



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: **PT 623213 E**

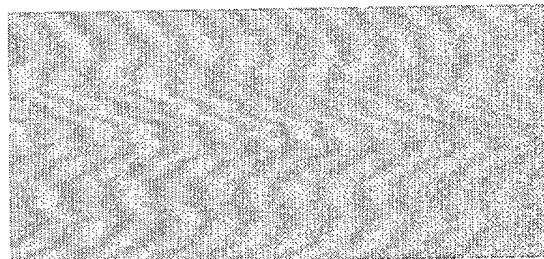
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6 )  
G01N033/48 A G01N003/08 B  
G01N033/49 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) Data de depósito: 1993.01.15</p> <p>(30) Prioridade: 1992.01.17 US 822415 1992.12.01 US 982652</p> <p>(43) Data de publicação do pedido: 1994.11.09</p> <p>(45) Data e BPI da concessão: 2000.05.03</p>	<p>(73) Titular(es): VIRGINIA COMMONWEALTH UNIV. INTEL. PROPERTY FOUND 1101 EAST MARSHALL STR.,MEV CAMPUS,P.O. BOX 980568 RICHMOND, VIRGINIA 23298-0568 US</p> <p>(72) Inventor(es): MARCUS E. CARR, JR. US</p> <p>(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT</p>
---	---

(54) Epígrafe: INSTRUMENTAÇÃO E PROCESSO PARA AVALIAÇÃO DO MÓDULO DE ELASTICIDADE DE COÁGULO DESENVOLVIMENTO DE FORÇA E FLEXIBILIDADE DE ERITRÓCITOS DURANTE A COAGULAÇÃO E DISSOLUÇÃO

(57) Resumo:



## DESCRIÇÃO

### **“Instrumentação e processo para avaliação do módulo de elasticidade de coágulo, desenvolvimento de força e flexibilidade de eritrócitos durante a coagulação e dissolução”**

Este invento relaciona-se, em geral, com a instrumentação de análise do sangue e, mais particularmente, com a instrumentação e técnicas para a monitorização da função de plaquetas e a estrutura de coágulo de uma amostra de sangue e durante tanto a coagulação com a dissolução de coágulo. Além disso, o invento proporciona um novo processo de avaliação da flexibilidade de eritrócitos.

#### Descrição da técnica anterior

A patente US nº. 4 986 964 de Carr e outros descreve um medidor de retracção de coágulo, o qual mede o desenvolvimento de força, durante a retracção de coágulo por intermédio de plaquetas. Este instrumento foi mostrado como sendo um novo medidor da função de plaquetas (ver “Blood Coagulation and fibrinolysis” de Carr e outros, Am. J. of Med. Sci. 302, 13 – 18 (1991), e Carr e outros “Blood” 78, 482, 1991. No entanto, a retracção de coágulo está dependente da estrutura de membrana de plaqueta intacta, da função metabólica normal de plaquetas, da estrutura da fibrina e das interacções normais entre as plaquetas e a fibrina. As alterações na retracção de coágulo são sensíveis a um espectro de anormalidades tanto da fase fluida como das plaquetas. O desenvolvimento de força está completamente dependente da função de plaquetas e se a função das plaquetas é normal ou se não estão presentes plaquetas, o desenvolvimento de força está completamente ausente.

Enquanto o desenvolvimento de força está dependente da função de plaquetas, o grau de deformação de um coágulo de sangue está dependente, em larga medida, da estrutura da fibrina, se a estrutura é muito rígida, como ocorre frequentemente em doenças tais como o melanoma múltiplo, a deformação do coágulo pode ser mínima, mesmo com grande desenvolvimento de força. O módulo de elasticidade de um coágulo de sangue (gel) é uma medição normalmente utilizada da rigidez. Durante anos, os clínicos e os investigadores têm medido o módulo de elasticidade do gel como um quadro da “integridade” do coágulo, que significa uma determinação de se o sangue possui as características estruturais



necessárias para impedir e, eventualmente, parar o fluxo do sangue num sítio de ferimento.

