDON, 1978; AIRD *et al.*, 1986; MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2008). A Crotoxina, um complexo neurotóxico de ação pré-sináptica e com massa molecular de 23kDa pôde ser relacionada com a banda proteica de 23kDa encontrada na *Fr6*; ainda, na referida *Fr6*, observou-se outra banda proteica de 67kDa, a qual pôde ser associada à Convulxina, uma neurotoxina heterodimérica de 68kDa indutora de distúrbios respiratórios e circulatórios e ativadora de plaquetas de ação trombótica (PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, 1981; POLGAR *et al.*, 1997; MURAKAMI *et al.*, 2003). A *Fr7* está representada no SDS-PAGE por uma banda proteica de, aproximadamente, 34kDa que, quando comparada com dados descritos na literatura, pôde ser relacionada a uma serinoprotease neurotóxica, monomérica de massa molecular estimada em 34kDa denominada Giroxina (RAW *et al.* 1986).

Após a realização da SDS-PAGE, as frações proteicas foram liofilizadas e armazenadas à 4°C. A liofilização ou criodessecação é um processo de desidratação em que as amostras são rapidamente congeladas, em nitrogênio líquido, e submetidas à sublimação sob vácuo, preservando as características físico-químicas das proteínas.

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE

4.2.1. Peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*

A atividade coagulante da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* foi avaliada em plasma humano citratado. A peçonha bruta de *C. d. terrificus* apresentou atividade coagulante de rápida atuação *in vitro*. Observou-se a diminuição do tempo, em segundos, de formação do coágulo do plasma humano citratado (49, 35, 22 e 11s) devido à presença de quantidades crescentes da peçonha bruta (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 μ g) (FIGURA 08).

Os resultados dos tempos de coagulação do plasma humano citratado na presença das diferentes quantidades da peçonha bruta de *C. d. terrificus* foram comparados aos obtidos pelos testes comerciais de coagulação PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS. Os tempos de formação do coágulo pela adição da peçonha bruta nas quantidades de 0,5 e 1,0 μ g foram semelhantes aos valores padrão para o TTPA e TP, não apresentando, estatisticamente, diferença significativa. Já, nas quantidades de 2,0 e 4,0 μ g de peçonha bruta avaliadas, o tempo de obtenção do coágulo foi significativamente menor em relação ao tempo avaliado pelos testes padrões.

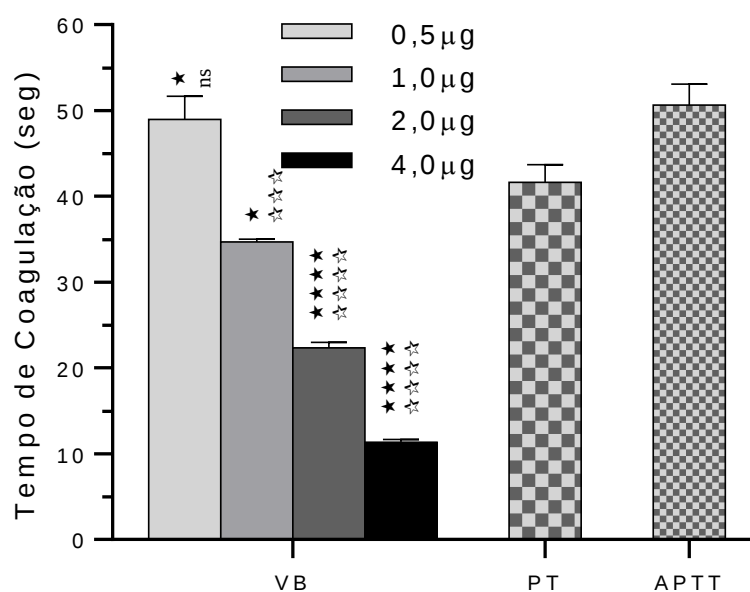


FIGURA 08 - Avaliação da atividade coagulante da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* em plasma citratado humano. VB: peçonha bruta; PT: tempo de protrombina avaliado pelo kit comercial PT HEMOSTASIS; APTT: tempo de tromboplastina parcial ativada avaliado pelo kit comercial APTT HEMOSTASIS. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ($n=3$) - ns: valor de $p < 0,05$; * ou *: valor de $p < 0,01$; ** ou **: valor de $p < 0,001$; *** ou ***: valor de $p < 0,0001$ e **** ou ****: valor de $p < 0,0001$ (*PT e *APTT).

A visualização dos coágulos formados pela presença de todas as quantidades da peçonha bruta de *C. d. terrificus* avaliadas pôde ser descrita como um coágulo de massa hialina, textura flexível e pontual (FIGURA 09).

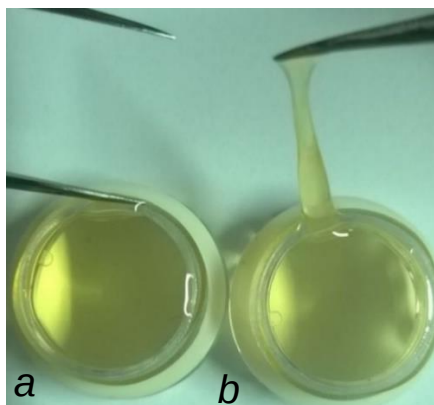


FIGURA 09 - Avaliação visual do coágulo formado pela presença da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*. a. 300µL de plasma citratado humano; b. 300µL plasma citratado humano + 4,0µg de peçonha bruta de *C. d. terrificus* (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

O aspecto físico do coágulo formado na presença da peçonha bruta de *C. d. terrificus* (FIGURA 10b) foi comparado com o coágulo formado na presença do Reagente 1 (tromboplastina extraída do cérebro de coelho $\geq 2\%$ em tampão tricina 74,8 mmol/L, cloreto de cálcio 22,2 mmol/L, azida sódica 2,15mmol/L e estabilizantes) do teste de coagulação PT HEMOSTASIS (FIGURA 10c). A aparência física do coágulo obtido pelo reagente 1 pôde ser descrita como um coágulo turvo, rígido e estável; características visualmente distintas das observadas na presença da peçonha bruta de *C. d. terrificus*. Ainda, foi observado que o plasma humano citratado na presença da peçonha bruta de *C. d. terrificus* não coagula como um todo e, sim, apresenta coagulação pontual, formando pequenos trombos que se aderem facilmente às paredes do recipiente (*in vitro*) ou no interior dos vasos sanguíneos (*in vivo*), o que pode causar bloqueio de fluxo sanguíneo (FIGURA 10d).



FIGURA 10 - Aspecto físico comparativo entre o (a) P: plasma citratado humano e os coágulos formados pela presença de (b) VB: 4,0 µg de peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e de (c) TP: Reagente 1 do teste de coagulação PT HEMOSTASIS; (d) plasma não coagulado por completo e coágulo aderido ao recipiente (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

O fato do coágulo formado na presença da peçonha bruta de *C. d. terrificus* apresentar-se mais hialino pode ser explicado pela presença da Giroxina em sua composição. Como já descrito por vários pesquisadores, a GRX promove a quebra incomum do fibrinogênio em fibrinopeptídeo A originando uma forma solúvel de fibrina (ALEXANDER *et al.*, 1988; YONAMINE *et al.*, 2009; YONAMINE *et al.*, 2014). Já, a não coagulação do plasma humano citratado por completo pode estar relacionado com a composição da peçonha: presença de proteínas anticoagulantes como a Crotoxina e a Crotamina (FAURE & BON, 1988; TOYAMA & CARNEIRO, 2000; KERKIS *et al.*, 2004; DOS-SANTOS, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2015).

4.2.2. Frações Isoladas da Peçonha Bruta de *Crotalus durissus terrificus*

A atividade coagulante das sete frações proteicas obtidas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*, por cromatografia líquida de fase reversa, foi avaliada no plasma citratado humano e somente na presença da fração #7 (Fr7) houve a formação de coágulo (FIGURA 11).

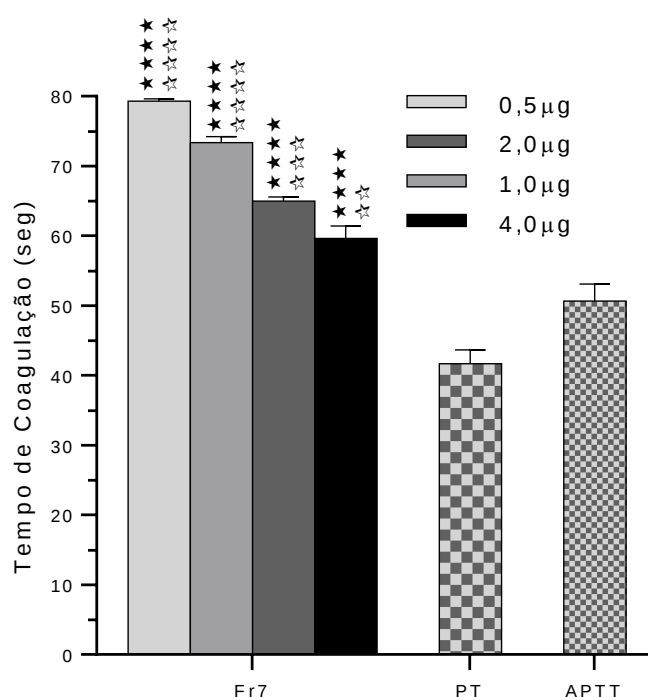


FIGURA 11 - Avaliação da atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença da fração proteica #7 (Fr7) obtida da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*. PT: tempo de protrombina avaliado pelo kit comercial PT HEMOSTASIS; APTT: tempo de tromboplastina parcial ativada avaliado pelo kit comercial APTT HEMOSTASIS. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ($n=3$) - ns: valor de $p < 0,05$; ★ ou ☆: valor de $p < 0,01$; ★★ ou ☆☆: valor de $p < 0,001$; ★★★ ou ☆☆☆: valor de $p < 0,0001$ e ★★★★★ ou ☆☆☆☆: valor de $p < 0,0001$ (★PT e ☆APTT) (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

Tanto o padrão para formação do coágulo, como o aspecto físico do coágulo plasmático formado pela presença da fração proteica #7 (*Fr7*) foram semelhantes aos obtidos pela presença da peçonha bruta.

O tempo de formação dos coágulos na presença da *Fr7* (79, 73, 65 e 60s) foi inversamente proporcional ao aumento de quantidade avaliada (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) e a aparência física dos coágulos obtidos também puderam ser descrita como uma massa hialina, textura flexível e pontual.

A análise comparativa entre o padrão de coagulação do plasma pela *Fr7* e pela peçonha bruta nos permitiram inferir que a proteína presente nesta fração é a principal responsável pela atividade coagulante da peçonha *in vitro*. Ainda, a análise do perfil eletroforético da *Fr7* no SDS-PAGE (FIGURA 07) nos possibilitou identificar a presença de uma proteína de massa molecular de, aproximadamente, 34kDa e características condizentes com a Giroxina caracterizada por possuir atividade fibrinogenolítica com consequente formação do coágulo (VIEIRA *et al.*, 2013).

O plasma humano citratado não coagulou na presença das demais frações proteicas *Fr1* – *Fr6* obtidas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* mesmo após cinco horas de monitoramento, em temperatura constante de 37°C.

Após cinco horas em que o plasma humano citratado não apresentou coagulação na presença das frações *Fr01* até *Fr06*, foi avaliado se cada uma dessas frações apresentavam algum tipo de alteração no tempo para formação de protrombina (teste de coagulação PT) em relação ao tempo padrão (na ausência de frações da peçonha bruta de *C. d. terrificus* e na presença de Tampão Fosfato-Salina, PBS) (FIGURA 12).

Para medir o grau de anticoagulação do plasma humano citratado na presença das quatro quantidades avaliadas das frações proteicas #1 até #6, após cinco horas de incubação em temperatura constante de 37°C, foi calculado a Relação (R) do tempos de protrombina entre as frações proteicas e o plasma controle, conforme a Equação #3.

$$R = \frac{\text{Tempo, em segundos, das frações proteicas}}{\text{Tempo, em segundos, do controle com PBS}} \quad \text{Equação \#3}$$

A porcentagem de Atividade de Protrombina (A%) e o valor de Relação Normalizada Internacional (RNI, conforme recomendação da OMS) referente ao valor R calculado para cada amostra avaliada (*Fr1* até *Fr6*, em quatro quantidades: 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0) foram consultados na “Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%)” (ANEXO 05) (TABELA 03).

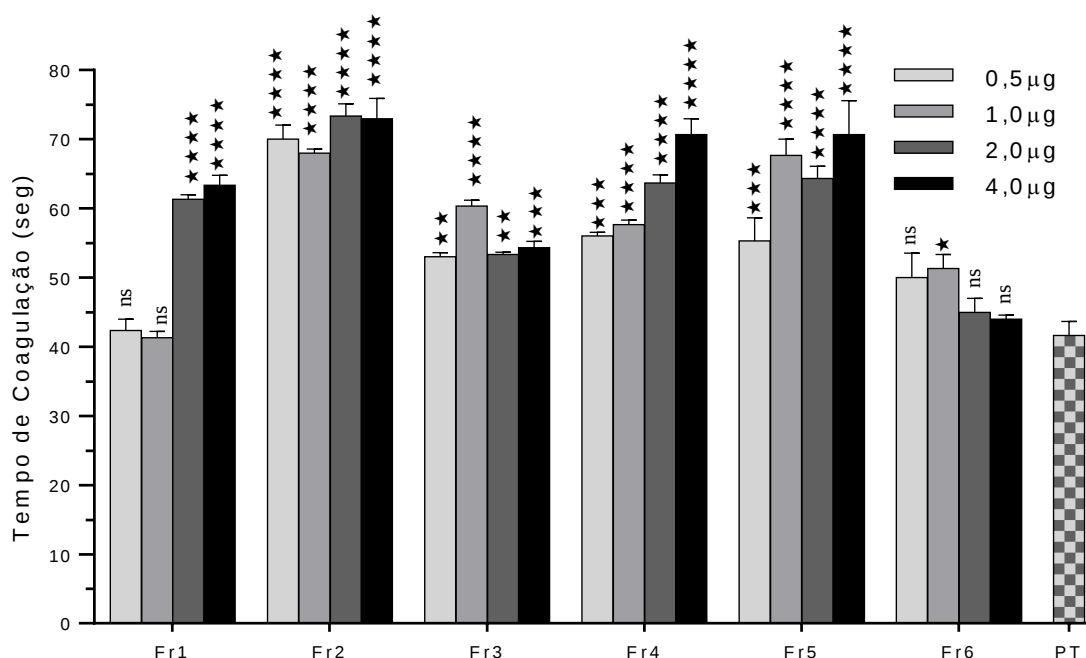


FIGURA 12 - Avaliação do Tempo de Protrombina em plasma humano citratado na presença das quantidades de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg das seis frações proteicas (Fr01 até Fr06) obtidas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* que não apresentaram a formação de coágulo, mesmo após cinco horas de incubação em temperatura constante de 37°C. PT: Tempo de protrombina avaliado pelo teste de coagulação PT HEMOSTASIS. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3) - ns: valor de $p < 0,05$; *: valor de $p < 0,01$; *: valor de $p < 0,001$; *: valor de $p < 0,0001$ e *: valor de $p < 0,0001$ (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A redução do valor da Atividade de Protrombina, em porcentagem (rA%), para cada uma das quatro quantidades das Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5 e Fr6 avaliadas foi calculado com o emprego da Equação #2.

$$rA\% = 100\% - A\%$$

Equação #2

Frações Proteicas	Quantidade de cada fração proteica											
	0,5µg			1,0µg			2,0µg			4,0µg		
	R	RNI	A%	R	RNI	A%	R	RNI	A%	R	RNI	A%
Fr1	1,00	1,00	100	0,98	1,00	100	1,45	1,38	50	1,50	1,42	47
Fr2	1,67	1,55	40	1,61	1,50	42	1,74	1,61	37	1,74	1,61	37
Fr3	1,26	1,22	64	1,42	1,35	52	1,26	1,22	64	1,29	1,25	61
Fr4	1,33	1,27	59	1,38	1,32	54	1,52	1,43	46	1,69	1,56	39
Fr5	1,31	1,26	60	1,62	1,51	42	1,52	1,43	46	1,69	1,57	38
Fr6	1,19	1,16	70	1,21	1,18	68	1,07	1,06	87	1,05	1,04	90

TABELA 03 - Valor da Relação (R) calculado para as quatro quantidades avaliadas (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) de cada fração proteica #1 a #6 (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5 e Fr6) isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, seus valores correspondentes à Relação Normalizada Internacional (RNI) e a porcentagem da Atividade de protrombina (A%) (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

O valor de RNI esperado para pessoas sadias (plasma humano citratado não alterado devido à presença de frações proteicas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*), de acordo com *Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%)* que acompanhou o teste de coagulação, deve ser entre 1,00 e 1,08 e equivale à 100% de Atividade de Protrombina.

