

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JOSÉ RANIEL ALEXANDRE DE SOUSA

**ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TEMPO PARA A  
AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE TTPA**

Juazeiro do Norte – CE  
2018

JOSÉ RANIEL ALEXANDRE DE SOUSA

**ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TEMPO PARA A  
AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE TTPA**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Prof. Esp. Wenderson Pinheiro de Lima

JOSÉ RANIEL ALEXANDRE DE SOUSA

**ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TEMPO PARA A  
AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE TTPA**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Prof. Esp. Wenderson Pinheiro de Lima

**Data de aprovação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Esp. Wenderson Pinheiro de Lima  
**(Orientador)**

---

Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra  
Centro Universitário Leão Sampaio – UNILEÃO  
**(1º Examinador)**

---

Profª. Ma. Sâmia Macedo Queiroz Mota Castelão Tavares  
Centro Universitário Leão Sampaio – UNILEÃO  
**(2º Examinador)**

## ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TEMPO PARA A AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE TTPA

José Raniel Alexandre de Sousa <sup>1</sup>, Wenderson Pinheiro De Lima <sup>2</sup>

### RESUMO

O estudo teve como objetivo a avaliação da interferência do congelamento e do tempo de armazenamento para a avaliação laboratorial do TTPA. Participaram da pesquisa 30 voluntários, aparentemente saudáveis, do sexo masculino com idade maior que 18 anos da que frequentam o campus saúde, Unileão, na cidade do Juazeiro do Norte - CE, após terem assinado o Termo de Consentimento Pós Esclarecido (TCPE), coletou-se amostras de sangue em tubos contendo citrato de sódio, com o volume de 3,5 ml, através do acesso venoso com seringa e agulha, do total de amostras, três delas se apresentaram hiperlipêmicas, tornando-as inadequadas para a realização do teste, ficando apenas 27 amostras. Logo após a coleta, foram centrifugadas a 2500rpm/10 minutos para a extração do plasma. Foi realizado o teste de imediato para serem usadas como controle. Em relação ao congelamento, foram transferidos 0,5 mL do plasma para um tubo de ensaio de vidro que foi congelado a uma temperatura de 3,7° C em refrigerador e analisado após 24 horas, e congelado por uma semana, após isso os resultados foram obtidos e comparados. Nas análises realizadas em imediato e ao passar 24 horas de congelamento não houve discrepância nos resultados, porém ocorreu diferença significativa quando comparado entre o controle e 1 semana de congelamento com  $p < 0,0001$ . Sendo observado a diminuição dos fatores prolongando o tempo de formação da rede de fibrina. Conclui-se que é aconselhável que seja realizado os testes no mesmo dia em que elas são coletadas para trazer mais confiabilidade aos resultados.

**Palavras-chave:** Citrato de sódio. Herlipêmico. TTPA.

## ANALYSIS OF FREEZING AND TIME INTERFERENCE FOR THE APTT LABORATORY EVALUATION

### ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the interference of freezing and storage time for the laboratory evaluation of APTT. Thirty healthy male volunteers aged 18 and older attending the health campus, Unileão, in the city of Juazeiro do Norte - CE, after having signed the Informed Consent Term (TCP), participated in the study. Blood samples were collected in tubes containing sodium citrate, with the volume of 3.5 ml, through venous access with syringe and needle, of the total samples, three of them being hyperlipemic, making them unsuitable for the test, leaving only 27 samples. Soon after collection, they were centrifuged at 2500rpm / 10 minutes for plasma extraction. The test was performed immediately to be used as a control. Regarding freezing, 0.5 ml of the plasma was transferred to a glass test tube which was frozen at a temperature of 3.7 ° C in the refrigerator and analyzed after 24 hours, and frozen for one week, after which the results were obtained and compared. In the analyzes performed immediately and after 24 hours of freezing there was no discrepancy in the results, but a significant difference occurred when compared between the control and 1 week of freezing with  $p < 0.0001$ . Factor decrease was observed, prolonging the formation time of the fibrin network. It is concluded that it is advisable to carry out the tests on the same day that they are collected to bring more reliability to the results.

**Keywords:** Sodium citrate. Hyperlipemic. ATTP.

<sup>1</sup>Discente do curso de graduação em Biomedicina, UNILEÃO, raniel.alexandre13@gmail.com

<sup>2</sup>Docente da UNILEÃO, wenderson@leaosampaio.edu.br

## INTRODUÇÃO

Os estudos descrevem que a hemostasia se divide em duas partes: primária e secundária. Sendo que na primária ocorre a vasoconstrição, adesão e agregação das plaquetas. Já na hemostasia secundária ocorre a formação da rede de fibrina (BUDAG; CADORE, 2013).