Existem correntemente dois tipos de medições do módulo de elasticidade que são executadas em coágulos de sangue o módulo de tracção (alongamento linear) e o módulo torcional (torção) de coágulos de sangue. As técnicas de medição do módulo de tracção foram descritas em Ferry e outros, J. Am. Chem. Soc. 69, 388 – 400 (1947), Ferry, Adv. Protein. Chem. 4, 1 – 78 (1948) e Ferry e outros, Arch. Biochem. 34, 124 (1945). As medições do módulo de tracção de coágulo foram executadas em coágulos cilíndricos formados em câmaras ou vasos de formação de coágulos e removidos subseqüentemente dos mesmos. Devido à manipulação do coágulo, que é necessária para estes tipos de medições, existe a possibilidade de indução de alterações estruturais irreversíveis no coágulo e, por isso, a alteração, de maneiras desconhecidas, do módulo de elasticidade medido. As técnicas de medição do módulo torcional para os coágulos de sangue foram descritas na patente US 4 317 363 de Shen e Carr, e Shen e outros "Analytic Biochem 72, 202 – 211 (1976). A medição do módulo de elasticidade torcional evita a manipulação do coágulo, pela formação directa do coágulo dentro do vaso, no qual é feita a medição.

As medições de elasticidade podem ser feitas num espectro de espécimes que variam desde soluções purificadas até ao plasma. Infelizmente a interpretação das variações do módulo de elasticidade é difícil em sistemas complexos. As alterações no módulo de elasticidade dos coágulos feitos a partir de soluções de proteínas purificadas reflectem geralmente alterações na estrutura de fibrina. Em sistemas que contêm elementos celulares, tais como eritrócitos e plaquetas, as alterações nos módulos de elasticidade pode resultar da alteração estrutural da fibrina ou da função celular alterada. Uma vez que o módulo de elasticidade é uma função complexa de variáveis múltiplas, a utilidade de uma medição de módulo de elasticidade isolada é limitada. Assim, as medições de módulo de elasticidade não têm sido executadas de modo rotineiro em espécimes do paciente.

Quando ocorre o ferimento de tecidos, a hemorragia é parada e a integridade vascular é restabelecida pela activação do mecanismo hemostático. Uma combinação complexa das interacções de proteínas do sangue e de activações celulares conduz, em primeiro lugar, à formação de um tampão de plaquetas e, subseqüentemente, à produção do coágulo de fibrina e plaquetas. Uma vez que a quantidade de sangue perdido é directamente proporcional ao tempo necessário

para parar a hemorragia, ambos os conjuntos de reacções ocorrem rapidamente. Embora a capacidade para parar a perda de sangue induzida pelo ferimento seja crítica, a capacidade de converter o sangue que flui num sólido é uma fonte de problemas sérios. A formação de coágulo dentro de um vaso conduz à diminuição do fluxo, danos isquémicos e, se o coágulo não é removido, ao eventual enfarte do tecido.

Para evitar a formação de coágulos num tecido não ferido e para evitar a propagação de coágulos a partir do local da ferida para outras localizações dentro do leito vascular, o sistema de coagulação é equilibrado por uma série de inibidores potentes. Para além disso, o próprio coágulo é concebido como um penso temporário. Logo que pára a hemorragia e a reparação do tecido é iniciada, o coágulo é dissolvido pela enzima plasmina.

Em condições normais, o sistema de coagulação permanece num equilíbrio fino. As alterações patológicas do sistema podem induzir o risco de hemorragia ou aumento do potencial de trombose. Um exemplo do anterior pode ser a doença de hemorragia da hemofilia, a qual resulta de um nível baixo do Factor VIII, uma proteína de coagulação do sangue. Um exemplo deste último, pode ser a trombose venosa recorrente em indivíduos que têm níveis diminuídos do inibidor de coagulação antitrombina III. Os pacientes com capacidade diminuída para a remoção de coágulos, potencial fibrinolítico diminuído, correm também o risco de trombozes.

Correntemente, a avaliação dos pacientes com risco de hemorragia aumentado é conseguido através de testes de crivação de coagulação. O tempo de protrombina (PT) e o tempo de protrombina parcial (PT) identifica pacientes com risco de hemorragia e orienta o clínico para testes mais específicos, para definir a causa do aumento de risco. Se o PT é prolongado (isto é, leva mais tempo a coagular do que o plasma normal), o paciente apresenta um risco aumentado de hemorragia. Uma vez que se sabe que os prolongamentos do PT ocorrem em deficiências de factores específicas, os níveis de factores apropriados podem ser medidos, de modo a definirem a anormalidade. Infelizmente, os testes de crivagem relativos ao potencial fibrinolítico não estão presentemente disponíveis. Para além disso, os testes que identificam pacientes em risco de trombose, devido à capacidade diminuída para dissolver coágulos, não têm sido relatados e não se encontram em utilização.