Somente os valores de RNI e A% para a fração proteica *Fr1* (nas quantidades de 0,5 e 1,0µg) estão dentro da normalidade, enquanto que para todas as demais frações proteicas estes valores encontram-se alterados.

A Atividade de Protrombina para as quantidades de 2,0 e 4,0µg da *Fr1* apresentou rA% de 50 e 53%, respectivamente. Já, a rA% causada pela presença das quatro quantidades da *Fr2* foi superior a 55%. A rA% ocasionada pela presença de 1,0µg da *Fr3* foi de 48% e, nas demais quantidades a média avaliada foi de 37%. A rA% observada pela presença da *Fr4* foi crescente (41, 46, 54 e 61%), proporcional ao aumento da quantidade avaliada (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg). Para a *Fr5*, os valores de rA% foi oscilante, sendo de 40%, na menor quantidade avaliada (0,5 µg) e de 62% na maior quantidade (4,0 µg). Os valores de rA% causados pela presença da *Fr6* foram os menores e, estatisticamente, menos significativos: 30 e 32% nas quantidades de 0,5 e 1,0µg e 13 e 10% nas quantidades de 2,0 e 4,0µg, respectivamente.

Após revisão bibliográfica, não foram encontrados dados experimentais de alterações do tempo de protrombina e/ ou tempo de tromboplastina parcial ativada realizados com frações proteicas e/ou proteínas isoladas da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

4.2.3. Proteínas Isoladas da Peçonha Bruta de *Crotalus durissus terrificus*

A atividade coagulante do plasma citratado humano na presença de seis proteínas purificadas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* – Giroxina (GRX), Convulxina (CVX), Crotamina (CTM), Crotoxina (CTX), Crotoxina A (CA) e Crotoxina B (CB) – foi avaliada.

A Giroxina e a Convulxina apresentaram coagulação plasmática (FIGURA 13), enquanto que as demais proteínas avaliadas não apresentaram formação de coágulo mesmo após duas horas de incubação, em temperatura constante de 37°C, com plasma humano citratado.

O tempo para formação do coágulo obtido na presença da Giroxina reduziu (58, 53, 37, 14s) conforme houve o aumento da quantidade da proteína avaliada (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg), semelhante ao observado na formação do coágulo na presença da peçonha bruta de *C. d.*

terrificus e da *Fr7*, o que corroborou com os resultados descritos por BARRIO (1961), o qual relatou que a Giroxina é a toxina responsável pela atividade coagulante da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

O Convulxina somente induziu, em plasma humano citratado, a formação de coágulo após 10 minutos (média aproximada de 650 segundos), em todas as quatro quantidades avaliadas (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 μ g). O tempo de formação de coágulo aceito para descrever uma proteína que apresente atividade coagulante é de, no máximo, 10 minutos (FUNASA, 2001; HOSPITAL ALBERT EINSTEIN, 2012) Embora, em nossos experimentos, a CVX tenha induzido a formação de coágulo, ela não pode ser classificada como coagulante, fato este que corrobora com POLGAR *et al.* (1997) que descreveu a CVX como um potente ativador de plaquetas de ação trombótica, porém não interfere nos fatores da cascata de coagulação.

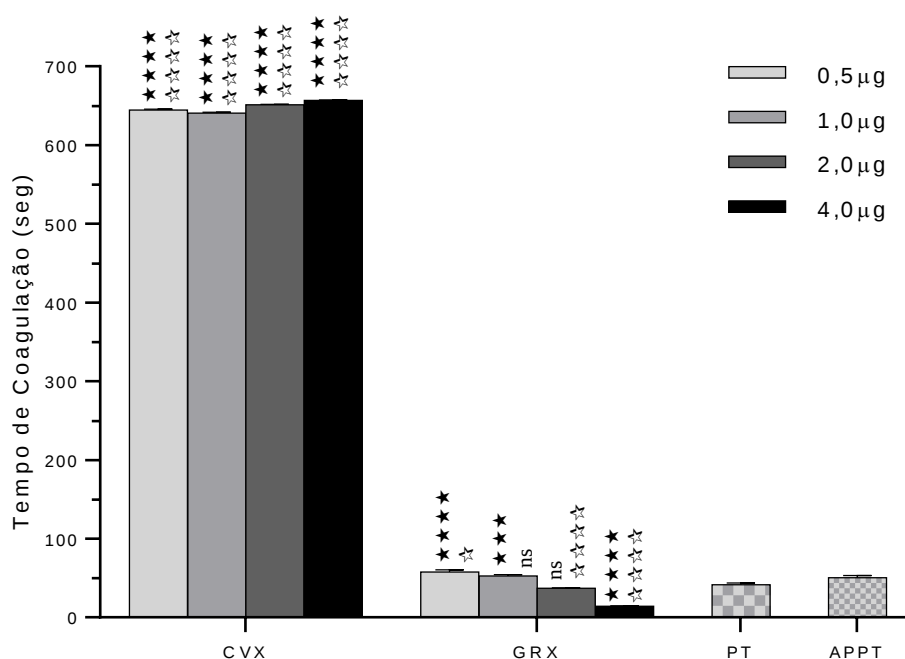


FIGURA 13 - Atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença das proteínas Giroxina (GRX) e Convulxina (CVX) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. PT: tempo de protrombina avaliado pelo kit comercial PT HEMOSTASIS; APTT: tempo de tromboplastina parcial ativada avaliado pelo kit comercial APTT HEMOSTASIS. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ($n=3$) - ns: valor de $p < 0,05$; ★ ou ☆: valor de $p < 0,01$; ★★ ou ☆☆: valor de $p < 0,001$; ★★★ ou ☆☆☆: valor de $p < 0,0001$ e ★★★★★ ou ☆☆☆☆: valor de $p < 0,0001$ (★PT e ☆APTT) (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A análise comparativa entre o tempo de formação de coágulo na presença da CVX e o tempo de coagulação da *Fr6* (coágulos obtidos na presença do teste de coagulação PT HEMOSTASIS) (FIGURA 12), nos permitiu inferir que a proteína de 68kDa observada na SDS-PAGE corresponde à CVX pois, PRADO-FRANCESCHI e VITAL-BRAZIL (1981) descreveram que a massa molecular da CVX corresponde a ~ 68 kDa. O padrão do tempo de

coagulação do plasma citratado humano na presença da CVX (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg = 645, 641, 651 e 657s, respectivamente) foi indiretamente proporcional ao tempo formação do coágulo na presença da *Fr6* durante a avaliação da atividade anticoagulante pelo kit comercial PT HEMOSTASIS (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg = 50, 51, 45 e 44s, respectivamente). Esses resultados o estão de acordo com o esperado, pois quanto maior o tempo de obtenção do coágulo na presença de tromboplastina e cálcio, maior é o grau de anticoagulação da amostra avaliada.

Após duas horas de incubação entre o plasma citratado humano e as proteínas isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus* que não apresentaram formação de coágulo, foi avaliado se estas interferiam no tempo de formação de protrombina (teste de coagulação PT HEMOSTASIS) (FIGURA 14).

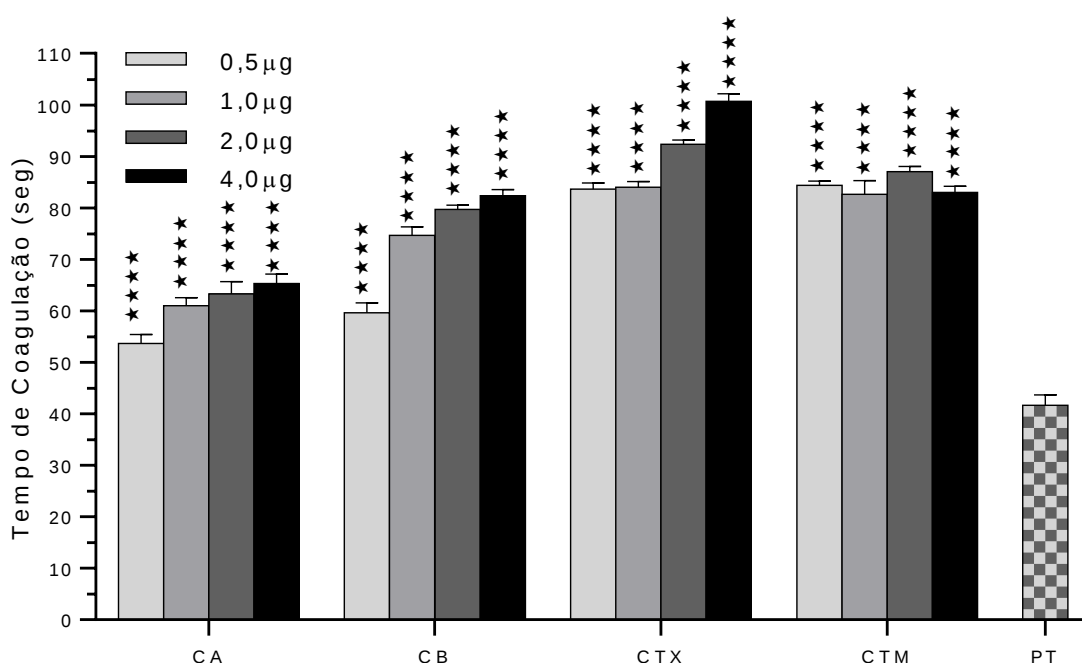


FIGURA 14 - Avaliação do Tempo de Protrombina em plasma humano citratado na presença das quantidades de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg das proteínas Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB), Crotoxina (CTX) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que não apresentaram a formação de coágulo mesmo após duas horas de incubação em temperatura constante de 37°C. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3) - ★★★★★: valor de $p < 0,0001$ (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A avaliação do grau de anticoagulação do plasma humano citratado na presença das proteínas Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB), Crotoxina (CTX) e Crotamina (CTM) isoladas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*, após duas horas de incubação em temperatura constante de 37°C, foi realizada aplicando-se a relação do Tempo de Protrombina obtidos pelas proteínas isoladas e pelo plasma controle, conforme a Equação #4.

$$R = \frac{\text{Tempo, em segundos, das proteínas isoladas}}{\text{Tempo, em segundos, do controle com PBS}}$$

Equação #4

Em seguida, consultou-se o valor da Relação Normalizada Internacional (RNI) na “Tabela de Conversão em Relação (R), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%)” (ANEXO 05) (TABELA 04).

Proteínas Isoladas	Quantidade de cada proteína isolada											
	0,5µg			1,0µg			2,0µg			4,0µg		
	R	RNI	A%	R	RNI	A%	R	RNI	A%	R	RNI	A%
Crotoxina A (CA)	1,29	1,25	61	1,45	1,38	50	1,50	1,42	47	1,55	1,46	45
Crotoxina B (CB)	1,43	1,36	51	1,79	1,65	36	1,90	1,74	32	1,95	1,78	31
Crotoxina (CTX)	2,00	1,82	30	2,00	1,82	30	2,19	1,96	26	2,40	2,12	22
Crotamina (CTM)	2,00	1,82	30	1,98	1,80	30	2,07	1,87	28	1,98	1,80	30

TABELA 04 - Valor da Relação (R) calculado para as quatro quantidades avaliadas (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) da Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB), Crotoxina (CTX) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, seus valores correspondentes à Relação Normalizada Internacional (RNI) e a porcentagem da Atividade de Protrombina (A%). (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

O valor de referência de RNI, de acordo com o teste de coagulação PT, deve ser entre 1,00 - 1,08, o que corresponde a 100% da Atividade de Protrombina. A redução da Atividade de Protrombina (rA%), em porcentagem, para cada uma das quatro quantidades das proteínas isoladas (CTX, CA, CA e CTM) analisadas foi calculada de acordo com a Equação #2.

A análise do TP e, conseqüente, da redução de Atividade de Protrombina (rA%) do plasma citratado humano na presença das proteínas purificadas da peçonha bruta de *C. d. terrificus*, permitiu avaliar a ação destas proteínas nas vias extrínseca e comum da cascata de coagulação, ou seja, nos fatores protrombínicos II, V, VII, X e o fibrinogênio.

Todas as quantidades (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg) das proteínas avaliadas (CA, CB, CTX e CTM) apresentaram rA% superior a 40%.

O valor da rA% do plasma citratado humano causada pela presença de 0,5µg da Crotoxina A foi de 39% e, nas demais quantidades (1,0, 2,0 e 4,0µg) a média foi de 53%. A análise destes valores de rA% indicou que, acima de 1,0µg de CA, não houve alteração da A%, possivelmente atingindo o seu limiar de redução.

O plasma citratado humano na presença de Crotoxina B tornou-se mais viscoso e, no entanto, não houve a formação de coágulo. A CB apresentou rA% diretamente proporcional à quantidade avaliada: 0,5µg = 49%, 1,0µg = 64%, 2,0µg = 68%, 4,0µg = 69%.

Já, o plasma citratado humano incubado com a Crotoxina, nas quantidades de 2,0 e 4,0µg, mostrou-se mais fluido em relação ao plasma somente na presença de PBS (controle), o

que corroborou com os resultados de TP que indicaram mais de 70% de redução da atividade de protrombina em todas as quantidades avaliadas.

A rA% do plasma humano citratado na presença de Crotamina foi superior a 70% em todas as quantidades avaliadas e não apresentou dependência de dose, assim como os dados observados na *Fr2*, com média de rA% de 61% e dose independente.

Para analisar, com mais especificidade, em qual dos fatores de coagulação as proteínas isoladas – CA, CA e CTM – estão atuando, foi avaliado o tempo de formação de tromboplastina parcial ativada (teste de coagulação APTT HEMOSTASIS) (FIGURA 15).

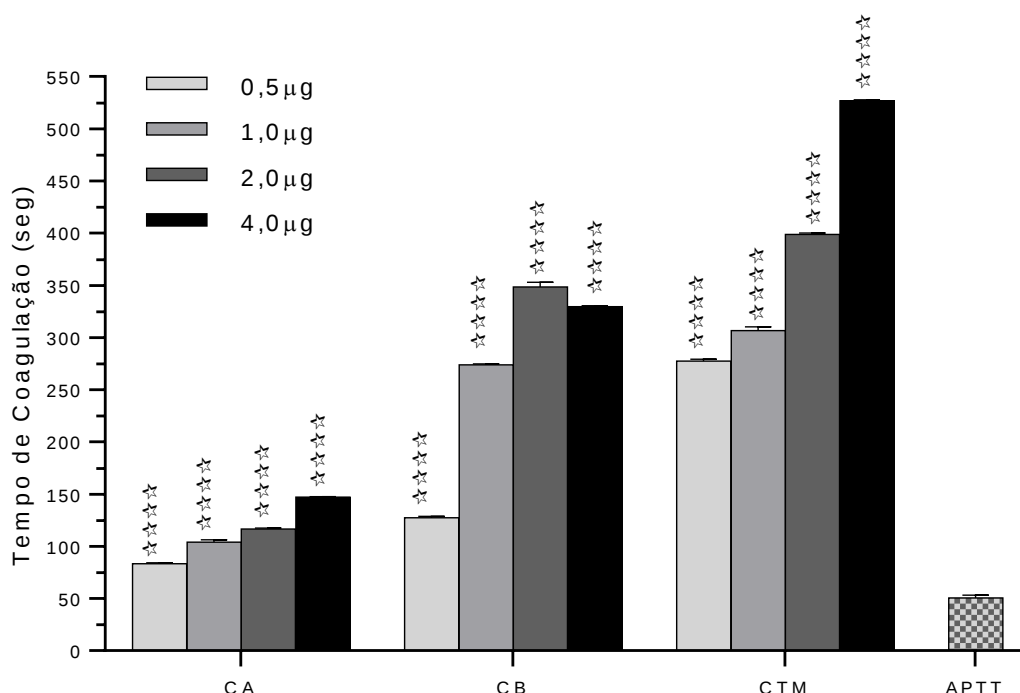


FIGURA 15 - Avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (teste de coagulação APTT HEMOSTASIS) em plasma humano citratado na presença das proteínas Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB) e Crotamina (CTM) purificadas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que não apresentaram a formação de coágulo mesmo após duas horas de incubação em temperatura constante de 37°C. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3) - ☆☆☆☆: valor de $p < 0,0001$ (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

Os tempos de coagulação do plasma humano citratado na presença das proteínas crotálicas CA, CB, e CTM avaliados pelo teste de coagulação APTT HEMOSTASIS foi maior do que os tempos de coagulação do plasma na presença da CA, CB, CTX e CTM medidos pelo PT HEMOSTASIS. O valor de TTPA mais prolongado do que o de TP caracteriza distúrbios da via intrínseca da coagulação, enquanto que o inverso, um TP aumentado e um TTPA normal, indicam deficiência isolada do Fator VII e, TP e TTPA aumentados estão relacionados à distúrbios da via comum da coagulação. Deve-se ressaltar que não houve coagulação durante a avaliação do TTPA (pelo kit comercial APTT HEMOSTASIS) do plasma citratado humano na presença da CTX, mesmo após 120 minutos de monitoramento.