E o exame utilizado para a avaliação da hemostasia é o coagulograma, que é composto pelo Tempo de Sangramento (TS); Tempo de Coagulação (TC); Tempo de Protrombina Ativada (TAP); Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) e Contagem de Plaquetas (AMARAL et al, 2014).

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), é usado para avaliar a hemostasia secundária. O mesmo é utilizado como teste antes de cirurgias, a fim de investigar possíveis coagulopatias ou para monitoramento de heparinoterapia. Na realização do teste, formam-se no tubo de reação, condições para que seja ativada as vias intrínseca e comum da coagulação, determinando o tempo para que ocorra a formação do coágulo a partir do fator XII através da formação de fibrina (MOLINA; JÚNIOR, 2014).

Para realização do teste de TTPA é necessário que a amostra seja coletada, homogeneizada e centrifugada a uma rotação 2500 rpm/10 minutos, que se obterá o plasma. Para se ter uma boa procedência na realização do teste deve-se ter atenção, evitando assim erros na hora de liberação de resultados (PIMENTA; JÚNIOR, 2016).

A solicitação do exame, transporte e conservação do material biológico até a análise compreendem a fase pré-analítica. É importante para a realização do exame tomar cuidado desde o início até o fim, identificando a amostra, realizando a coleta de forma adequada sem traumas, saber se o paciente fez uso de algum fármaco, essas informações são relevantes, com a amostra devidamente identificada evita-se trocas de amostras e laudos errados (PIMENTA; JÚNIOR, 2016).

Alguns laboratórios tomam como medida o congelamento do plasma para posteriormente ser analisado devido ao tempo insuficiente para a análise do material. Estudos relatam que essa medida traz interferências nos testes realizados podendo obter resultados alterados, e conseqüentemente trazer problemas não só para o laboratório como também para o analista.

O presente trabalho teve como objetivo, portanto, observar se ocorrem interferências em relação ao tempo de análise e ao congelamento das amostras de plasma na realização do TTPA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo tratou-se de uma pesquisa quantitativa, longitudinal e prospectiva. Foi realizado no laboratório de bioquímica do Centro Universitário Leão Sampaio, na cidade de Juazeiro do Norte – CE.

Participaram da pesquisa 30 voluntários, aparentemente saudáveis, do sexo masculino e com idade maior que 18 anos. Coletou-se amostras de sangue contendo citrato de sódio, com o volume de 3,5 ml, através do acesso venoso com seringa e agulha.

Foi explicado aos voluntários os objetivos do estudo tendo compreendido as informações, em seguida assinaram o Termo de Consentimento Pós Esclarecido (TCPE). Além disso, a pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e aguarda a aprovação do mesmo, através da Plataforma Brasil, em conformidade com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº466/12 (BRASIL, 2012).

Os testes foram realizados durante os meses de setembro e outubro do ano de 2018. As amostras biológicas, logo após a coleta, foram centrifugadas a 2500rpm/10 minutos para a extração do plasma. Foi realizado o teste de imediato para avaliar o TTPA da amostra que foi usado como controle.

Em relação ao congelamento, foram transferidos 0,5 mL do plasma para um tubo de ensaio de vidro que foi congelado a uma temperatura de 3,7°C em refrigerador e analisado após 24 horas, e congelado por uma semana, foram realizados o testes. Do total de amostras, três delas se apresentaram hiperlipêmicas, tornando-as assim inadequadas para a realização do teste, ficando apenas 27 amostras.

Para as análises estatísticas foi empregado o teste ANOVA associado ao *post hoc* de Dunnet. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças entre médias com  $p < 0,001$ .

Foram incluídas as amostras cuja análise foi possível ser realizada em triplicata ou duplicata. Os dados foram tabulados utilizando o programa *Microsoft Excel® 2007* e para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graph Pad Prism®*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 27 amostras biológicas utilizadas na realização do teste de TTPA, não houve alterações significativas nas amostras congeladas por 24 horas em relação ao controle. Comparando-se o congelamento por uma semana houve alterações significativas. A tabela 1 a seguir mostra os resultados das médias de TTPA de maneira comparativa entre os grupos controle, 24 horas de congelamento e 1 semana de congelamento.

**Tabela 1:** Comparação entre as médias dos grupos controle e 24 horas de congelamento, controle e 1 semana de congelamento.

Detalhes do teste	Média 1	Média 2	Diferença entre as médias	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
Controle vs. 24h	28,79	29,33	-0,5455	-1,388 a 0,2975	0,2546
Controle vs. 1 semana	28,79	55,76	-26,97	-27,81 a -26,13	0,0001

Fonte primária. Teste de comparações múltiplas de Dunnett.