A dissolução de coágulos pode ser monitorizada, utilizando medições de densidade óptica ou pela medição de material radioactivo libertado a partir do coágulo. A técnica da densidade óptica baseia-se no facto de que a formação de coágulo aumenta a turvação da amostra de plasma, enquanto que a dissolução dos coágulos diminui a turvação de novo para os valores da linha de base, anteriores ao coágulo (ver Carr e outros, "Thromb. Haemostas. 67, 106 - 110 (1992). Nesta técnica, a coagulação é monitorizada como um aumento na turvação, enquanto a dissolução do coágulo é vista como uma queda da turvação do coágulo. A técnica do traçador radioactivo envolve a adição de proteína de coagulação com marcador radioactivo, por exemplo, fibrogénio com marcador de  $^{125}\text{I}$ , à amostra do paciente (ver Carr e outros, Thromb Haemostas. 67, 106 - 110 (1992) e Knight e outros, Thromb Haemostas. 46, 593 - 596 (1981). À medida que ocorre a coagulação, o fibrogénio com marcador é incorporado na estrutura do coágulo. Durante a dissolução subsequente do coágulo, são libertos os fragmentos radioactivos. A velocidade da libertação de radioactividade é proporcional à velocidade de dissolução do coágulo.

Um grande problema com a técnica da turvação é que a mesma não pode ser utilizada em sistemas que contêm eritrócitos. Um grande problema com a técnica do fibrogénio marcado é a necessidade de utilização de material radioactivo. Para além disso, foi observada divergência de resultados com as duas técnicas. Quando a dissolução é rápida, ambas as técnicas produzem tempos de dissolução comparáveis. No entanto, quando a dissolução é demorada, os tempos de dissolução medidos pela técnica da turvação tendem a ser mais longos do que os medidos pela libertação do  $^{125}\text{I}$  (ver Carr e outros, Thromb Haemostas. 67, 106 - 110 (1992).

Pensa-se que a deformabilidade alterada dos eritrócitos desempenha um papel em múltiplos processos de doença. Infelizmente, a medição da flexibilidade dos eritrócitos permanece algo problemática. Correntemente, a maioria dos investigadores utilizaram técnicas de filtração de eritrócitos para medir a flexibilidade. A característica comum destes processos é o fluxo dos eritrócitos através de filtros que têm poros tipicamente de tamanho uniforme. Os eritrócitos fluem quer com passagem a baixa pressão (por exemplo, uma coluna estática de sangue) quer com passagem forçada a altas pressões. Os resultados são relatados como um "índice de filtração". As técnicas de filtração têm diversas deficiências principais. Em primeiro lugar, as mesmas são de difícil reprodução. Os resultados variam de laboratório para laboratório e podem variar ao longo do tempo no mesmo



laboratório. Em segundo lugar, as mesmas não conseguem ter em conta a possibilidade dos canais microvasculares poderem ser flexíveis. Em terceiro lugar, as mesmas ignoram as possíveis contribuições do sistema de coagulação. Um outro processo de medição da flexibilidade dos eritrócitos anterior é denominado ectocitometria. Este processo envolve a deformação das células em campos de corte com a monitorização simultânea da alteração da forma. A ectocitometria tem a vantagem de não ser um processo de fluxo de monitorização da flexibilidade dos eritrócitos, no entanto, a mesma é indirecto, caro e não amplamente disponível. Tendo em vista o mencionado atrás, devia ser vantajoso ter um processo barato e reproduzível de avaliação da flexibilidade dos eritrócitos.

#### Sumário do invento

É um objecto do invento proporcionar instrumentação e um processo para fazer uma nova medição do módulo de elasticidade em amostras de sangue, chamado módulo de elasticidade de "compressão".

É um outro objecto deste invento proporcionar um aparelho e técnica para utilização da mesma amostra de sangue para medir o desenvolvimento de força por intermédio de plaquetas e o módulo de elasticidade de coágulo.

É um outro objecto deste invento proporcionar um processo superior de monitorização da destruição de coágulo do que os das técnicas de turvação e radioactividade, descritos na arte anterior.

É um outro objecto deste invento proporcionar instrumentação e um processo para a obtenção de medições quantitativas tanto no desenvolvimento da estrutura de coágulo como na dissolução de coágulo na mesma amostra de sangue.