O TP e o TTPA do plasma humano citratado na presença da Crotoxina A foram alterados, no entanto, com valores menores, quando comparados às demais proteínas avaliadas, o que pode ser indícios de que a CA apresenta menor interferência na inibição dos fatores da cascata de coagulação em relação a CB, CTX e CTM.

Os resultados do teste de coagulação PT HEMOSTASIS obtidos para *Fr1* e para CA foram semelhantes, no entanto, na SDS-PAGE, a *Fr1* apresentou uma banda proteica com massa molecular aproximada de 9kDa que pode ser relacionada à CA. HENDON (1976), AIRD e colaboradores (1986, 1990) descreveram a Crotapotina como uma proteína massa molecular entre 8 e 9kDa, enzimaticamente inativa e que atua como chaperona da CB (BREITHAUPT, 1976; HABERMANN e BREITHAUPT, 1978). A análise dos resultados obtidos permitiu inferir que a CA pode atuar como um inibidor seletivo do Fator Xa, pois a inibição do Fator Xa poderia ocorrer quando a CA se ligasse ao sítio da antitrombina III, o que poderia provocar uma mudança conformacional desse Fator Xa enzima, de maneira semelhante o fármaco fondaparinux, conforme a FIGURA 05.

Diversos estudos, como os realizados por DIAZ *et al* (1995) com uma PLA₂ básica (Miotoxina IV) isolada da peçonha de *Bothrops asper*, por KERNS *et al* (1999) com uma PLA₂ básica (CM-IV) isolada da peçonha de *Naja nigricollis* e por MOUNIER *et al.* (2000) com PLA₂ básica humana do grupo IIA (hGIIA), sugeriram que fosfolipases A₂ inibem a formação do complexo protrombinase (formado pelos fatores Va e Xa na presença de Ca²⁺). Estes estudos descreveram que essas PLA₂s básicas inibiram a atividade de protrombinase, mesmo na ausência de fosfolipídios pró-coagulantes, através de interação direta com o fator Xa (DIAZ *et al.*, 1995; KERNS *et al.*, 1999; MOUNIER *et al.*, 2000). Complementarmente, MOUNIER *et al* (2001) observaram que a Crotoxina B apresentou inibição da protrombinase de forma similar ao observado para a Miotoxina IV, a CM-IV e a hGIIA.

Os valores de TTPA do plasma obtidos na presença da Crotoxina B foram mais expressivos do que os valores de TP; nas maiores quantidades da CB avaliada, o TTPA aumentou, em relação ao plasma controle, em até sete vezes, enquanto que o TP dobrou. Os significativos aumentos do TP e do TTPA do plasma citratado humano na presença da CB podem ser justificados por alterações causadas à via comum da cascata de coagulação, pois essa PLA₂ básica pode interagir diretamente com o Fator Xa, inibindo a formação do complexo protrombinase e, conseqüentemente, à coagulação.

A banda proteica expressa pela *Fr4* na SDS-PAGE (FIGURA 05) apresentou massa molecular aproximada de 14kDa e rA% em até 61%. Já, na presença da CB, uma fosfolipase A₂ básica de ~14kDa (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938; HENDON; FRAENKEL-

CONRAT, 1971; AIRD *et al.*, 1986; MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2008), a atividade de protrombina foi reduzida em até 69%, resultados estes que nos possibilita dizer que a *Fr4* é composta pela CB.

As *Fr3* e *Fr5* também apresentaram, na SDS-PAGE, bandas proteicas de massas moleculares aproximadas de 14kDa com rA% média de 40 e 53%, respectivamente. FAURE e BON (1988) e FAURE *et al.* (1994) relataram diversas isoformas de CB que diferem entre si na composição de resíduos de aminoácidos resultando em modificações de atividades enzimáticas e farmacológicas. Ao menos duas isoformas de CB foram descritas detalhadamente e, uma dessas apresentou maior atividade enzimática, enquanto que a outra exibiu menor toxicidade, podendo justificar as diferenças pouco significativas observadas na rA% entre as *Fr4* e *Fr5*.

Como relatado anteriormente, a presença da Crotoxina não promoveu coagulação plasmática durante a realização do teste APTT e causou significativa redução da atividade de protrombina (acima de 70%) de maneira dose dependente, o que permite inferir que esta proteína atua, sistematicamente, como uma heparina não fracionada, um potente fármaco sintético anticoagulante que ativa a antitrombina III, que, conseqüentemente, atua na inativação da trombina e dos fatores IXa, Xa XIa e XIIa (LANGELOH *et al.*, 2012; ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

O prolongamento do TTPA (avaliado pelo teste de coagulação APTT HEMOSTASIS Ref. 502) do plasma citratado humano na presença da Crotamina (278, 307, 399 e 527s) foi diretamente proporcional à quantidade analisada (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg), enquanto que os valores do TP (avaliado pelo teste de coagulação PT HEMOSTASIS) do plasma na presença da CTM dobrou nas quatro quantidades avaliadas. Resultados similares ao dobro do aumento do TP do plasma na presença da CTM foram observados na presença da *Fr2*, o que possibilitou correlacioná-la ao resultado da SDS-PAGE, o qual não apresentou nenhuma banda proteica referente à *Fr2*. A não observância da presença da CTM na SDS-PAGE pode ser justificada pela metodologia utilizada: malha de bis-acrilamida à 13% formando poros para dimensões moleculares de ~250 a 10 kDa (BIO-RAD, 2012) que podem não ter possibilitado que a CTM, uma proteína de baixa massa molecular 4,88kDa (MANCIN *et al.*, 1998), permanecesse no gel após o final da realização do experimento.

A lepirudina, um polipeptídeo composto por 65 resíduos de aminoácidos de caráter ácido (*pI* = 4,04 e massa molecular = 6,97kDa, calculados pelo servidor *online* ExPASy – ferramenta ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005)) foi descrita como um inibidor direto da trombina, pois, interage com a trombina e impede a ativação do fibrinogênio e do fator XIII

(ARMSTRONG & GOLAN, 2016). Embora, a CTM, polipeptídeo composto por 42 resíduos de aminoácidos de caráter básico ($pI = 9,51$ e massa molecular = 4,89kDa, calculados pelo servidor *online* ExPASy – ferramenta ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005)), seja bioquimicamente distinta da hirudina, o enovelamento estrutural de ambos os polipeptídeos apresentam três folhas beta antiparalelas (FIGURA 16) que podem interagir, estruturalmente, com a trombina de forma similar.

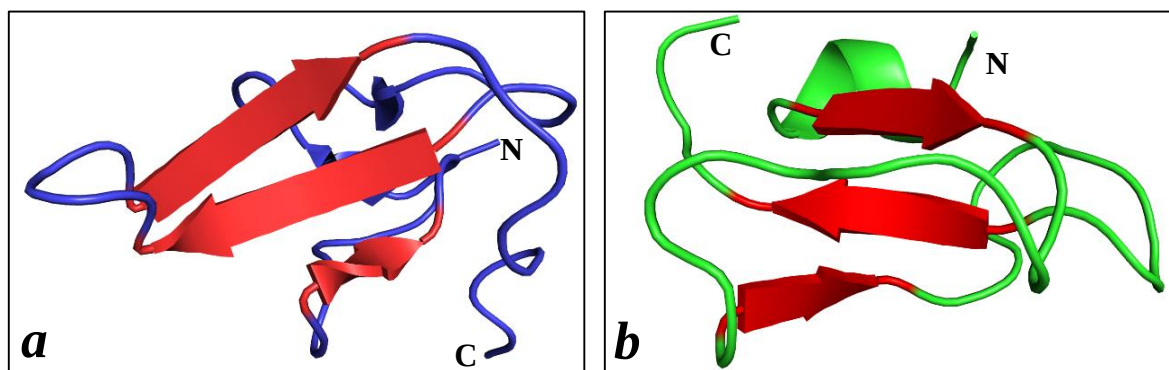


FIGURA 16 - Estrutura tridimensional da (a) Lepirudina (PDB_ID #2HIR), em azul e da (b) Crotamina (PDB_ID #1H5O), em verde. Nos dois polipeptídios, estão destacas, em vermelho, as três folhas beta antiparalelas. Figura desenhada usando o programa gráfico PyMol (DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.) (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A peçonha bruta, a fração proteica *Fr7* e a Giroxina de *Crotalus durissus terrificus* apresentaram um padrão de coagulação plasmática no qual o tempo de formação do coágulo foi indiretamente proporcional ao aumento da quantidade avaliada (FIGURA 17), bem como semelhanças físicas do coágulo formado (massa hialina, textura flexível e pontual) e a correspondência entre a massa molecular de 34kDa observada para a *Fr7* na SDS-PAGE e a descrita para a GRX (RAW *et al.* 1986), possibilitando concluir que a GRX compõe a *Fr7* e é o principal componente coagulante *in vitro* da peçonha bruta de *C. d. terrificus*.

Conforme já relatado, a atuação da Giroxina sobre o plasma resulta num coágulo instável e mais susceptível à ação de agentes fibrinolíticos devido à quebra não usual do fibrinogênio (RAW *et al.*, 1986; MARKLAND, 1998). BUCARETCHI *et al.*, (2002) relataram que a não coagulação sanguínea parcial ou total, observada em casos graves de ofidismo por *C. d. terrificus*, poderia ser decorrente do consumo do fibrinogênio pela GRX (SILVA, 2004; SILVA, 2012). No entanto, a análise de nossos resultados nos permitiu supor que o empeçonhamento crotálico pode desencadear uma coagulopatia secundária denominada Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD).

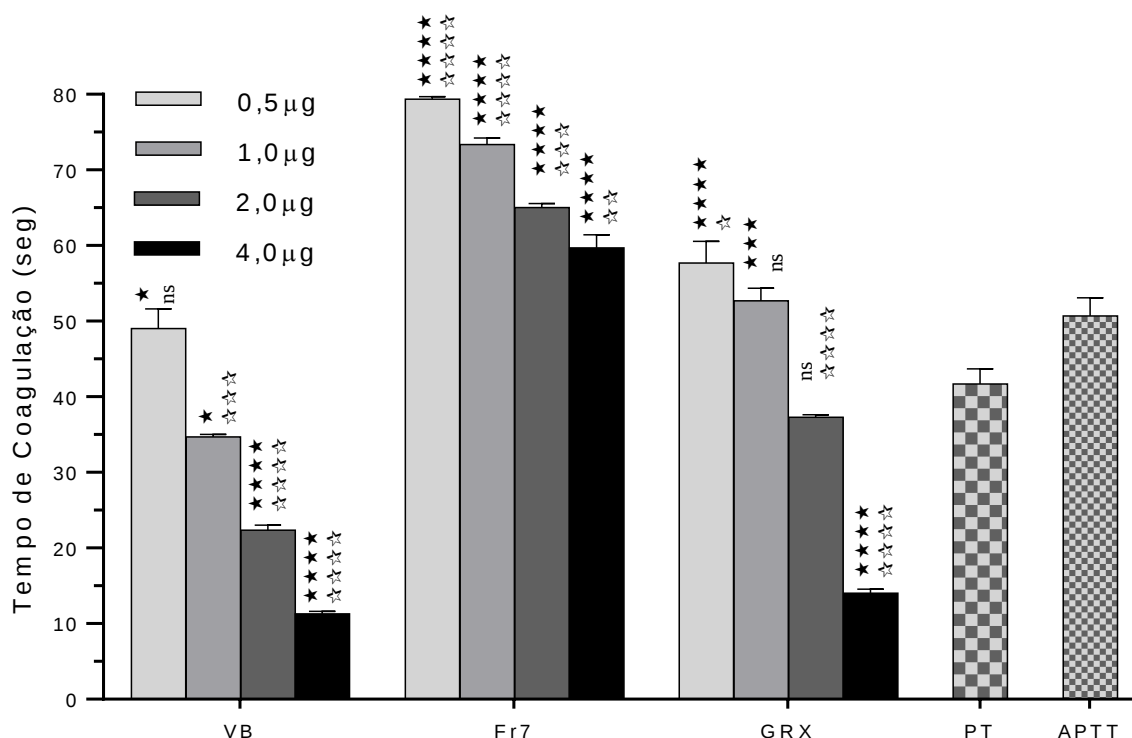


FIGURA 17 - Resultado comparativo do tempo de formação de coágulo do plasma humano citratado na presença da peçonha bruta (VB), da fração proteica #7 (Fr7) e da Giroxina (GRX). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ($n=3$) - ns: valor de $p<0,05$; ★ ou ☆: valor de $p<0,01$; ★★ ou ☆☆: valor de $p<0,001$; ★★★ ou ☆☆☆: valor de $p<0,0001$ e ★★★★★ ou ☆☆☆☆: valor de $p<<0,0001$ (★PT e ☆APTT) (Fonte: Pesquisa direta, 2014-2016).

A CIVD é desencadeada quando os Fatores III e VIIa se complexam ativando a protrombina que será convertida em trombina. A presença de trombina quebra o fibrinogênio em fibrina e aumenta os níveis do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI). A não ativação do plasminogênio gera acúmulo de fibrina. Quando a formação de trombina ou sua neutralização pelo sistema antitrombínico estão superando os mecanismos de controle da hemostasia, cria-se um paradoxo em que a hemorragia e a trombose ocorrem ao mesmo tempo (PINTÃO & GARCIA, 2003; LOPES *et al.*, 2005).

No ofidismo crotálico, a Giroxina, uma trombina-like pode atuar diretamente na quebra do fibrinogênio em fibrina e no aumento das quantidades do inibidor do ativador de plasminogênio o que, por consequência poderá formar trombos. As proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, Crotoxina e Crotamina podem atuar na disfunção e/ou inibição dos anticoagulantes naturais desequilibrando a hemostasia.

5. CONCLUSÃO

A atividade coagulante da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* *in vitro* é causada pela presença da Giroxina, a qual propicia a formação de um coágulo de massa hialina, textura flexível e pontual.

A avaliação do tempo de formação do coágulo do plasma citratado humano na presença das proteínas Crotoxina A (ou Crotapotina), Crotoxina B (ou Fosfolipase A₂ básica), o complexo Crotoxina e Crotamina, após a aplicação dos testes comerciais para aferir os tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foram alterados. Fato que possibilitou inferir que estas proteínas interferem em todas as vias (extrínseca, intrínseca e comum) da cascata de coagulação e podem atuar de forma semelhante a alguns anticoagulantes inibidores diretos de trombina, do fator Xa e do ativador da antitrombina III.

A incoagulabilidade sanguínea parcial ou total observada em casos graves de envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* pode ser provocada pela desregulação da hemostasia devido a ação destas proteínas que podem, possivelmente, inibir a trombina ou ativar a antitrombina III, inativando os fatores de coagulação IXa, Xa XIa e XIIa, bem como podem inibir a formação do complexo protrombinase por interação direta com o fator Xa.