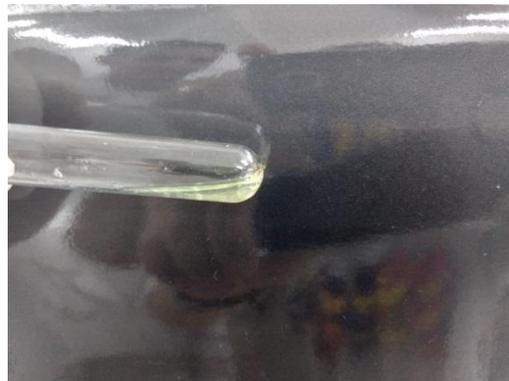
De acordo com Mendes 2016, em um estudo realizado sobre a determinação do tempo de armazenamento para o Tempo de Protrombina (TAP) em diferentes temperaturas, a autora relata que ocorreu uma elevação no tempo da determinação do TAP devido à refrigeração ou o congelamento por 24 horas. Comparando com o presente trabalho, as amostras que foram congeladas por 24 horas para determinação do TTPA não ocorreram diferenças significativas comprando-as com as amostras recém-coletadas. Essa interpretação dá-se devido à semelhança da técnica de TP (tempo de protrombina) e a determinação do TTPA.

Tratando-se das amostras congeladas por 1 semana ocorreu uma diferença significativa em relação ao controle. Em 18,51% das amostras (n=5) foi evidenciado, no fundo do tubo um precipitado logo após o descongelamento em banho-maria a 37° C, diminuindo a quantidade do plasma citratado que foi armazenado, não sendo possível realizar em triplicatas devido a esse fenômeno ocorrido nas mesmas.

**Figura 1:** Amostra com formação de precipitado



**Figura 2:** Amostra com formação de grumos



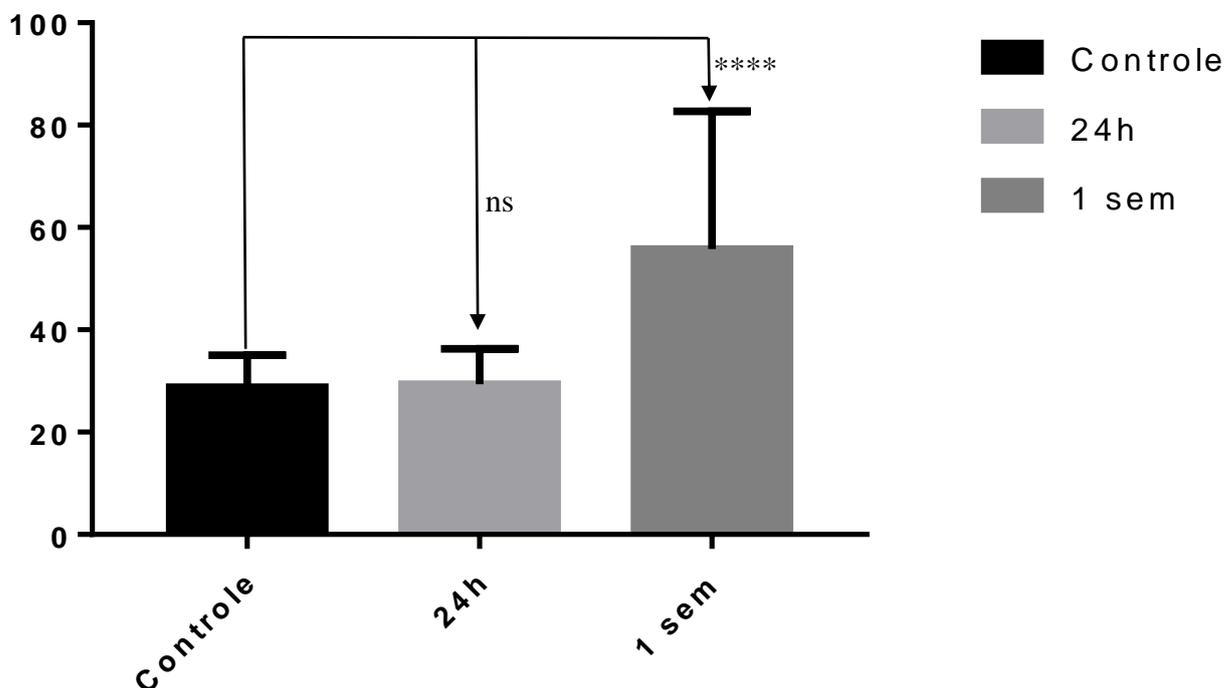
Fonte: Primária.

Acredita-se que este fato tenha ocorrido devido a instabilidade dos fatores da coagulação, principalmente o fator VIII devido ao tempo prolongado quando exposto a baixas temperaturas.