É ainda um outro objecto deste invento proporcionar instrumentação e um processo para avaliação da flexibilidade dos eritrócitos.

Estes objectos são satisfeitos pelo invento, tal como definido nas reivindicações independentes.

De acordo com o invento, são executados medições do desenvolvimento de força e do módulo de elasticidade numa amostra de sangue posicionada entre um

par de placas espaçadas entre si, uma das quais está ligada a um transdutor. A retracção do coágulo, a qual é a força de tracção exercida pelo coágulo de sangue para movimentar as duas placas em conjunto, durante a coagulação, está directamente relacionada com a saída do transdutor. O módulo de elasticidade de compressão de coágulo é equivalente ao módulo de elasticidade de tracção e é determinado como uma função da saída do transdutor, quando as duas placas são comprimidas entre si com um valor de força fixo. As medições de retracção de coágulo e de módulo de elasticidade de coágulo são utilizadas para identificação da formação e dissolução de coágulo, bem como para determinar a flexibilidade dos eritrócitos. As experiências que utilizam um agente, o qual induz fibrinólise mostram que a destruição de coágulo pode ser facilmente identificada a partir de uma queda dramática no desenvolvimento de força (retracção de coágulo) e uma diminuição dramática do módulo de elasticidade do coágulo. As experiências conduzidas utilizando eritrócitos normais e em forma de crescente mostram um efeito que pode ser medido sobre o módulo de elasticidade do coágulo.

#### Breve descrição dos desenhos

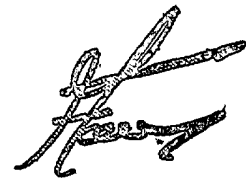
Os objectos, aspectos e vantagens anteriores e outros serão melhor compreendidos a partir da seguinte descrição pormenorizada das concretizações preferidas do invento com referência aos desenhos, nos quais:

a Figs. 1a e 1b são um desenho esquemático de um medidor de retracção de coágulo semelhante ao descrito na patente US 4 986 964 de Carr e outros e uma vista ampliada da configuração de detectores para o medidor de retracção de coágulo, respectivamente;

a Fig. 2 é um gráfico de uma curva da força de calibração, em que a saída de voltagem de um transdutor é traçada em função do deslocamento de uma placa;

a Fig. 3 é um gráfico que mostra os dados em bruto, obtidos utilizando a instrumentação das Figs. 1a e 1b, em que uma força conhecida é aplicada de modo intermitente tanto na formação como na dissolução de coágulo e é detectada a deflexão da caneta da impressora gráfica em relação ao tempo;

a Fig. 4 é um gráfico que mostra os dados processados a partir da Fig. 3, em que uma curva superior de ponta reflecte a aplicação da força aplicada



externamente e uma curva inferior suave reflecte as forças internas desenvolvidas a partir de dentro do coágulo;

a Fig. 5 é um gráfico que traça a força em função do tempo através de toda a formação e dissolução de coágulo;

a Fig. 6 é um gráfico que traça o módulo de elasticidade em função do tempo através de toda a formação e dissolução de coágulo;

a Fig. 7 é um gráfico que traça a carga em voltagem para a força aplicada em relação ao tempo; e

as Fig. 8a a 8c são gráficos que mostram o desenvolvimento do módulo de elasticidade durante a coagulação para o plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma rico em plaquetas (PRP) e sangue completo, respectivamente.

#### Descrição pormenorizada das concretizações preferidas do invento

Com referência aos desenhos e, em particular, às Figs. 1a e 1b, é mostrado um medidor de retracção de coágulo modificado, semelhante ao descrito na patente US 4 986 964. Uma amostra de sangue (gel) 8 é posicionada no espaço de gel 10, entre uma taça com termostato inferior 12 e uma placa superior 14. A amostra de sangue 8 pode ser sangue completo, plasma, plasma rico em plaquetas (PRP) ou plasma pobre em plaquetas (PPP), etc. Podem ser utilizados vários elementos diferentes para o controlo termostático. A Fig. 1 mostra apenas um exemplo em que o fluido que flui através de uma camisa de água 16 mantém a temperatura da amostra de sangue 8. A manutenção da temperatura a ou à volta da temperatura do corpo (35 a 38°C) e o controlo do micro-ambiente produz resultados reprodutíveis para as medições da retracção de coágulo. As condições micro-ambientais da amostra de sangue 8 são, aproximadamente, o pH 7,4, a resistência iónica de, aproximadamente, 1,0 a 2,0, e a concentração de iões de cálcio de 5mM a 10 mM. Para evitar a evaporação da amostra de sangue 8, durante o ciclo de medição, a interface de ar e coágulo 18, entre a placa superior 14 e a taça inferior 12 deve ser coberta com óleo de silicone ou qualquer outro material adequado.