Contudo, no ofidismo por *C. d. terrificus*, a Giroxina, uma trombina-like, pode atuar diretamente na quebra do fibrinogênio em fibrina e no aumento das quantidades do inibidor do ativador de plasminogênio o que, por consequência pode formar trombos. Ainda, as proteínas Crotoxina A, Crotoxina B, Crotoxina e Crotamina podem atuar na formação do complexo protrombinase, ou, ainda, na disfunção, ativação e/ou na inibição dos anticoagulantes naturais desequilibrando a hemostasia.

6. REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 249, n. 2, p. 296–300, 1986.
- AIRD, S. D.; YATES, J. R.; MARTINO, P. A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; KAISER, I. I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1040, n. 2, p. 217–224, 1990.
- 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 : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 26, n. 10, p. 953–60, 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**, v. 10, n. 4, p. e0121427, 2015.
- AMORIM, Â. M. V.; DE DEUS R. B.; RODRIGUES, F. S. M.; MALAGUTTI W.; FERRAZ, R. R. N.; Effectiveness of citrate as anticoagulant in continuous veno-venous hemodialysis with 60 hours cycle in intensive care unit. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 2, p.187-193, 2010.
- ARMSTRONG, A.W., GOLAN, D.E., 2016. 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.
- BARRABIN H, MARTIARENA JL, VIDAL JC, B. A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg P. Toxins: animals, plant and microbial. New York: Pergamon Press; **Anais...**1978.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamer**, v.11, p. 224, 1961.
- BARROS, G. A. C.; PEREIRA, A. V; BARROS, L. C.; JR, A. L.; CALVI, S. A.; SANTOS, L. D.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA, R. S. *In vitro* activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum* chagasi. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, p. 48, 2015..
- 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.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JUNIOR, R. S. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 23–33, 2011.
- BARROS, L. C. de. **Atividade coagulante e da toxicidade da giroxina nativa e irradiada com cobalto-60 isolada do veneno de *crotalus durissus terrificus***. 2010. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

BIO-RAD. **A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection** Bio-Rad. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf>. Acesso em: 22 de Abril de 2016.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, n. 3, p. 221–233, 1976.

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. **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 6, p. 505–508, 2013.

BUCHI, A. T. **Purificação, caracterização, cristalização e modelagem molecular teórica da fração gioxina do veneno de *crotalus durissus terrificus* (laurenti 1768)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais)-Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2010.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomomics of Bitis gabonica gabonica. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **Journal of proteome research**. v. 6, n. 1, p. 326-336, 2007

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> Acesso em: 22 de ago. 2016.

CAMILLO, M. A. P.; ARRUDA PAES, P. C.; TRONCONE, L. R. P.; ROGERO, J. R. Gyroxin fails to modify *in vitro* release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 843–853, 2001.

CHANG, Y.; DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; BAIYEE EBOT, E.; POWERS, J. G.; PHILLIPS, T. Coagulation disorders and their cutaneous presentations: Pathophysiology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n 5, p. 783-792, 2016.

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. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 795–804, 2016.

DELABRANCHE, X.; STIEL, L.; SEVERAC, F.; GALOISY, A.-C.; MAUVIEUX, L.; ZOBARI, F.; LAVIGNE, T.; TOTI, F.; ANGLÈS-CANO, E.; MEZIANI, F.; BOISRAMÉ-HELMS, J. Evidence of NETosis in Septic Shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 46, n. 5 p. 465-592. 2016.

DE LANO, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 1.8 Schrödinger, LLC 2002.

DIAS, M. L.; SILVA, J. E. P. da; WOHLFAHRT, A. B.; BRUCKER, N. Avaliação de fibrinogênio, tempo de tromboplastina parcial e tempo de protrombina em pacientes com infarto agudo do miocárdio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 2, p. 87–94, 2007.

DIAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIERREZ, J.M. Purification and Characterization of Myotoxin IV, a Phospholipase A₂ Variant, From *Bothrops asper* snake venom. **Natural Toxins**. v. 3, p. 26-31, 1995.

DOS-SANTOS, M. C. Crotoxina E Crotoxina-Simile Isoladas De Venenos De Subespécies De *Crotalus Durissus* E Suas Múltiplas Atividades. **Amazonia, Scientia**, v. 3, n. 1, p. 102–115, 2014.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229–234, 1987.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730–8, 1988.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, n. 1, p. 161–164, 1994.

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***. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia., 2005.

FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. (FUNASA, Org.). Brasília: 2001. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf> Acesso em: 10 set. 2015

GANDO, S.; LEVI, M.; TOH, C.-H. Disseminated intravascular coagulation. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16037, 2016.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 571–607, 2005.

HABERMANN, E.; BREITHAUP, H. The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**. v. 16, p. 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 (1996) 399-404

HENDON, R. A. The Role OF Complex Formation in the Neurotoxicity of Crotoxin Components A and B. **Toxicon**, v. 14, p. 283–289, 1976.

HENDON, R. a; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560–1563, 1971.

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> Acesso em: 15 jan. 2015.

ICHIKAWA, J.; HAGIHIRA, S.; MORI, T.; KODAKA, M.; NISHIYAMA, K.; OZAKI, M.; KOMORI, M. *In vitro* and *in vivo* effects of hemodilution on kaolin-based activated clotting time predicted heparin requirement using a heparin dose-response technique. **Journal of anesthesia**, 2016.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: Interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 7, p. 853–862, 1998.

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crota mine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 12, p. 1407–1409, 2004.

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 (2008) 94-99.

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.** v. 36, p. 107–113, 1999.

KOAMI, H.; SAKAMOTO, Y.; SAKURAI, R.; OHTA, M.; IMAHASE, H.; YAHATA, M.; UMEKA, M.; MIIKE, T.; NAGASHIMA, F.; IWAMURA, T.; YAMADA, K. C.; INOUE, S. The thromboelastometric discrepancy between septic and trauma induced disseminated intravascular coagulation diagnosed by the scoring system from the Japanese association for acute medicine. **Medicine**, v. 95, n. 31, p. e4514, 2016.

LANGELOH, A.; ROSÁRIO, B. A. do; COSENDEY, C. H. de A.; RODRIGUES, D. C.; MOREIRA, M. E. C.; VOEUX, P. L. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. v. 53, 2012

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 (1996) 580-589.

LEHMBERG, K.; HASSENPFUG, W. A.; KLAASSEN, I.; HILLEBRAND, G.; OYEN, F.; BUDDE, U.; SINGER, D.; SCHNEPPENHEIM, R. Inherited Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (Upshaw Schulman Syndrome) as Differential Diagnosis to Neonatal Septicaemia with Disseminated Intravascular Coagulation - a Case Series. **Zeitschrift fur Geburtshilfe und Neonatologie**, 2016.

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**, v. 89, n. 1, p. 1–5, jul. 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=AFQjCNHxDxnX7L4NOkhiOkchhT6skCBYFQ&bvm=bv.135475266,d.Y2I> Acesso em 23 fev. 2016

LIBOUREL, E. J.; KLERK, C. P. W.; VAN NORDEN, Y.; DE MAAT, M. P. M.; KRUIP, M. J.; SONNEVELD, P.; LÖWENBERG, B.; LEEBEEK, F. W. G. Disseminated intravascular coagulation at diagnosis is a strong predictor for both arterial and venous thrombosis in newly diagnosed acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 128, n. 14, p. 1854–1861, 2016.

LIU, C.; GUAN, Z.; XU, Q.; ZHAO, L.; SONG, Y.; WANG, H. Relation of thromboelastography parameters to conventional coagulation tests used to evaluate the hypercoagulable state of aged fracture patients. **Medicine**, v. 95, n. 24, p. e3934, 2016.

LOPES, S. T. dos A.; EMANUELLI, M. P.; SCHMIDT, C.; RAISER, A. G.; MAZZANTI, A.; ALVES, A. S. Valores de referência do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 381–384, 2005.

MADWAGE, K.; ISBISTER, G.K. Current treatment for Venom-Induced Consumption Coagulopathy resulting from snakebite, PLoS Negl. **Trop. Dis.** 8 (2014) e3220.

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELA, I. R.; GIGLIO, J. R. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: A biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1927–1937, 1998.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; CORRÊA, L. C.; MAGRO, A. J.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 3, p. 883–891, 2008.

MARCUSSI, S.; SANTOS, P. R. S.; MENALDO, D. L.; SILVEIRA, L. B.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ANTUNES, L. M. G.; SOARES, A. M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 59–63, 2011.

MARKLAND, F. S. Review Paper Snake Venoms and the Hemostatic System. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.

MCCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M. Snake bites and hemostasis/thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 132, n. 6, p. 642–646, 2013.

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**, v. 8, p. 144–156, 2015.

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.** v. 267, p. 4960–4969, 2000.

MOUNIER, C.M.; BON, C.; KINI, R.M. Anticoagulant Venom and Mammalian Secreted Phospholipases A₂: Protein versus Phospholipid-Dependent Mechanism of Action. **Haemostasis**. v. 31, p.279–287, 2001.

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 alpha4beta4 cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 310, n. 2, p. 478–82, 17, 2003.

OWNBY, C. L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Rattlesnake Venoms, **Marcel Dekker Inc**, A.T. Tu (Ed.), New York (1982), pp. 163–209

PINTÃO, M. C. T.; GARCIA, A. A. Tratamento de distúrbios hemostáticos em urgência médica. In: Simpósio: Urgências e Emergências Hematológicas, **Anais...**2003.

POLGAR, J.; CLEMETSON, J. M.; KEHREL, B. E.; WIEDEMANN, M.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J.; MU, D.-. Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin , a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the p62 / GPVI Collagen Receptor *. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13576–13583, 1997.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRASIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the south american rattlesnake *crotalus durissus terrificus*. **Toxicon : official journal of the international society on toxinology**, v. 19, n. 6, p. 875–87, 1981

QUICK, A. J.; STANLEY-BROWN, M.; BANCROFT, F. W. A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and in Jaundice. **The American Journal of**, v. 190, p. 501–11, 1935.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 43, n. 7, p. 801–10, 2004.

RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 19, n. 3, p. 333–338, 1986.

REIS, P. R. de M.; MESQUITA, M. M. de; DIAS-PENNA, K. G. B.; CASTRO, F. de S.; BALESTRA, F. A. Avaliação da determinação do tempo de protrombina em amostras de sangue colhidas por duas diferentes técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 251–255, 2005.

RIZZATTI, E. G.; FRANCO, R. F. Tratamento do tromboembolismo venoso. In: Simpósio: Hemostasia e Trombose, 3–4, **Anais...**2001.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, B. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex - I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie**, v. 270, n. 3, p. 274–288, 1971.

SANO-MARTINS, I. S.; DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 30, n. 2, p. 141–150, 1992. SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235-247, 1980.

SERRALVO, F. D.; ZAMBOTI, J. L.; FAVERO, M. E. Variabilidade na sensibilidade à heparina de reagentes do TTPA em plasmas heparinizado *in vitro* e de pacientes heparinizados. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, p. 243–250, 2015.

SILVA, J. A. A. da. **Aspectos de atividade biológica da gioxina (enzima trombina símile) isolada do veneno da cascavel brasileira, *crotalus durissus terrificus***. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, 2004.

SILVA, J. A. A. da. **Mediação dos receptores ativados por proteases (pars) em atividades biológicas da gioxina**. 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear)-Universidade de São Paulo, 2012.

SILVA, P. H. da; CORREA, J. R. A.; HENNEBERG, R.; NASCIMENTO, A. J. do. O uso do pool de plasma caseiro interfere no valor da RNI ? **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 4, p. 265–268, 2012.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 71, n. 5, p. 1076–1081, 1938.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S ; BORTOLETTO, R. K. ; RODRIGUES-SIMIONI, L. ; WARD, R J ; ARNI, R K ; GUTIÉRREZ, J. M. ; GIGLIO, J. R. . Dissociation between enzymatic and pharmacological activities of two myotoxic phospholipases A2, piratoxins-I and III, from Bothrops pirajai snake venom.. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 387, n.2, p. 188-196, 2001.

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**, v. 36, n.3, p. 503-514, 1998.

T.-W. JENG, R. A. HENDON, A. H. F.-Conrat. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 2, p. 600–4, 1978.

TOYAMA, M.; CARNEIRO, E. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus*(South American rattlesnake). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1474, p. 56–60, 2000.

TUMMALA, R.; KAVTARADZE, A.; GUPTA, A.; GHOSH, R. K. Specific antidotes against direct oral anticoagulants: A comprehensive review of clinical trials data. **International Journal of Cardiology**, v. 2014, p. 292-298, 2016.

USTINOV, N. B.; ZAV'YALOVA, E. G.; KOPYLOV, A. M. Effect of Thrombin Inhibitors on Positive Feedback in the Coagulation Cascade. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 81, n. 3, p. 242–8, 2016.

VIEIRA, C. O. **Mecanismo hemostático da serpente *crotalus durissus terrificus* (ophidia : viperidae , crotalinae)**. Tese (Doutorado em ciências na área de Fisiologia)-Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2014.

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**, v. 95, n. 12, p. 2365–75, 2013.

VITAL-BRAZIL, O.; EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J Physiol**, v. 212, p. 34–35, 1971.

YONAMINE, C. M.; KONDO, M. Y.; NERING, M. B.; GOUVÊA, I. E.; OKAMOTO, D.; ANDRADE, D.; DA SILVA, J. A. A.; PRIETO DA SILVA, Á. R. B.; YAMANE, T.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; HAYASHI, M. A. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R. Enzyme specificity and effects of gyroxin, a serine protease from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, on protease-activated receptors. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 79, p. 64–71, 2014.

YONAMINE, C. M.; PRIETO-DA-SILVA, A. R. B.; MAGALHÃES, G. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MORGANTI, L.; AMBIEL, F. C.; CHURA-CHAMBI, R. M.; YAMANE, T.; CAMILLO, M. A. P. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon**, v. 54, n. 2, p. 110–120, 2009.

ANEXO 01

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

CAAE: #60251516.0.0000.5188

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



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: 60251516.0.0000.5188

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/CCEN/UFPB.

Desenho:

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 prevaleça 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 S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



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*/traçar 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-População/Amostra: 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 S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.758.115

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_PROJETO_772125.pdf	23/09/2016 09:51:43		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo.doc	23/09/2016 09:51:00	Ivancia Donato de Luna Sousa	Aceito
Cronograma	cronogramalvancia.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)

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 DOM BOSCO - UCDB E, DE OUTRO, UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB

A **UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM 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 Reitor **Pe. José Marinoni**, portador do RG nº 219039 SSP/MS, e do CPF nº 127554511-49, e de outro lado, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**, 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 **CPr-Lab - UFPB**, neste ato representada por sua Magnífica Reitora 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 conjunção 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 partícipes 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 às 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, CPr-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 CPr-Lab:

- a) Disponibilizar discentes integrantes de projetos de pesquisa coordenados pela Prof^a Dr^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 lotação 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 - CPr-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 proteicas isolados de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na ausência e/ou na presença inibidores naturais e/ou



sintéticos bem como elucidar 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 PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;
- f) Captar e capacitar 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 trabalhistas e 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 naturezas 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

m


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

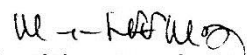
CLÁUSULA NONA - DO FORO

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.


Pe. José Marinoni
Reitor da Universidade Católica Dom Bosco


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

Testemunhas:

1. _____

2. _____

PLANO DE TRABALHO

Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB

I - IDENTIFICAÇÃO

CONCEDENTE	CNPJ
UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO	03.226.149/0015-87

RESPONSÁVEL	CPF	RG
JOSÉ MARINONI	127.554.511-49	219.039 SSP/MS

CONVENENTE	CNPJ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	24.098.477/0001-10

ENDEREÇO	CEP
CIDADE UNIVERSITARIA, CASTELO BRANCO, JOÃO 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> .



PLANO DE TRABALHO**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB****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 Bothrops e Crotalus.

JUSTIFICATIVA

O presente convênio 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 Bothrops e Crotalus na tentativa de melhor compreender o(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação(ões) destas enzimas.