Santiago (2011), ele cita em seu trabalho que o plasma é constituído por água 2%, carboidratos 2%, lipídeos 2% e proteínas 7%. E o plasma é produzido após centrifugação e se congelado até seis horas a partir da coleta a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  pode ser armazenado por um período de um ano, ou, quando congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  por dois anos, caso seja respeitada a temperatura do armazenamento, pode reduzir a perda dos fatores V e VIII da coagulação, que são considerados instáveis.

Devido a essa composição em uma porcentagem maior de proteínas de acordo com o Ministério da Saúde (2010), o crioprecipitado (CRIO) é uma fonte que contém uma variedade de proteínas plasmáticas que apresentam insolubilidade quando expostas a temperaturas baixas entre  $1^{\circ}\text{C}$  e  $6^{\circ}\text{C}$ . Depois de descongelado, o plasma sobrenadante é removido ficando na bolsa apenas proteínas que precipitaram. O que pode justificar a diminuição do volume plasmático, bem como certificar a inconstância da temperatura do congelador de *freezer* doméstico.

**Gráfico 1:** Média do tempo analisado, em imediato, 24 horas após a coleta e 1 semana após a coleta para a realização do TTPA.



Fonte primária. Legenda: ns = não significativo. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

Segundo Ndakotsu et al. (2013), os testes de coagulação devem, ser realizados em um período de 2 h caso as amostras forem mantidas à temperatura ambiente, 4 h em armazenamento de 2 ° e -4 ° C, e por 2 semanas se preservadas a -20° C. O mesmo ainda acrescenta que em estudos foram observados diferentes resultados de estabilidade de TP e TTPA em diferentes condições de armazenamento no plasma.

Para Andrade et al. (2015), o plasma é uma substância importante para obter uma variedade de medicamentos, enfatizando os fatores de coagulação VIII, fator de coagulação IX, fator de von Willebrand, fibrinogênio, quelantes de fibrina, concentrado de complexo protrombínico, albumina e imunoglobulinas. Os medicamentos obtidos pelo fracionamento são chamados de hemoderivados, e o plasma é utilizado como matéria-prima de fracionamento. Ainda em seu trabalho ele relata que quando as amostras citratadas são expostas a um longo período de congelamento ocorre a diminuição dos fatores da coagulação principalmente o fator VIII, por ser um fator lábel da coagulação.

## CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, o congelamento das amostras mostra que, em relação a 24 horas não há diferença significativa, porém quando congelada por 1 semana ocorre uma instabilidade na amostra provocando assim elevação do TTPA na mesma, quando exposta temperatura do *freezer*, não sendo aconselhável o congelamento por um período maior que 24 horas. De preferencia devem ser analisadas no mesmo dia em que é realizada a coleta para ter uma maior confiabilidade nos resultados.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, Cristiane Oliveira Ferreira do, NASCIMENTO, Fábio Michelin do, PEREIRA, Vladimir Doriva, PARIZI, Arlete Gomes Santos, STRAIOTO, Fabiana Gouveia, AMARAL Marcelo Sávio Paiva do. **Bases para interpretação de exames laboratoriais na prática odontológica**. Universidade do Oeste Paulista. São Paulo, 2014.
- ANDRADE, S. B.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R. **Estudo da estabilidade do plasma humano fresco congelado destinada a produção de hemoderivados**. 2013.
- BUDAG, C.C.; CADORE, A.G. **Interferência do transporte e uso de diferentes anticoagulantes na contagem de plaquetas, no volume plaquetário médio (VPM) e no coeficiente de variação do volume plaquetário (PDW)**. 2013.
- Guia para o uso de hemocomponentes**. Ministério da Saúde. Brasília - DF, 2010.
- MENDES, S. R. L. **Avaliação da determinação do tempo de protrombina e da relação normatizada internacional em amostras de sangue conservadas em diferentes temperaturas**. (Monografia de Graduação em Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário Leão Sampaio – Juazeiro do Norte – CE, 2016.
- MOLINA, F. T.; JÚNIOR, G. Z. **Anticoagulantes cumarínicos: ações, riscos e monitoramento da terapêutica**. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, 2014.
- NDAKOTSU, M. A. et al. **Effect of plasma storage on prothrombin time and activated partial thromboplastin time at a Nigerian public laboratory**. Sahel Medical Journal, v 16, 2013.
- PIMENTA, D. Z.; JUNIOR, G. Z. **Principais fatores pré-analíticos interferentes nos exames laboratoriais do coagulograma completo**. Janeiro, 2016.
- RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. **Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes**. Rev. bras. hemater., v. 26, no. 2, p. 126-134, 2004.
- SANTIAGO, K. B. **Monitoramento da qualidade de hemocomponentes produzidos no Hemoceentro da FMB-UNESP**. 2011.