Durante a coagulação, as plaquetas dentro da amostra de sangue 8 aderem ao fundo da taça 10 e à placa 14 e exercem uma força de tracção para baixo. Um braço de acoplamento 20 liga a placa superior 14 a um transdutor 22. O movimento

da placa 14 para a taça 10 sob a influência da retracção do coágulo exerce uma tensão sobre o transdutor 22, o qual faz sair uma voltagem, a qual é proporcional à força exercida pelas plaquetas durante a retracção do coágulo. Esta voltagem pode ser enviada por ligações de fio 24 para um amplificador e os sinais amplificados podem ser traçados numa impressora gráfica ou feitos sair num tubo de raios catódicos (CRT) ou noutro dispositivo de saída. O transdutor 22 pode ser um medidor de tensão GRASS, modelo FT03 disponível na GRASS Instrument Company de Quincy, Mass.. ou qualquer outro dispositivo adequado.

A fig. 2 mostra que existe uma relação linear entre a deslocação da placa superior 14 para a taça inferior 12 e a saída do transdutor 22. Portanto, a força de tracção para baixo, exercida durante a retracção de coágulo pode ser simplesmente determinada pela comparação da saída dos sinais do transdutor 22, quando a amostra de sangue está a coagular com a saída dos sinais do transdutor 22, quando diferentes pesos calibrados são suspensos do transdutor 22. A inclinação inversa da linha, na Fig. 2, serve como uma constante de calibração de deslocação (Cd), pelo que as voltagens desenvolvidas durante a retracção de coágulo podem ser convertidas directamente em medições de força pela multiplicação das mesmas pela constante de calibração de força.

Com referência de novo às Figs. 1a e 1b, pela aplicação da força 26 à placa superior 14, a qual pode ser pela aplicação de peso ou por outros meios, a amostra de sangue 8 entre a placa superior 14 e a taça inferior 12 pode ser comprimida. O grau de deflexão da placa superior 14 para a taça inferior 12 provocada pela aplicação da força é detectada pelo transdutor 22, o qual fornece uma saída de voltagem. Com o conhecimento do valor de força aplicado e pela detecção do grau de deslocação da placa superior 14 para a taça inferior 12 sob a influência da força aplicada, pode ser calculado o módulo de elasticidade de coágulo da amostra de sangue. O inventor verificou que a compressão de um coágulo de sangue entre um par de placas é directamente semelhante à tracção em extremidades opostas do coágulo de sangue, como é feito nas medições do módulo de elasticidade à tracção tradicionais, devido à força, em cada caso, ser igual (por exemplo, um peso assente no topo de uma amostra exerce a mesma força na amostra do que um peso suspenso a partir da amostra). Por conseguinte, este invento contempla a determinação de um módulo de elasticidade de "compressão" de uma amostra.

Por conseguinte, uma vantagem particular desta instrumentação é que, tanto o módulo de elasticidade do coágulo como o desenvolvimento de força, podem ser

determinados para a única amostra de sangue. O módulo de elasticidade do coágulo é uma medida da estrutura de coágulo e o desenvolvimento de força é uma medida da função das plaquetas. Um outra vantagem chave deste invento é que o módulo de elasticidade do coágulo e o desenvolvimento de força podem ser monitorizados numa amostra de sangue durante tanto a formação de coágulo como na dissolução de coágulo. Os dados gerados são tanto quantitativa como fisicamente bem definidos. A força é medida em dyne e o módulo de elasticidade é relatado em  $\text{dyne/cm}^2$ . As medições podem ser feitas em amostras de sangue completo, plasma pobre em plaquetas (PPP), ou plasma rico em plaquetas (PRP), etc.

Para fins de exemplo, a seguinte análise de processo e dados ilustra a utilidade deste invento na monitorização do módulo de elasticidade de coágulo e o desenvolvimento de força durante a coagulação e a dissolução.