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

III - METAS

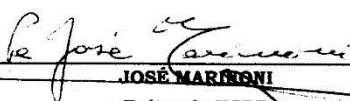
Meta	Descrição das metas e etapas	Data Inicial	Data Final
1	Extraír e caracterizar biologicamente os venenos brutos de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
2	Isolar frações proteicas que compõem peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
3	Caracterizar efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos das frações proteicas inéditas isoladas no desenvolvimento deste projeto e/ou frações proteicas isoladas na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos através de ensaios biológicos;	outubro/2014	outubro/2019
4	Cristalizar e/ou co-cristalizar (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;	janeiro/2015	outubro/2019
5	Coletar dados de difração de raios X dos cristais obtidos nas estações experimentais MX1 ou MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS/Campinas-SP;	março/2015	outubro/2019
6	Elucidar e analisar a(s) estrutura(s) tridimensional(is) das PLA2s cristalizadas que geraram bons conjuntos de dados de difração de raios X;	abril/2015	outubro/2019
7	Determinar regiões de reconhecimento de PLA2s isoladas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> frente aos soros antiofídicos anticrotálico e antibotrópico;	junho/2015	outubro/2019
8	Analisar as regiões imunogênicas das diferentes PLA2s botrópicas e crotálicas que reagiram com os diferentes soros antiofídicos e realizar um estudo comparativo entre as PLA2s isoladas de venenos de serpentes da família Viperidae;	junho/2015	outubro/2019
9	Envolver estudantes de graduação e pós-graduação a fim de inseri-los na comunidade científica e repassar a metodologia experimental utilizada para obtenção de estruturas oligoméricas de macromoléculas biológicas.	outubro/2014	outubro/2019
10	Realizar estudos computacionais (topológicos, docking, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLA2s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;	fevereiro/2015	outubro/2019
11	Divulgar os resultados parciais e/ou completos obtidos no decorrer da execução da presente parceria em congressos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.	outubro/2014	outubro/2019

PLANO DE TRABALHO**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB****IV - DECLARAÇÃO DO CONVENIENTE E APROVAÇÃO DO CONCEDENTE****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 inexistem quaisquer débitos 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.

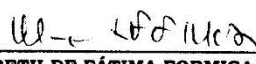


JOSÉ MARSTONI
Reitor da UCDB

Aprovação

Aprovo,

João Pessoa - PB, 21 de outubro de 2014.



MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA/MELO DINIZ
Reitora da UFPB

ANEXO 03

Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicas



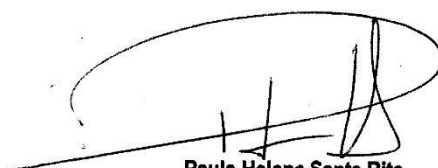
Missão Salesiana de Mato Grosso
Universidade Católica Dom Bosco
Instituição Salesiana de Educação Superior
Biotério MSMT – UCDB / β ioToxX



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 matogrossensis* 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



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. Tamararé, 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 3383
Biotério - UCDB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Av. Tamararé, 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 04

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

PT HEMOSTASIS

Instruções de Uso

Ref.: **501**
MS 10009010134

Tempo de protrombina

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

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A tromboplastina (fator tissular, fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formando, com o fator VII, um complexo estequiometricamente 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, fator Va e cálcio formam o Complexo Ativador da Protrombina, que transforma a protrombina em trombina. Essa, por sua vez, atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação da fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. O TP é o tempo necessário para a formação de fibrina após a mistura de tromboplastina, 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 protrombinico (fatores II, V, VII, X).

Característica do sistema . O reagente PT Hemostasis - Labtest contém tromboplastina extraída do cérebro de coelho que tem grande sensibilidade às deficiências isoladas ou combinadas dos fatores II, fator V, fator VII e fator X, quando comparada com outras tromboplastinas de cérebro de coelho. Sua elevada sensibilidade à presença dos PIVKas (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonism), com respostas bastante próximas das tromboplastinas humanas, propicia excelente confiabilidade no controle da terapêutica anticoagulante.

Uma importante característica do reagente Labtest está relacionada à sua rastreabilidade ao Terceiro Reagente de Referência Internacional para Tromboplastina (código RBT/90) da OMS e ao Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) estabelecido em relação à Primeira Preparação de Referência Internacional (PIR) de Tromboplastina (humana) 67/40. Assim, os resultados obtidos com o PT Hemostasis são substancialmente equivalentes aos que seriam encontrados se os TP fossem realizados com a PIR 67/40, fazendo com que os resultados sejam padronizados em nível mundial¹.

Metodologia . Coagulométrica - Quick².

Reagente

1. [K1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Material liofilizado contendo extrato de cérebro de coelho ≥2% em tampão triclina 74,8 mmol/L, cloreto de cálcio 22,2 mmol/L, azida sódica 2,15 mmol/L e estabilizadores. Ver valor do ISI impresso no rótulo do frasco.

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

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

Recolocar a tampa, homogeneizar suavemente e deixar em repouso a temperatura ambiente (entre 15 - 25 °C) durante 15 minutos. Antes de utilizar, homogeneizar suavemente. Não agitar por inversão ou vigorosamente.

O reagente reconstituído 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 reconstituição, durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade. Para preservar o desempenho, manter o reagente fora da 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 azida sódica 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 azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à 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 (falhas na excreção de sais biliares), asparaginase, clofibrato, eritromicina, etanol, tetraciclina, heparina e warfarin, bem como na presença de EDTA. A redução do TP pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, butabarbital, fenobarbital, contraceptivos orais (diminuição da resposta aos anticoagulantes orais), vitamina K e cafeína. (Ver item Modificação da Ação dos Anticoagulantes Orais).

Amostra

Usar plasma colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L (3,2%).

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra 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^{3,4,5}:

1. Obter o sangue por punção venosa e evitar garroteamento prolongado, hemólise, formação de bolhas e aspiração de líquido tissular (fator III). A agulha deve penetrar diretamente na veia na primeira tentativa (punção venosa "atraumática"). O sangue deve fluir livremente sem que seja necessário aplicar demasiada força ao êmbolo. Não realizar o TP em amostra cuja punção for difícil (punção venosa traumática).

2. Coletar a amostra com seringa de plástico e centrifugar em tubos de plástico. O uso de material de vidro não silicizado ativa os fatores da coagulação e reduz falsamente o TP. Após remover a agulha, utilizar a porção central da amostra na seringa, usando as porções anterior e posterior para outros testes.

3. No caso de sistema de coleta a vácuo, usar tubo de plástico ou vidro silicizado. Ao realizar coleta somente para testes de coagulação, coletar duas amostras. A primeira em um tubo sem anticoagulante ou em tubo contendo citrato (tampa azul) que deve ser desprezada. A segunda amostra coletada em tubo contendo citrato (tampa azul) será utilizada para a realização dos testes. No caso de coleta múltipla, a amostra para testes de coagulação deverá ser obtida após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante e antes da coleta em tubo contendo EDTA.

4. Misturar 9 partes de sangue com 1 parte de citrato ou 3 mL de sangue e 1 gota de Trombstab (Labtest Ref.: 45). Homogeneizar 3 ou 4 vezes por inversão suave. Não usar oxalato, pois o Fator V é muito sensível a este anticoagulante.

5. Em pacientes que apresentam hematócrito maior que 55% a relação entre os volumes de sangue e de anticoagulante deve ser ajustada para garantir a exatidão do resultado. Para calcular o volume de anticoagulante necessário em função do hematócrito e do volume de sangue, utilizar a fórmula que se segue:

$$\text{Volume de anticoagulante (mL)} = 0,00185 \times \text{volume de sangue (mL)} \times (100 - \text{hematócrito})$$

Exemplo

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

6. Centrifugar até 1 hora após a coleta a 3000 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 do pH da amostra, que pode interferir nos resultados.

7. Manter as amostras entre 18 - 24 °C e realizar o TP até 4 horas após a coleta. Não refrigerar o plasma, pois pode haver ativação do Fator VII pelo sistema Calicreína, reduzindo falsamente o TP. Caso exista possibilidade de congelamento rápido, o plasma pode ser congelado a 20 °C negativos por 2 semanas ou 70 °C negativos por 6 meses. Sugerimos congelar o material em alíquotas de 0,5 mL e, para evitar evaporação do material durante o período de armazenamento, utilizar frascos adequados para congelamento (criotubos). As amostras devem ser descongeladas rapidamente a 37 °C e testadas imediatamente.

8. A presença de coágulos implica rejeição da amostra.

Amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

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

Procedimento¹

O seguinte procedimento se aplica a técnica manual. O reagente pode ser empregado para determinação do TP utilizando equipamentos automáticos e semi-automáticos. Recomenda-se seguir exatamente as instruções de operação propostas pelos fabricantes.

1. Preparar o plasma de referência através da mistura (pool) de plasmas citratados obtidos de, no mínimo, 3 indivíduos sadios. Não usar plasmas de portadores de doenças hepáticas ou de mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais. Deve-se obter o tempo do plasma de referência para cada lote de PT Hemostasis. As Boas Práticas de Laboratório recomendam manter um registro dos lotes de PT Hemostasis e dos tempos do plasma de referência.

2. Realizar o teste em tubos de vidro rigorosamente limpos.

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

4. Incubar 0,1 mL do plasma a ser medido (referência, controle ou paciente) por no mínimo um minuto e no máximo 10 minutos.

5. Adicionar 0,2 mL do Reagente 1 (previamente aquecido a 37 °C) e disparar simultaneamente o cronômetro. Misturar suavemente e manter no banho-maria por 9 segundos.

6. Remover o tubo, incliná-lo sucessivamente em intervalos menores que 1 segundo e observar a formação de um coágulo que interrompe a movimentação do líquido. Parar imediatamente o cronômetro e registrar o tempo.

Cálculos

Relação dos tempos de Protrombina (R), 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 linha Pool de Referência, onde os tempos de coagulação estão destacados em negrito, o valor que mais se aproxima do tempo de coagulação obtido para o pool de referência. Em seguida, localizar na coluna correspondente o 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:

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

A utilização da R permite padronizar os resultados, com eliminação das variáveis introduzidas pela coleta da amostra e execução metodológica.

$$RNI = R^{10}$$

Calibração e rastreabilidade. O PT Hemostasis foi calibrado com o Terceiro Reagente de Referência Internacional para Tromboplastina (código RBT/90) da OMS e tem Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) estabelecido em relação à Primeira Preparação de Referência Internacional (PIR) de Tromboplastina (humana) 67/40¹.

Controle interno da qualidade. O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Sugere-se utilizar as especificações CLIA para o erro total⁶.

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

Valores de referência. Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Atividade de Protrombina: maior que 70%. Valores acima de 100% não têm significado patológico devendo ser relatados como 100%.

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

Controle de terapêutica anticoagulante. A utilização da RNI é especialmente indicada para estabelecer a faixa terapêutica nos pacientes em uso de anticoagulantes orais. A tabela abaixo indica os resultados a serem obtidos nas diversas indicações terapêuticas⁷:

Indicação Terapêutica	RNI	
	Alvo	Varição
Anticoagulação pré e per-operatória (iniciada com antecedência de 2 semanas):		
• Cirurgias de costelas	2,5	2,0 - 3,0
• Outras cirurgias	2,0	1,5 - 2,5
Prevenção de trombose venosa primária ou secundária	2,5	2,0 - 3,0
Trombose venosa ativa, embolia pulmonar, prevenção de trombose venosa recorrente.	3,0	2,0 - 4,0
Prevenção de trombo-embolia arterial e portadores 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 OMS¹, todos os resultados, independentemente da finalidade do teste, devem ser relatados em atividade e em RNI e todos os profissionais ligados ao uso de anticoagulantes orais devem ser encorajados a utilizar a RNI e abandonar a atividade de protrombina como processo de avaliação do grau de anticoagulação.

Modificação da ação dos anticoagulantes orais⁸. A ação dos anticoagulantes orais pode ser modificada por medicamentos e alterações fisiológicas da seguinte forma:

Potencializando a ação: fenilbutazona, indometacina, clofibrato, salicatos, ácido etacrínico, ácido nalidixico, D-tiroxina, probenidol, sulfas e antibióticos, difenilhidantoína, tobutamida, butazonas, inibidores da MAO, fenilamido, metifenidato, disulfiram, PAS, noretandrolona, quinina, quinidina, dipirona, paracetamol, propiltiouracil, glucagon e drogas hepatotóxicas.

Reduzindo a ação: barbitúricos (exceto tiobarbitúricos), meprobamatos, griseofulvina, estrógenos e contraceptivos orais, diuréticos, óleos minerais, colestiramina, irritantes da mucosa gastrointestinal.

Características do desempenho¹⁰

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

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	97	97
Tempo de protrombina (segundos)	10,8 - 38,3	11,1 - 37,9
Média das estimativas (segundos)	20,1	21,3
Equação da regressão*	Método Labtest = 1,05 x Método Comparativo	
Coefficiente de correlação	0,878	

* A equação foi estimada utilizando o modelo de calibração de tromboplastinas proposto pela OMS que exclui o ponto de interseção⁶.

Utilizando a equação da 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 1,6% e no tempo de 66,3 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	66,3	3,9	5,8

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	40	12,9	0,10	0,8
Amostra 2	40	30,0	0,92	3,1
Amostra 3	40	60,6	1,30	2,2

Avaliação do erro total . O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado no tempo de 13,0 segundos é igual a 2,6%, no tempo de 32,7 segundos é igual a 13,4% e no tempo de 66,3 segundos é igual a 14,7%. Os resultados indicam que o método atende à especificação CLIA para erro total ($\leq 15,0\%$)⁶.

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

(%) Fator	Tempo de protrombina (segundos)			
	Fator II	Fator V	Fator VII	Fator X
100	11,6	11,6	11,8	11,7
50	11,6	13,2	12,6	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	17,0

Significado clínico . O TP está prolongado em todos os casos de deficiências congênicas ou adquiridas dos fatores II, V, VII e X. As deficiências adquiridas ocorrem principalmente em: tratamento com anticoagulantes orais, distúrbios da ingestão ou absorção de vitamina K, doença hemorrágica do recém-nascido, icterícia obstrutiva, distúrbio da absorção intestinal, antibioticoterapia, insuficiência hepática, fibrinólise e coagulação intravascular.

Na hepatite aguda a redução dos fatores II, VII e X precede os sinais clínicos e os resultados encontrados são dependentes do estágio e da intensidade da doença.

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 clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

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

Referências

- WHO Expert Committee on Biological Standardization. 48th Report. WHO Tech Rep Ser 1999; 889:70-95.
- Quick AJ, Leu M. J Biol Chem 1937;119:73-84.
- International Committee for Standardization in Hematology. Thromb Haemostas 1976;36:237-238.
- NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays; Approved Guideline Fourth Edition. NCCLS document H21-A4, 2003.
- NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard Fifth Edition. NCCLS document H3-A5, 2003.
- CLIA Requirements for Analytical Quality. Disponível em <http://www.westgard.com/clia.htm>.
- Loeliger EA, Poller L, Samama E et al. Thromb Haemostas 1985;54:515-517.
- Henrykoff F, Rosenfeld LGM, Guerra CCC. Rev Ass Méd Brás 1977;23:100-102.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. 33rd Report. WHO Tech Rep Ser 1983;687:81-105.
- Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
PT Hemostasis	501-5/2	RT 5 X 2 mL

Informações ao consumidor**[Termos e condições de garantia]**

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

 Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000

Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br**Serviço de Apoio ao Cliente** | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)e-mail: sac@labtest.com.brRevisão: Novembro, 2006
Ref.: 170309Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

ANEXO 05

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), Relação Normalizada Internacional (RNI) e Atividade de Protrombina (A%).
 Tabla de Conversión en Relación (R), Razón Internacional Normalizada (RIN) y Actividad de Protrombina (A%).
 Conversion Table in Prothrombin Ratio (PR), International Normalized Ratio (INR), and Prothrombin Activity (A%).