#### Processo 1

O sangue do paciente é obtido por picada na veia e é recolhido em citrato de sódio (0,38%), o qual serve como um anticoagulante. Dois milímetros (ml) da amostra de sangue 8 (por exemplo, sangue completo) são colocados na taça de amostra com termostato. No instante zero, a  $\alpha$ -trombina humana ( $1\text{NIH}\mu/\text{ml}$ ), a qual é o agente coagulante, e o activador de plasminogénio de tecido humano (tPA) (50 IU/ml), o qual é um agente de dissolução de coágulo, são adicionados simultaneamente à amostra de sangue 8. Outros agentes de coagulação e agentes de dissolução podem ser também utilizados dentro da prática deste invento, incluindo a tromboplastina de tecido, veneno de víbora de Russel, Reptilase, bitroxobina (bem como outras enzimas de veneno de cobra) como agentes de coagulação e incluindo a prouroquinase, uroquinase, Reptilase, a estreptoquinase (bem como as suas espécies modificadas, por exemplo, as formas acetiladas, etc.), como agentes fibrinolíticos (de dissolução de coágulo). A placa superior 14 é baixada para a posição. O óleo de silicone é disposto em camadas na interface de sangue e ar 18. Os sinais do transdutor 12 são registados através de toda a coagulação e dissolução.

Cada trinta segundos, é aplicada uma força para baixo a um coágulo em formação. Numa operação preferida, a força produz pequenas deslocções para baixo da placa superior 14. A deflexão da placa superior 14 para a taça inferior produz um potencial de voltagem, o qual é registado numa impressora gráfica X-Y.

A grandeza da voltagem é directamente e linearmente proporcional à quantidade de deslocamento da placa superior 14.

À medida que a coagulação prossegue, a estrutura torna-se mais rígida e o valor de deslocamento para um dada força diminui. A rigidez ou integridade estrutural pode ser quantificada como o módulo de elasticidade do coágulo. O módulo é simplesmente a relação entre o esforço aplicado e a tensão produzida. Neste caso, o esforço é a força aplicada e a tensão é a quantidade de deflexão da placa superior 14. Ambos os parâmetros são conhecidos e o módulo de elasticidade é calculado para cada ponta de voltagem.

O tPA adicionado à amostra de sangue 8 parte o plasminogénio pró-enzima na sua forma activa de plasmina (ver, Lijnen, Semin. Thromb. Hemostas. 8; 2 – 10 (1982). Outros agentes de dissolução podem ter um efeito semelhante. Esta activação é grandemente aumentada na presença da fibrina, a qual se forma durante a coagulação. Uma vez activada a plasmina quebra a fibrina em locais múltiplos (ver, Francis, J. Clin. Inves. 66, 1033 – 1043 (1980) e Marder, Ann NY Acad. Sci. 408, 397 – 406 (1983). À medida que as fibras de fibrina estão parcialmente fora de pontos múltiplos ao longo do seu comprimento, a integridade estrutural da rede (coágulo) fica cada vez mais comprometida e o módulo de elasticidade declina. Em algum ponto, o coágulo cai simplesmente, o módulo de elasticidade cai para zero e as deflexões produzidas pela força aplicada voltam para o seu valor anterior à coagulação. O instante, no qual o módulo de elasticidade cai para a linha de base pode ser definido como o " tCLT" para o "tempo de lise de coágulo tPA induzido".

#### Análise de dados 1

A Fig. 3 é um exemplo dos dados em bruto, obtidos quando é aplicada uma força intermitentemente à placa superior, à medida que é formado um coágulo e é dissolvido, como descrito no processo explicado atrás. Neste caso o sangue completo com citrato coagulou com trombina (1 $\mu$ /ml) e cálcio (10mM), os quais foram adicionados no instante igual a zero. O activador de plasminogénio de tecido (tPA) foi também adicionado no instante zero para induzir a subsequente dissolução do coágulo. As deflexões para cima da curva representam a transmissão de força para o transdutor. O aumento gradual geral e subsequente queda da curva é devido às forças geradas dentro do coágulo. As pontas sobrepostas na curva suave são o resultado das forças externas aplicadas ao

coágulo. Especificamente, as pontas resultam da aplicação intermitente do peso ou de outro valor conhecido da força à placa superior.

A Fig. 4 representa um traçado da saída de voltagem em relação ao tempo, a qual é derivada dos dados em bruto, mostrados na Fig. 3. Como estabelecido na Equação 1, a deflexão da impressora gráfica x-y, mostrada na Fig. 3 é convertida em voltagem com base no ganho constante da impressora gráfica.

$$\text{(Voltagem)} = \text{(Deflexão)} \times \text{(Constante de ganho)} \quad \text{Eq. 1}$$

No caso representado na Fig. 3, cada bloco era igual a 2 mV e uma conversão simples produz a curva de pontas superior, exibida na Fig. 4.

Também mostrada na Fig. 4 está a curva inferior suave, que reflecte as forças que são originadas a partir de dentro do coágulo. Ao contrário a curva superior com pontas é produzida pelas forças exteriores (por exemplo, o peso aplicado de modo intermitente). Com referência à curva inferior suave, pode ser observado que existe período de retardo curto, seguido por uma deflexão para cima em degrau, um patamar subsequente e finalmente um declive gradual.

Os dados da curva inferior suave podem ser convertidos em medições de força verdadeiras, utilizando a informação concorrente dos dados de "pontas" da curva superior. Cada ponta representa a quantidade de voltagem gerada por uma força conhecida. Uma vez que a saída do transdutor é linear em relação à força, a relação entre a voltagem de saída e a força fornece uma constante para conversão dos dados da Fig. 4 nas medições de força mostradas na Fig. 5. É possível aplicar uma força conhecida no final da retracção do coágulo em vez de intermitentemente, no entanto, um tal processo deve apenas aproximar a força com base na estrutura final de coágulo e pode tender a provocar uma sobrestima do desenvolvimento de força mais cedo. Ao contrário, uma técnica, a qual tem a aplicação intermitente de uma força conhecida mede a estrutura de coágulo em cada ponto do tempo. Esta informação permite que a força "verdadeira" seja calculada. À medida que a formação do coágulo se aproxima da finalização, ambas as técnicas produzem os mesmos resultados.

A Fig. 5 mostra que a amostra de sangue sofre uma fase de retardo curta, seguida pelo rápido desenvolvimento de força. No entanto, apesar dos dados de voltagem mostrados na Fig. 4, a Fig. 5 revela que a transmissão da força não forma

patamar. A seguir a um período de declínio gradual (600 a 1600 segundos) a transmissão de força cai precipitadamente para valores próximos da linha de base. A fase de retardo corresponde ao tempo requerido para a montagem da fibrina, fixação das plaquetas e a geração de uma rede de resiliência mecânica adequada, para permitir a transmissão das forças à placa superior. A ponta para cima rápida (período de tempo A) é devida às forças geradas pelas plaquetas durante a retracção do coágulo, em que as plaquetas exercem uma força de tracção na placa superior para a taça inferior. O declínio gradual na força, que começa aos 600 segundos (período de tempo B), resulta de um enfraquecimento gradual da rede do coágulo durante a fibrinólise por intermédio de plasmina. A aproximadamente 1600 segundos, ocorre o colapso total da rede, que resulta numa queda catastrófica na força de transmissão (período de tempo C).

A relação entre a força aplicada e a deformação induzida no material é o módulo de elasticidade de um material. Os materiais que resistem à deformação têm um alto módulo de elasticidade. Neste processo, uma força conhecida (ESFORÇO) é aplicada na superfície superior do coágulo e é medida a quantidade de deformação (TENSÃO). A equação 2 mostra que o módulo de elasticidade é simplesmente a relação entre o ESFORÇO e a TENSÃO.

$$\text{Módulo de elasticidade (EM)} = \text{ESFORÇO/TENSÃO} \quad \text{Eq. 2}$$

O esforço é tipicamente definido como a força por unidade de superfície (equação 3).

$$\text{Esforço} = \text{Força aplicada} / \text{Superfície aplicada} \quad \text{Eq. 3}$$

No caso presente, a força aplicada é um peso normalizado de massa (m) conhecida, g é a constante da gravidade, e a superfície de aplicação é simplesmente a superfície da placa superior 14. Uma vez que a placa superior é circular com um raio de (r), o esforço é indicado simplesmente pela equação 4

$$\text{Esforço} = (mg) / \pi r^2 \quad \text{Eq. 4}$$

A tensão é o grau da alteração de forma induzida pela força aplicada. No caso presente, a dimensão de gel inicial (L) no eixo da força aplicada é simplesmente a distância entre a taça 12 e a placa 14. A quantidade de deformação é simplesmente

a distância percorrida (s) pela placa superior 14, quando é aplicada a força. Portanto, a equação 5 mostra que o esforço pode ser calculado como se segue:

$$\text{Tensão} = s / L \quad \text{Eq. 5}$$

Assim o módulo de elasticidade pode ser facilmente calculado utilizando a equação ou 6 ou 7

$$\text{Módulo de elasticidade} = [(mg)/(\pi r^2)]/(s/L) \quad \text{Eq. 6}$$

$$\text{Módulo de elasticidade} = [g/(\pi r^2)]*(mL/s) \quad \text{Eq. 7}$$

em que g é igual a 980 g/s<sup>2</sup> e  $\pi$  é igual a 3,14159.