Lote/Lot: 5005												
ISI: 0.86												
Amostra / Muestra / Sample	Tempo de coagulação (segundos) / Tiempo de coagulación (segundos) / Coagulation time (seconds)									R PR	RNI RIN INR	A%
Pool de Referência / Pool de Referencia / Reference Pool	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	15.5	1.00	1.00	100
Amostra teste / Muestra Test / Test sample	11.7	12.2	12.8	13.3	13.8	14.3	14.8	15.3	15.8	1.02	1.02	96
	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.6	15.1	15.6	16.1	1.04	1.03	92
	12.2	12.7	13.3	13.8	14.3	14.8	15.4	15.9	16.4	1.06	1.05	88
	12.4	13.0	13.5	14.0	14.6	15.1	15.7	16.2	16.7	1.08	1.07	85
	12.7	13.2	13.8	14.3	14.9	15.4	16.0	16.5	17.1	1.10	1.09	82
	12.9	13.4	14.0	14.6	15.1	15.7	16.2	16.8	17.4	1.12	1.10	79
	13.1	13.7	14.3	14.8	15.4	16.0	16.5	17.1	17.7	1.14	1.12	76
	13.3	13.9	14.5	15.1	15.7	16.2	16.8	17.4	18.0	1.16	1.14	74
	13.6	14.2	14.8	15.3	15.9	16.5	17.1	17.7	18.3	1.18	1.15	72
	13.8	14.4	15.0	15.6	16.2	16.8	17.4	18.0	18.6	1.20	1.17	69
	14.0	14.6	15.3	15.9	16.5	17.1	17.7	18.3	18.9	1.22	1.19	67
	14.3	14.9	15.5	16.1	16.7	17.4	18.0	18.6	19.2	1.24	1.20	65
	14.5	15.1	15.8	16.4	17.0	17.6	18.3	18.9	19.5	1.26	1.22	64
	14.7	15.4	16.0	16.6	17.3	17.9	18.6	19.2	19.8	1.28	1.24	62
	15.0	15.6	16.3	16.9	17.6	18.2	18.9	19.5	20.2	1.30	1.25	60
	15.2	15.8	16.5	17.2	17.8	18.5	19.1	19.8	20.5	1.32	1.27	59
	15.4	16.1	16.8	17.4	18.1	18.8	19.4	20.1	20.8	1.34	1.29	57
	15.6	16.3	17.0	17.7	18.4	19.0	19.7	20.4	21.1	1.36	1.30	56
	15.9	16.6	17.3	17.9	18.6	19.3	20.0	20.7	21.4	1.38	1.32	54
	16.1	16.8	17.5	18.2	18.9	19.6	20.3	21.0	21.7	1.40	1.34	53
	16.3	17.0	17.8	18.5	19.2	19.9	20.6	21.3	22.0	1.42	1.35	52
	16.6	17.3	18.0	18.7	19.4	20.2	20.9	21.6	22.3	1.44	1.37	51
	16.8	17.5	18.3	19.0	19.7	20.4	21.2	21.9	22.6	1.46	1.38	50
	17.0	17.8	18.5	19.2	20.0	20.7	21.5	22.2	22.9	1.48	1.40	48
	17.3	18.0	18.8	19.5	20.3	21.0	21.8	22.5	23.3	1.50	1.42	47
	17.5	18.2	19.0	19.8	20.5	21.3	22.0	22.8	23.6	1.52	1.43	46
	17.7	18.5	19.3	20.0	20.8	21.6	22.3	23.1	23.9	1.54	1.45	45

Lote/Lot: 5005		ISI: 0.86										
Amostra / Muestra / Sample	Tempo de coagulação (segundos) / Tiempo de coagulación (segundos) / Coagulation time (seconds)									R PR	RNI RIN INR	A%
Pool de Referência / Pool de Referencia / Reference Pool	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	15.5	1.00	1.00	100
Amostra teste / Muestra Test / Test sample	17.9	18.7	19.5	20.3	21.1	21.8	22.6	23.4	24.2	1.56	1.47	44
	18.2	19.0	19.8	20.5	21.3	22.1	22.9	23.7	24.5	1.58	1.48	43
	18.4	19.2	20.0	20.8	21.6	22.4	23.2	24.0	24.8	1.60	1.50	42
	18.6	19.4	20.3	21.1	21.9	22.7	23.5	24.3	25.1	1.62	1.51	42
	18.9	19.7	20.5	21.3	22.1	23.0	23.8	24.6	25.4	1.64	1.53	41
	19.1	19.9	20.8	21.6	22.4	23.2	24.1	24.9	25.7	1.66	1.55	40
	19.3	20.2	21.0	21.8	22.7	23.5	24.4	25.2	26.0	1.68	1.56	39
	19.6	20.4	21.3	22.1	23.0	23.8	24.7	25.5	26.4	1.70	1.58	38
	19.8	20.6	21.5	22.4	23.2	24.1	24.9	25.8	26.7	1.72	1.59	38
	20.0	20.9	21.8	22.6	23.5	24.4	25.2	26.1	27.0	1.74	1.61	37
	20.2	21.1	22.0	22.9	23.8	24.6	25.5	26.4	27.3	1.76	1.63	36
	20.5	21.4	22.3	23.1	24.0	24.9	25.8	26.7	27.6	1.78	1.64	36
	20.7	21.6	22.5	23.4	24.3	25.2	26.1	27.0	27.9	1.80	1.66	35
	20.9	21.8	22.8	23.7	24.6	25.5	26.4	27.3	28.2	1.82	1.67	34
	21.2	22.1	23.0	23.9	24.8	25.8	26.7	27.6	28.5	1.84	1.69	34
	21.4	22.3	23.3	24.2	25.1	26.0	27.0	27.9	28.8	1.86	1.71	33
	21.6	22.6	23.5	24.4	25.4	26.3	27.3	28.2	29.1	1.88	1.72	33
	21.9	22.8	23.8	24.7	25.7	26.6	27.6	28.5	29.5	1.90	1.74	32
	22.1	23.0	24.0	25.0	25.9	26.9	27.8	28.8	29.8	1.92	1.75	32
	22.3	23.3	24.3	25.2	26.2	27.2	28.1	29.1	30.1	1.94	1.77	31
	22.5	23.5	24.5	25.5	26.5	27.4	28.4	29.4	30.4	1.96	1.78	31
	22.8	23.8	24.8	25.7	26.7	27.7	28.7	29.7	30.7	1.98	1.80	30
	23.0	24.0	25.0	26.0	27.0	28.0	29.0	30.0	31.0	2.00	1.82	30
	23.2	24.2	25.3	26.3	27.3	28.3	29.3	30.3	31.3	2.02	1.83	29
	23.5	24.5	25.5	26.5	27.5	28.6	29.6	30.6	31.6	2.04	1.85	29
	23.7	24.7	25.8	26.8	27.8	28.8	29.9	30.9	31.9	2.06	1.86	29
	23.9	25.0	26.0	27.0	28.1	29.1	30.2	31.2	32.2	2.08	1.88	28
	24.2	25.2	26.3	27.3	28.4	29.4	30.5	31.5	32.6	2.10	1.89	28
	24.4	25.4	26.5	27.6	28.6	29.7	30.7	31.8	32.9	2.12	1.91	27
	24.6	25.7	26.8	27.8	28.9	30.0	31.0	32.1	33.2	2.14	1.92	27
	24.8	25.9	27.0	28.1	29.2	30.2	31.3	32.4	33.5	2.16	1.94	27
	25.1	26.2	27.3	28.3	29.4	30.5	31.6	32.7	33.8	2.18	1.95	26
	25.3	26.4	27.5	28.6	29.7	30.8	31.9	33.0	34.1	2.20	1.97	26
	25.9	27.0	28.1	29.3	30.4	31.5	32.6	33.8	34.9	2.25	2.01	25
	26.5	27.6	28.8	29.9	31.1	32.2	33.4	34.5	35.7	2.30	2.05	24

Lote/Lot: 5005		ISI: 0.86											
Amostra / Muestra / Sample	Tempo de coagulação (segundos) / Tiempo de coagulación (segundos) / Coagulation time (seconds)										R PR	RNI RIN INR	A%
Pool de Referência / Pool de Referencia / Reference Pool	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	15.5	1.00	1.00	100	
Amostra teste / Muestra Test / Test sample	27.0	28.2	29.4	30.6	31.7	32.9	34.1	35.3	36.4	2.35	2.09	23	
	27.6	28.8	30.0	31.2	32.4	33.6	34.8	36.0	37.2	2.40	2.12	22	
	28.2	29.4	30.6	31.9	33.1	34.3	35.5	36.8	38.0	2.45	2.16	22	
	28.8	30.0	31.3	32.5	33.8	35.0	36.3	37.5	38.8	2.50	2.20	21	
	29.3	30.6	31.9	33.2	34.4	35.7	37.0	38.3	39.5	2.55	2.24	20	
	29.9	31.2	32.5	33.8	35.1	36.4	37.7	39.0	40.3	2.60	2.27	19	
	30.5	31.8	33.1	34.5	35.8	37.1	38.4	39.8	41.1	2.65	2.31	19	
	31.1	32.4	33.8	35.1	36.5	37.8	39.2	40.5	41.9	2.70	2.35	18	
	31.6	33.0	34.4	35.8	37.1	38.5	39.9	41.3	42.6	2.75	2.39	18	
	32.2	33.6	35.0	36.4	37.8	39.2	40.6	42.0	43.4	2.80	2.42	17	
	32.8	34.2	35.6	37.1	38.5	39.9	41.3	42.8	44.2	2.85	2.46	17	
	33.4	34.8	36.3	37.7	39.2	40.6	42.1	43.5	45.0	2.90	2.50	16	
	33.9	35.4	36.9	38.4	39.8	41.3	42.8	44.3	45.7	2.95	2.54	16	
	34.5	36.0	37.5	39.0	40.5	42.0	43.5	45.0	46.5	3.00	2.57	16	
	35.1	36.6	38.1	39.7	41.2	42.7	44.2	45.8	47.3	3.05	2.61	15	
	35.7	37.2	38.8	40.3	41.9	43.4	45.0	46.5	48.1	3.10	2.65	15	
	36.2	37.8	39.4	41.0	42.5	44.1	45.7	47.3	48.8	3.15	2.68	15	
	36.8	38.4	40.0	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	3.20	2.72	14	
	37.4	39.0	40.6	42.3	43.9	45.5	47.1	48.8	50.4	3.25	2.76	14	
	38.0	39.6	41.3	42.9	44.6	46.2	47.9	49.5	51.2	3.30	2.79	14	
	38.5	40.2	41.9	43.6	45.2	46.9	48.6	50.3	51.9	3.35	2.83	14	
	39.1	40.8	42.5	44.2	45.9	47.6	49.3	51.0	52.7	3.40	2.86	13	
	39.7	41.4	43.1	44.9	46.6	48.3	50.0	51.8	53.5	3.45	2.90	13	
	40.3	42.0	43.8	45.5	47.3	49.0	50.8	52.5	54.3	3.50	2.94	13	
	40.8	42.6	44.4	46.2	47.9	49.7	51.5	53.3	55.0	3.55	2.97	13	
	41.4	43.2	45.0	46.8	48.6	50.4	52.2	54.0	55.8	3.60	3.01	12	
	42.0	43.8	45.6	47.5	49.3	51.1	52.9	54.8	56.6	3.65	3.04	12	
	42.5	44.4	46.2	48.1	49.9	51.8	53.6	55.5	57.3	3.70	3.08	12	
	43.1	45.0	46.9	48.7	50.6	52.5	54.4	56.2	58.1	3.75	3.12	12	
	43.7	45.6	47.5	49.4	51.3	53.2	55.1	57.0	58.9	3.80	3.15	12	
	44.3	46.2	48.1	50.0	52.0	53.9	55.8	57.7	59.7	3.85	3.19	11	
	44.8	46.8	48.7	50.7	52.6	54.6	56.5	58.5	60.4	3.90	3.22	11	
	45.4	47.4	49.4	51.3	53.3	55.3	57.3	59.2	61.2	3.95	3.26	11	
	46.0	48.0	50.0	52.0	54.0	56.0	58.0	60.0	62.0	4.00	3.29	11	
	46.6	48.6	50.6	52.6	54.7	56.7	58.7	60.7	62.8	4.05	3.33	11	

Lote/Lot: 5005		ISI: 0.86										
Amostra / Muestra / Sample	Tempo de coagulação (segundos) / Tiempo de coagulación (segundos) / Coagulation time (seconds)									R PR	RNI RIN INR	A%
Pool de Referência / Pool de Referencia / Reference Pool	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	15.5	1.00	1.00	100
Amostra teste/ Muestra Test / Test sample	47.1	49.2	51.2	53.3	55.3	57.4	59.4	61.5	63.5	4.10	3.37	10
	47.7	49.8	51.9	53.9	56.0	58.1	60.2	62.2	64.3	4.15	3.40	10
	48.3	50.4	52.5	54.6	56.7	58.8	60.9	63.0	65.1	4.20	3.44	10

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

- Determinar o tempo de protrombina do pool de referência e da amostra teste.
Determinar el tiempo de protrombina del pool de referencia e de la muestra test.
Determine the prothrombin time of the reference pool and the test sample.
- Localizar o resultado obtido para o pool de referência na linha "Pool de Referência", onde os tempos de coagulação estão destacados em negrito.
Localizar el resultado obtenido para el pool de referencia en la línea "Pool de Referencia", donde los tiempos de coagulación están en negrilla.
Find the obtained result for the reference pool in the "Reference Pool" line, where the coagulation times are shown in boldface.
- Localizar na coluna correspondente, o tempo de coagulação da "Amostra Teste".
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 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.
Los resultados de la muestra test, expresos en Relación (R), Razón Internacional Normalizada y Actividad de Protrombina (A%) pueden ser obtenidos en la misma línea donde se localiza el tiempo en segundos de la muestra test, en las últimas tres columnas de la tabla.
The results for the test sample, expressed as PR, INR, and A%, can be found on the same line as the time in seconds for the test sample, in the last three columns of the table.

Expiração/Expiración/Expiration: 2018/03/16

Ref.: 2309155015005

ANEXO 06

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

APTT HEMOSTASIS

Instruções de Uso

Ref.: **502**

MS 10009010135

Tempo de tromboplastina parcial ativada

Finalidade . Reagente para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e medição dos fatores da coagulação baseada no tempo de tromboplastina parcial ativada.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . O reagente contendo ativador plasmático (ácido eláxico) desencadeia o mecanismo de coagulação da via intrínseca através da ativação do fator XII (Hageman), que forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e com a pré-caliceína (PK). O fator XII ativado atua sobre o fator XI gerando o fator XIa que na presença de fosfolípidos e cálcio transforma o fator IX em uma enzima ativa (fator IXa), que ativa o fator VIII, formando o complexo IXa-fosfolípide-VIIIa que ativa o fator X. Esse fator ativado transforma a protrombina em trombina que atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação de fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. O TTPA é realizado incubando o plasma citratado com o reagente contendo ativador e fosfolípidos. Após a adição de cálcio, faz-se a medição do tempo de formação do coágulo.

Característica do sistema . O produto APTT Hemostasis - Labtest contém substitutos de fosfolípidos plaquetários que, juntamente com um ativador solúvel, ácido eláxico, proporciona condições ótimas para a ativação por contato dos fatores da coagulação (via intrínseca). Apesar de ser sensível a deficiências de todos os fatores da coagulação, com exceção do fator VII, o sistema APTT Hemostasis detecta desordens hemorrágicas secundárias principalmente à deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII e Pré-caliceína.

O APTT Hemostasis pode ser utilizado também com sucesso para monitorar pacientes em terapia com heparina. O sistema é suficientemente sensível para discriminar diferentes concentrações deste anticoagulante, apresentando prolongamento do tempo de coagulação proporcional à concentração de heparina no plasma.

Metodologia . Coagulometria.

Reagente

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém ácido eláxico $\geq 99 \mu\text{mol/L}$, fosfolípide de cérebro de coelho $\geq 0,007\%$, fenol 320 mmol/L , albumina bovina $0,005\%$, estabilizadores e preservativo. Pronto para uso.

2 [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém cloreto de cálcio 20 mmol/L e azida sódica $\leq 0,095\%$.

Os reagentes não abertos, quando armazenado nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Após abertos, os reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da 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 ponteiros mal lavados.

Precauções e cuidados especiais

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

O Reagente 2 contém azida sódica 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 azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à 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, aztreonam, ofloxacino, metronidazol e fenitoína.

A redução do TTPA pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, digitálicos, contraceptivos orais, tetraciclina e estrógenos conjugados.

É importante também que a amostra seja coletada, preparada e armazenada conforme descrito no item AMOSTRA.

Amostra

Usar plasma colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L ($3,2\%$).

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra 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^{1,3}.

1. Obter o sangue por punção venosa e evitar garroteamento prolongado, hemólise, formação de bolhas e aspiração de líquido tissular (fator III). A agulha deve penetrar diretamente na veia na primeira tentativa (punção venosa não traumática). O sangue deve fluir livremente sem que seja necessário aplicar demasiada força ao êmbolo. Não realizar o TTPA em amostra cuja punção for difícil (punção venosa traumática).

2. Coletar a amostra com seringa de plástico e centrifugar em tubos de plástico. O uso de material de vidro não siliconizado ativa os fatores da coagulação e reduz falsamente o TTPA. Após remover a agulha, utilizar a porção 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 siliconizado. Ao realizar coleta somente para testes de coagulação, coletar duas amostras. A primeira em um tubo sem anticoagulante ou em tubo contendo citrato (tampa azul) que deve ser desprezada.

A segunda amostra coletada em tubo contendo citrato (tampa azul) será utilizada para a realização dos testes. No caso de coleta múltipla, a amostra para testes de coagulação deverá ser obtida após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante e antes da coleta em tubo contendo EDTA.

4. Misturar 9 partes de sangue com 1 parte de citrato ou 3 mL de sangue e 1 gota de Trombstab (Labtest Ref.: 45). Homogeneizar 3 ou 4 vezes por inversão suave. Não usar oxalato, pois o Fator V é muito sensível a este anticoagulante.

5. Em pacientes que apresentam hematócrito maior que 55% a relação entre os volumes de sangue e de anticoagulante deve ser ajustada para garantir a exatidão do resultado. 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) = $0,00185 \times \text{volume de sangue (mL)} \times (100 - \text{hematócrito})$

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

6. Centrifugar até 1 hora após a coleta a 3000 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 do pH da amostra, que pode interferir nos resultados.

7. Manter as amostras entre 2 - 24 °C e realizar o TTPA até 4 horas após a coleta. Caso exista possibilidade de congelamento rápido, o plasma, separado das células, pode ser congelado a 20 °C negativos por 2 semanas ou 70 °C negativos por 6 meses. Sugerimos congelar o material em alíquotas de 0,5 mL e, para evitar evaporação do material durante o período de armazenamento, utilizar frascos adequados para congelamento (criotubos). As amostras devem ser descongeladas rapidamente a 37 °C e testadas imediatamente.

8. A presença de coágulos implica na rejeição da amostra.

Amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

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

Procedimento⁴

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

1. Realizar o teste utilizando tubos de vidro rigorosamente 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. Incubar a 37 °C, 0,1 mL do plasma a ser medido (controle ou paciente) por no mínimo um minuto e no máximo 10 minutos.

5. Adicionar 0,1 mL do Reagente 1, homogeneizar e incubar 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 disparar simultaneamente o cronômetro. Misturar suavemente e manter no banho-maria a 37 °C por 15 a 20 segundos.

7. Remover o tubo, incliná-lo sucessivamente em intervalos menores que 1 segundo e observar a formação de um coágulo que interrompe a movimentação do líquido. Parar imediatamente o cronômetro e registrar o tempo.

Controle interno da qualidade. O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para monitorizar a imprecisão da medição. Sugere-se utilizar as especificações CLIA para o erro total⁵.

Intervalo de referência⁶⁻⁸

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

Idade	Intervalo (segundos)
2 meses	26,3 - 46,9
5 meses	26,1 - 45,9
Criança a partir de 6 meses e adultos	26,7 - 37,6

Características do desempenho⁹

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

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	205	205
Tempo de tromboplastina parcial ativada (segundos)	21,9 - 200	21,0 - 167,8
Média das estimativas (segundos)	34,6	32,7
Equação da regressão	Labtest = 0,8232 x Comparativo + 4,25	
Coefficiente de correlação	0,985	

Utilizando a equação da regressão, o erro sistemático total estimado no tempo de 26,7 segundos é igual a 1,76% e no tempo de 65,6 segundos é igual a 11,2%.

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

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	26,8	0,08	0,3
Amostra 2	10	66,6	0,60	0,9

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	5	26,7	0,19	0,7
Amostra 2	5	65,6	0,79	1,2

Avaliação do erro total . O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado no tempo de 26,7 segundos é igual a 3,13% e no tempo de 65,6 segundos é igual a 13,6%. Os resultados indicam que o método atende à especificação CLIA para erro total ($\leq 15,0\%$)⁵.

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.

A ação anticoagulante da heparina depende de muitos fatores, tais como: nível adequado de antitrombina III, ativação plaquetária e subsequente exposição do Fator 4 plaquetário.

Medicamentos, taxa de metabolização e forma de administração da heparina e o tempo entre a coleta e realização do teste interferem no teste de sensibilidade.

A sensibilidade relativa do reagente APTT Hemostasis para a heparina pode ser determinada estabelecendo-se uma curva de sensibilidade 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 laboratório deve realizar o teste de sensibilidade utilizando a heparina de mesma fonte da administrada ao paciente e levando-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 APTT Hemostasis e um coagulômetro foto-ótico.

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

Sensibilidade à deficiência de fatores da coagulação

Plasmas com deficiência moderada e grave de vários fatores foram avaliados com o reagente APTT Hemostasis e o reagente demonstrou sensibilidade apropriada às deficiências dos fatores da coagulação conforme está mostrado na tabela a seguir:

Fator	Atividade do fator%	TTPA (segundos)
VIII	<1	82,0
VIII	20	44,8
IX	<1	83,5
IX	20	40,9
XI	<1	134,2
XI	20	47,8
XII	<1	>200
XII	20	36,2
Pré-caliceína	<1	69,5

Significado clínico . O TTPA avalia as vias intrínseca e comum da cascata da coagulação. O TTPA é relativamente mais sensível às deficiências dos fatores VIII e IX do que às deficiências dos fatores XI e XII ou fatores da via comum, mas, na maioria das técnicas, níveis de fatores entre 15% e 30% do normal prolongam o TTPA. O TTPA é usado para detecção de deficiências ou inibidores dos fatores da coagulação da via intrínseca ou comum, além de se prestar para monitorização da anticoagulação com heparina e para rastreamento do anticoagulante lúpico.

Distúrbios da via intrínseca da cascata da coagulação são caracterizados pelo TTPA prolongado e o Tempo de Protrombina (TP) normal. Formas hereditárias incluem a deficiência dos fatores VIII ou IX (hemofílias A ou B respectivamente), fator XI, pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular e fator XII. A deficiência dos três últimos fatores não está associada com quadro de manifestação hemorrágica, constituindo-se apenas uma anormalidade laboratorial. Distúrbios adquiridos que cursam com TP normal e TTPA prolongado incluem o inibidor lúpico ou inibidores dos fatores VIII, IX e XI, além do uso de heparina.

Distúrbios da via comum causam o prolongamento do TP e TTPA, os quais, quando hereditários, indicam formas raras de deficiência de um dos seguintes fatores: fator X, fator V, protrombina ou fibrinogênio. Por outro lado, deficiências adquiridas de alguns destes fatores geralmente são acompanhadas por outras anormalidades na via extrínseca ou intrínseca, como ocorre nas hepatopatias, na coagulação intravascular disseminada (CIVD) e na deficiência de vitamina K. Além disso, quando o TP e o TTPA estão prolongados, torna-se importante a realização da dosagem de fibrinogênio e do tempo de trombina (TT), pois pode tratar-se de afibrinogenemia, hipofibrinogenemia ou disfibrinogenemia.

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 clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.
3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar <http://www.fxol.org>.

Referências

1. International Committee for Standardization in Hematology. Thromb Haemostas 1976;36:237-238.
2. NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays; Approved Guideline Fourth Edition. NCCLS document H21-A4, 2003.
3. NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard Fifth Edition. NCCLS document H3-A5, 2003.
4. NCCLS. One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline. NCCLS document H47-A, 1996.

5. CLIA Requirements for Analytical Quality. Disponível em <http://www.westgard.com/clia.htm>.

6. Conway AM, Hinchliffe RF, Finn A, Bell F. Clin. Lab Haem 1999;21:427-428.

7. Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Clinical Chemistry 2005;51:1738-1742.

8. Jacobs DS, DeMott WR, Oxley DK. Laboratory Test Handbook, 5a edição, Lexi-Comp Inc: Hudson (Cleveland), 2001, 328-330.

9. Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
APTT Hemostasis	502-1/4	R11 1 X 4 mL
		R12 1 X 6 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semi-automáticos.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br
Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Fevereiro, 2007
Ref.: 170309

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

ANEXO 07

Artigo Científico

**SECONDARY HEMOSTASIS STUDIES OF CRUDE VENOM AND ISOLATED
PROTEINS FROM *Crotalus durissus terrificus* SNAKE**

Ivancia D. L. Sousa^{a#}; Ayrton R. Barbosa^{a#}; Guilherme H. M. Salvador^b; Breno E. F. Frihling^c;
Paula H. Santa-Rita^c; Micheline A. Lima^a; Andreimar M. Soares^d; Hilzeth L. F. Pessoa^a;
Daniela P. Marchi-Salvador^{a*}

^a Departamento de Biologia Molecular, CCEN, UFPB, João Pessoa, PB, Brazil.

^b Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

^c Biotério da Universidade Católica Dom Bosco, PRPG, UCDB, Campo Grande, MS, Brazil.

^d Fundação Oswaldo Cruz, Unidade de Rondônia, Fiocruz, Porto Velho, RO, Brazil.

* Corresponding author at:

Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN

Departamento de Biologia Molecular - DBM

Laboratório de Cristalografia de Proteínas - CPr-Lab

Campus I - Cidade Universitária

CEP 58051-900 - João Pessoa, PB - Brazil.

E-mail address: danimarchi@dbm.ufpb.br (D. P. Marchi-Salvador).

[#] These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Among the activities triggered by envenoming from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, the coagulant one is intriguing and contradictory because the venom contains in its composition some precursors of coagulation chain and anticoagulant proteins. This work describes, in vitro, the performance of the crude venom and purified proteins from *Crotalus durissus terrificus* snake that plays a role on coagulation factors of the extrinsic, intrinsic and common pathways of human citrated plasma clotting. The coagulant activity and / or anticoagulant crude venom and purified proteins were analyzed directly on citrated human plasma. Changes in Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), and consequently, in the coagulation factors were analyzed using commercial kits. The clot formed by the presence of crude venom and Gyroxin displayed as a hyaline flexible mass, and punctiform distribution. The evaluation of clot formation time in the presence of isolated proteins (Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine) after application of commercial assays (PT and APTT) turned possible to infer that these proteins interfere with all pathways of the coagulation cascade. Such proteins may act similarly to some anticoagulants direct inhibitors of thrombin, Xa factor and antithrombin III activator, thus, inactivating the IXa, Xa XIa, and XIIa clotting factors. Moreover, Crotoxin B can inhibits prothrombinase complex formation by direct interaction with factor Xa. However, regarding ophidism by *C. d. terrificus*, the Gyroxin acts directly in the breakdown of fibrinogen to fibrin and increasing the amounts of the inhibitor of plasminogen activator, which consequently form thrombi. Yet, Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine proteins can act in prothrombinase complex formation or, still causing dysfunction, activation and / or inhibition of natural anticoagulants disturbing hemostasis.

Keywords: Ophidism; Brazilian Rattlesnake; Prothrombin Time; Activated Partial Thromboplastin Time; Anticoagulant Proteins.

1 **Introduction**

2

3 The snake venom consists of a complex mixture comprising pharmacological and
 4 biochemically active substances (proteins, enzymes, peptides and inorganic compounds) which
 5 may have different physiological, hematological and neurotransmitters activities (Melani et al.,
 6 2015). The study of the activity triggered by envenoming, contributes to the discovery of
 7 several molecular mechanisms involved in physiological venom action processes, and enable
 8 the development of new therapeutic agents for the treatment of several diseases (Vieira et al.,
 9 2013; Melani et al., 2015).

10 The symptoms and signs presented by *Crotalus* genus snakebite are both local and
 11 systemic. The local ones can be pain, oedema and haemorrhage, while the systemic ones
 12 include changes in the cardiovascular, respiratory and urinary systems (Bucaretschi et al., 2013).
 13 The venom is composed of proteins that are precursors of coagulation such as Convulxin and
 14 Gyroxin, in addition to other proteins that act systematically as anticoagulants like Crotoxin
 15 complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine (Melani et al., 2015).

16 Coagulopathy or coagulation diseases may be genetic, inherited or acquired, and in
 17 order to be diagnosed, have to be treated appropriately (Chang et al., 2016; Dabiri et al., 2016).
 18 Coagulation tests such as Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time
 19 (APTT) could be applied to identify which clotting factors are compromised and thus
 20 characterize the pathology (Lopes et al., 2005; Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016).

21 The symptoms caused by *Crotalus durissus terrificus* envenoming matches some
 22 symptoms observed in the onset of acquired coagulopathies (Vieira et al., 2013; Bucaretschi et
 23 al., 2002). There are several reports in the literature about Disseminated Intravascular
 24 Coagulation (DIC) disease that are related with the ones caused by ophidism (Han et al., 1996;
 25 Lee et al., 1996; Kin et al., 2008; Maduwage and Isbister, 2014).

The purpose of this study was to describe, in vitro, the performance of the crude venom and purified proteins from *Crotalus durissus terrificus* snake on coagulation factors of the extrinsic, intrinsic and common pathways of human plasma coagulation system.

Materials and methods

Citrated Plasma Human and Coagulation Kits

Blood from healthy volunteers were collected in vacuum tubes containing sodium citrate (1:9). Blood samples were centrifuged and the plasma was obtained. The Committee of Ethics in Research from Health Science Center approved this study under #60251516.0.0000.5188 - Federal University of Paraíba, PB, Brazil.

In order to evaluate the Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time, were used coagulation kits such as PT HEMOSTASIS Ref. 501 (batch #5005) and APTT HEMOSTASIS Ref. 602, made by Labtest Diagnóstica SA, Brazil.

Crude Venom and Isolated Proteins

The crude venom from *Crotalus durissus terrificus* snake was ceded to these studies by the Serpentarium of Don Bosco Catholic University - UCDB, Campo Grande, MS, Brazil and purified proteins from *C. d. terrificus* snake venom, Gyroxin, Convulxin, Crotamine, Crotoxin complex, Crotoxin A and Crotoxin B were provided by the Oswaldo Cruz Foundation - Fiocruz, Rondônia, RO, Brazil.

The Gyroxin was purified using two chromatographic steps: gel filtration on Sephadex G-75 and Benzamidine-Sepharose 6B affinity column according to Seki et al. (1980). The Convulxin, Crotamine and Crotoxin complex were isolated on Sephadex G-75 gel filtration column as described by Toyama et al. (2000). The Crotoxin A or Crotapotin was purified by liquid chromatography using reverse phase C18 column, according to de Oliveira

1 et al. (2003). The Crotoxin B or basic Phospholipase A₂ was isolated by ion exchange
2 chromatography on CM-Sepharose column as described by Soares et al. (1998).

3 The lyophilized crude venom and isolated proteins from *C. d. terrificus* snake were
4 stored at -10°C and, for performing coagulation experiments or analysis of the anticoagulation
5 degree, the samples were solubilized in Phosphate-Buffered Saline (PBS Buffer 10X, pH 7.4)
6 and used immediately. All experiments for evaluating the clotting time or anticoagulation
7 degree were performed in triplicate.

8

9

10 *Coagulant Activity*

11 The evaluation of coagulation activity was performed according to adaptations on
12 methodology previously described by Alvarado and Gutiérrez (1988) using human citrated
13 plasma.

14 In order to conduct the coagulation experiments, human citrated plasma was
15 distributed in each vial and was kept at 37°C. Four different amounts of crude venom from *C.*
16 *d. terrificus* snake (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 µg, solubilized in PBS Buffer) were added separately
17 in each vial and the clot formation time (in seconds) was registered.

18

19 *Prothrombin Time (PT)*

20 The analysis of variation in TP allowed detailing the action of these proteins in the
21 extrinsic and common pathways from the coagulation cascade, or the I, II, V, VII and X factors
22 (Lopes et al., 2005; Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016).

23 To determine the human citrated plasma clotting time following the addition of
24 thromboplastin and calcium at a constant temperature of 37°C and PT HEMOSTASIS clotting
25 assay was used following the methodology proposed by the manufacturer.

26 To evaluate Prothrombin Time, some vials containing citrated human plasma plus
27 PBS Buffer (reference plasma or test control) and some other with isolated proteins were

1 incubated for 120 minutes at 37°C. After the incubation time, the Reagent 1 (thromboplastin
2 extracted from rabbit brain in tricine buffer and calcium chloride) were added in each vial and
3 the timer was triggered. The vials were homogenized and, after nine seconds, observed at
4 intervals of less than one second. The timer was stopped immediately and clot formation time
5 was recorded.

6 The degree of anticoagulation was measured by the Ratio of PT (R) using as a
7 pattern the Equation #1 obtained previously, than were expressed in International Normalized
8 Ratio (INR). The value of INR regarding each R and prothrombin activity (A%) were found in
9 the conversion table that accompanied the PT HEMOSTASIS Ref. 501 (batch #5005) clotting
10 test. The value of INR for healthy people fluctuates between 1.0 and 1.08, which corresponds
11 to 100% of prothrombin activity (WHO, 1999).

12 The reduction evaluation of the value of prothrombin activity (in percentage, rA%)
13 for each sample analyzed was calculated according to Equation #2.

14

15 *Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)*

16 The evaluation of APTT is used to detect the deficiency of coagulation factors
17 related to the intrinsic (VIII, IX, XI and XII) and common (I, II, V and X) pathways of the
18 coagulation cascade (Lopes et al., 2005; Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016).

19 Determination of human citrated plasma clotting time after the addition of calcium
20 in the presence of ellargic acid, at constant temperature of 37°C was performed for APTT
21 HEMOSTASIS clotting assay following the methodology proposed by the manufacturer.

22 In order to evaluate the APTT in both plasma reference (control) and in the
23 presence of isolated proteins were used citrated human plasma plus PBS or isolated proteins
24 and incubated for 120 minutes at 37°C. Once elapsed time of incubation was over, the Reagent
25 1 (ellargic acid and phospholipid from rabbit brain) was added, homogenized and incubated at
26 37°C during 4 minutes. Then calcium chloride was added and the timer was triggered. The
27 vials were homogenized and maintained at 37°C and, after 20 seconds, the vials were observed

at intervals smaller than one second. The chronometer was stopped immediately and the time was marked when clot formation occurred.

Statistical Analysis Data

All results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) and statistically analyzed employing the One-way ANOVA test and p values <0.05 were considered significant (ns: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.0001$ and ****: $p < 0.0001$). All results were evaluated using GraphPad Prism software, version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Crude Venom from Crotalus durissus terrificus snake

The crude venom presented a fast acting coagulant activity in vitro. It was observed that the decreased time, in seconds, to clot formation was inversely proportional to the presence of increasing amounts of crude venom (Fig. 1).

The results of the clotting times by the crude venom presence were compared to the ones obtained by the PT and APTT HEMOSTASIS clotting assays. The clotting time by the presence of 0.5 and 1.0 μg quantities of crude venom were similar to the default values for the APTT and PT HEMOSTASIS clotting assays, and did not represent statistically significant difference. Although, in 2.0 and 4.0 μg measures of crude venom evaluated, the clotting time was significantly lower when compared to the time estimated by conventional clotting assays (Fig. 1).

The physical appearance of clot formed by the presence of crude venom is as a hyaline flexible mass and spot form (Fig. 2b). On the other hand, the clot formed by PT HEMOSTASIS clotting assay was displayed as opaque, rigid and on a stable way (Fig. 2c).

1 The clot punctiform distribution generated by presence of the crude venom enables formation
 2 of small thrombi, which easily adhere to the walls of the vials (in vitro) or inside blood vessels
 3 (in vivo) making possible the cause of blood flow blockage (Fig. 2d).

4

5 *Isolated proteins from Crotalus durissus terrificus Snake Venom*

6 Six proteins purified from the venom of *C. d. terrificus* - Gyroxin, Convulxin,
 7 Crotamine, Crotoxin complex, Crotoxin A and Crotoxin B - were subjected to evaluation of
 8 the coagulant activity against human citrated plasma.

9 The Gyroxin showed plasma coagulation (Fig. 1). The Convulxin induced clot
 10 formation in human citrated plasma only after ten minutes (approximate average of 650
 11 seconds) in all four evaluated amounts. Meanwhile, human citrated plasma in the presence of
 12 other proteins evaluated showed no clot formation even after two hours of incubation at
 13 constant temperature of 37°C.

14 After two hours of incubation of citrated human plasma and proteins isolated from
 15 crude venom of *C. d. terrificus* snake showed no clot formation. Then, a new evaluation took
 16 place to verify if these proteins interfere with prothrombin time (Fig. 3).

17 The degree evaluation of human citrated plasma anticoagulation in the presence of
 18 Crotoxin complex, Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine after two hours of incubation under
 19 constant temperature of 37°C was obtained using Equation #1 and, at the same time, reducing
 20 prothrombin activity (rA%) calculated according Equation #2 (Table 1).

21 All amounts of the evaluated protein showed rA% exceeding 40%. The value of
 22 rA% of human citrated plasma caused by the presence of 0.5µg of Crotoxin A was 39% and
 23 the remaining amounts reached the average of 53%. The analysis of rA% values indicated that
 24 over 1.0µg from Crotoxin A displayed no change in the prothrombin activity. Human citrated
 25 plasma in the presence of Crotoxin B showed higher viscosity. However, no clot formation was
 26 observed. Crotoxin B presented rA% directly proportional to the quantity evaluated. The rA%

1 of human citrated plasma in the presence of Crothamine was above 70% in all measured
2 quantities and showed no dose dependency.

3 Whereas human citrated plasma incubated with Crotoxin complex, in quantity of
4 2.0 and 4.0µg, was more fluid in relation to the plasma only in the presence of PBS Buffer
5 (control), which corroborated with the TP results indicating more than 70% reduction of the
6 prothrombin activity in all quantities evaluated.

7 In order to establish in which coagulation cascade pathway and more specifically
8 in which coagulation factors, the Crotoxin A, Crotoxin B and Crothamine proteins are acting,
9 the activated partial thromboplastin time was measured (Fig. 4).

10 The APTT clotting time was higher than TP clotting time for all proteins evaluated.
11 There was no clot formation caused by APTT HEMOSTASIS coagulation assay in the presence
12 of Crotoxin complex, even after 120 minutes of monitoring. PT and APTT values in the
13 presence of Crotoxin A were altered, however with lower values when compared to other
14 proteins. The APTT values in the presence of Crotoxin B were more significant than the PT
15 values; in larger quantities, APTT values increased by seven times, while TP values doubled.
16 Prolongation of APTT in the presence of Crothamine was directly proportional to the quantity
17 analyzed, while the PT values in the presence of the same protein doubled in all quantities
18 evaluated.

19

20

21 Discussion

22

23 The coagulant activity of the crude venom from *Crotalus durissus terrificus* snake
24 and Gyroxin was analyzed against human citrated plasma and the results allowed assuming
25 that the time to clot formation decreases as the amount of crude venom or Gyroxin were used.
26 This result corroborated with Barrio (1961) reporting that this protein is the toxin responsible
27 for the coagulant activity of venom *Crotalus durissus terrificus* snake.

1 The fact that the clot formed by the crude venom revealed itself more hyaline can
 2 be explained by the presence of Gyroxin in its composition (Barrio, 1961; Seki et al., 1980;
 3 Barros et al., 2011; Melani et al., 2015). The Gyroxin promotes unusual breakage from
 4 fibrinogen to fibrinopeptide A, yielding a soluble form of fibrin more susceptible to the action
 5 of fibrinolytic agents (Barrio, 1961; Seki et al., 1980; Alexander et al., 1988; Barros et al.,
 6 2011). Bucarechi et al. (2002) reported that no partial or total blood clotting observed in severe
 7 cases of rattlesnakes ophidism could be due to the fibrinogen consumption by Gyroxin.

8 On the other hand, the incomplete clotting of human citrated plasma may be related
 9 to venom composition, due to the presence of anticoagulant proteins such as Crotoxin A,
 10 Crotoxin B, Crotoxin complex and Crotamine (Breithaupt et al., 1974; Habermann and
 11 Breithaupt, 1978; Mancin et al., 1998; Toyama et al., 2000; de Oliveira et al., 2003; Vieira et
 12 al., 2013; Melani et al., 2015).

13 According to Weitz et al. (2011), in vitro, blood normally clots in 4-8 minutes.
 14 When citrate is added to prevent the clotting, the recalcified plasma clots in 2-4 minutes.
 15 Whereas ten minutes, at the most, is the time necessary in order to describe a protein as capable
 16 to cause coagulation.

17 Although, Convulxin has induced clot formation, it can not be classified as a
 18 coagulant. This fact corroborates with Polgar et al. (1997) who described the Convulxin as a
 19 potent activator of platelets thrombotic action, but does not interfere with the coagulation
 20 cascade factors.

21 Both, PT and APTT values of human citrated plasma were increased significantly
 22 in the presence of crotalic proteins (Crotoxin A, Crotoxin B and Crotamine), indicating that
 23 these proteins interfere mainly in the common pathway of the coagulation cascade.

24 The Crotoxin A caused less interference in the inhibition of the coagulation cascade
 25 factors when compared to the other proteins studied. In vivo, Crotoxin A is enzymatically
 26 inactive and acts as chaperone of Crotoxin B (Breithaupt et al., 1974; Habermann and
 27 Breithaupt, 1978). The anticoagulant action of this protein can be compared to anticoagulants

selective inhibitors of Factor Xa (Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016). This inhibition could occur when the Crotoxin A binds to the site of antithrombin III and causes a conformational change in this enzyme, similar to the action of fondaparinux drug.

Several studies, such as performed by Diaz et al. (1995) with a basic PLA₂ (myotoxin IV) isolated from *Bothrops asper* snake venom, as well as Kerns et al. (1999) with a basic PLA₂ (CM-IV) isolated from *Naja nigricollis* snake venom, and Mounier et al. (2000) with human group IIA basic PLA₂ (hGIIA) suggested that phospholipases A₂ inhibit prothrombinase complex formation (composed by Va and Xa factors in the presence of Ca²⁺). Such studies have reported that these basic PLA₂s inhibit prothrombinase activity in the absence of phospholipid procoagulant through direct interaction with factor Xa (Diaz et al., 1995; Kerns et al., 1999; Mounier et al., 2000). In addition, Mounier et al. (2001) observed that Crotoxin B shows inhibition of prothrombinase in a similar way of that observed for the myotoxin IV, CM-IV and hGIIA proteins. Our studies presented significant PT and APTT increases of human citrated plasma in the Crotoxin B presence. These changes can be due to modifications caused to the common pathway of coagulation cascade, since this basic PLA₂ can directly interact with factor Xa inhibiting the formation of the prothrombinase complex and, as a consequence, preventing coagulation.

As previously reported, the presence of Crotoxin complex did not promote plasma clotting and therefor caused a significant reduction of prothrombin activity (above 70%) dose dependent manner. These results made possible to compare the anticoagulant activity of this protein with an unfractionated heparin, a potent synthetic drug anticoagulant that activates antithrombin III, which consequently acts on inactivating thrombin and factors IXa, Xa XIa, and XIIa (Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016).

Significant increases of PT and APTT in the human citrated plasma caused by the presence of Crotamine indicates that this protein can act as an analogue anticoagulant hirudin. Hirudin, an acidic polypeptide composed of 65 amino acid residues is described as a direct thrombin inhibitor, for interacting with thrombin, this prevents the activation of fibrinogen and

factor XIII (Weitz, 2011; Armstrong and Golan, 2016). Although Crotamine, a basic polypeptide composed of 42 amino acid residues (Mancin et al., 1998; Toyama et al., 2000) is biochemically distinct from hirudin, structural folding of both polypeptides have three antiparallel beta sheets which can interact, structurally, with thrombin similarly.

However, the analysis of our results allows us to assume that crotalic envenomation can trigger a secondary coagulopathy called Disseminated Intravascular Coagulation (DIC).

DIC is started when Factors III and VIIa are complexed and activate the Factor X, triggering the common coagulation pathway. In common pathway, prothrombin is converted into thrombin (Armstrong and Golan, 2016; Gando et al., 2016; Thachil, 2016). In our analyzes it is suggested that Crotoxin A and Crotoxin complex can operate directly inhibiting Factor Xa, while Crotamine acts as a direct thrombin inhibitor.

The presence of thrombin breaks fibrinogen into fibrin, increasing levels of plasminogen activator inhibitor (PAI) and directly activates the Factors V and VIII (Chang et al., 2016; Armstrong and Golan, 2016; Thachil, 2016). Complementarily, Crotoxin B can replace Factor Va in the normal prothrombinase complex, resulting in an inactive Crotoxin B/FXa complex, preventing the formation of thrombin. Non-activation of plasminogen generates fibrin accumulation (Armstrong and Golan, 2016; Gando et al., 2016; Thachil, 2016). The Crotoxin A, Crotoxin complex and Crotamine proteins can act in dysfunction and/or inhibition of natural anticoagulants, unbalancing hemostasis and resulting in hemorrhagic manifestations. On the other hand, the Gyroxin, a thrombin-like, acts directly in the unusual breakdown of fibrinogen to fibrin (Barrio, 1961; Seki et al., 1980; Alexander et al., 1988; Barros et al., 2011) and increasing the amounts of the PAI, which consequently form thrombi.

When the thrombin formation or its neutralization by antithrombin system are exceeding hemostasis control mechanisms, a paradox is created in which the hemorrhage and thrombosis occur at the same time.

1 **Conclusions**

2

3 The coagulant activity, in vitro, of the crude venom from *Crotalus durissus*
4 *terrificus* snake is caused by the presence of Gyroxin, which promotes the formation of a
5 hyaline mass clot with punctiform distribution and flexible texture.

6 The clot formation times of human citrated plasma in the presence of Crotoxin A,
7 Crotoxin B, Crotoxin complex and Crotamine proteins measured by PT and APTT
8 HEMOSTASIS coagulation assays were altered. This fact allows us to infer that these proteins
9 interfere with secondary hemostasis owing to inhibition of prothrombinase complex formation
10 by direct interaction with factor Xa, also may act similarly to some anticoagulant direct
11 thrombin inhibitors, Factor Xa and antithrombin III activator.

12 The partial or total blood incoagulability observed in severe cases of envenomation
13 by *Crotalus durissus terrificus* snake is triggered by the deregulation of hemostasis due to the
14 action of these proteins that can inhibit thrombin or activate antithrombin III, inactivating
15 coagulation factors IXa, Xa XIa and XIIa.

16 However, in ophidism by *C. d. terrificus* snake, the Gyroxin, a thrombin-like, acts
17 directly in the breakdown of fibrinogen to fibrin and increasing the quantities of plasminogen
18 activator inhibitor (PAI) which consequently form thrombi. Yet, Crotoxin complex, Crotoxin
19 A, Crotoxin B and Crotamine proteins can act in prothrombinase complex formation or, still
20 causing dysfunction, activation and / or inhibition of natural anticoagulants disturbing
21 hemostasis.

22

23

24 **Acknowledgements**

25

26 The authors thank Prof. Dr. Marcos R.M. Fontes for the valuable scientific
27 contribution and by yielding the Laboratório de Biologia Molecular Estrutural for

1 chromatography experiments. This investigation was supported in part by master grant from
2 CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil.

3

4

5 **Conflict of Interest Statement**

6

7 Authors declare no conflict of interest.

ANEXO 08

Comprovante de Submissão do artigo

3/10/2017

A manuscript number has been assigned: TOXCON-D-16-00515

De: "Toxicon" <toxcon@elsevier.com>
Assunto: A manuscript number has been assigned: TOXCON-D-16-00515
Data: Sex, Novembro 11, 2016 5:39 am
Para: danimarchi@dbm.ufpb.br,danimarchi@hotmail.com

Ms. Ref. No.: TOXCON-D-16-00515
Title: SECONDARY HEMOSTASIS STUDIES OF CRUDE VENOM AND ISOLATED PROTEINS FROM
Crotalus durissus terrificus SNAKE
Toxicon

Dear Danimarchi,

Your submission entitled "SECONDARY HEMOSTASIS STUDIES OF CRUDE VENOM AND ISOLATED PROTEINS FROM Crotalus durissus terrificus SNAKE" has been assigned the following manuscript number: TOXCON-D-16-00515.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxcon/>.

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/TOXCON/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Administrative Support Agent [02-Feb-11]
Toxicon