As outras constantes são uma função da instrumentação empregue. Por exemplo, o raio r da placa superior pode ser 1 ou mais centímetros (os bons resultados foram obtidos com r = 1,75 cm), m é simplesmente a massa do peso aplicado e pode ser 2 g, 5 g, etc.. L é o intervalo entre a taça 12 e a placa 14 e estabelecido tipicamente na ordem dos milímetros (os bons resultados foram obtidos quando L = 2 mm) e s é a distância de deflexão da placa 14 para a taça 12. Como explicado atrás, uma vez que o transdutor 22 é um transdutor de deslocamento, a voltagem gerada pelo transdutor é uma função linear da distância (deflexão) percorrida pela placa superior 14 para a taça 12.

A equação 8 refere-se à saída de voltagem em relação à distância(s) percorrida(s) pela placa superior

$$\text{Voltagem} = s / Cd$$

Cd é uma constante de calibração de deslocação (ver a Fig. 2 atrás, em que Cd é inclinação inversa da linha da Fig. 2), a qual se refere à deslocação da placa 14 em relação à saída de voltagem do transdutor. A curva mostrada na Fig. 2 pode ser gerada pelo movimento da placa 14 de uma distância conhecida para a taça e a detecção da saída de voltagem do transdutor 22. A inclinação da curva que resulta produz a constante de calibração de força Cd. No instrumento utilizado nas experiências descritas atrás, Cd era igual a 3,85\*10<sup>-4</sup> mm/mV. Assim, as equações 9 e 10 podem ser utilizadas para calcular o módulo de elasticidade (EM)



$$EM = [(g)/(\pi r^2)][(ml)/(VCd)] \quad \text{Eq. 9}$$

$$EM = [(mg)/(\pi r^2)](1/V) \quad \text{Eq. 10}$$

A Fig. 6 mostra o módulo de elasticidade em função do tempo, para a amostra de sangue, através de todas as fases de coagulação e de dissolução, em que o módulo de elasticidade era calculado utilizando as equações atrás e os dados de voltagem e de força fornecidos nas Figs. 4 e 5. Existem dois problemas com o esquema de cálculo explicado atrás, para o qual o ajustamento é necessário. Em primeiro lugar, o próprio transdutor tem propriedades elásticas. Em segundo lugar, o fluido não coagulado na taça de amostra exerce uma força de flutuação sobre a placa superior. Assim, mesmo na ausência de uma coágulo, é medido um módulo de elasticidade substancial. Este problema é evitado pela atribuição arbitrária de um valor de zero à medição do módulo de elasticidade inicial. Isto é inteiramente razoável, uma vez que o módulo de elasticidade da água é zero. A "Reposição em zero" do sistema no início da medição, contrabalança efectivamente as influências das propriedades de elasticidade inerentes do aparelho. Portanto, o excesso de módulo de elasticidade gerado durante a coagulação e eventos subsequentes é medido após a "Reposição em zero". O efeito da reposição em zero do sistema é visto como um deslocamento entre as linhas a cheio e a tracejado na Fig. 6.

A Fig. 7 mostra outros meios, pelos quais a dissolução de coágulo pode ser facilmente identificada. Especificamente, o efeito da fibrinólise na estrutura do coágulo é facilmente apreciada pelo exame dos dados de ponta em função do tempo. Cada ponta representa a quantidade de deflexão para baixo da placa superior, quando é aplicada uma força normalizada. A força aplicada é a mesma para cada ponta. Durante o período de tempo A, a formação da rede de fibrina prossegue e a resistência mecânica do gel aumenta. Como uma consequência, a resistência do gel à deformação aumenta e a quantidade de deflexão da placa superior diminui. Isto é facilmente apreciado na Fig. 7, em que o ponto inferior dos dados de ponta foram normalizados para zero. Durante o período de tempo B, a rede de fibrina é gradualmente enfraquecida pelas quebras de cordão de fibra induzido pela plasmina. Isto é visto como um aumento gradual na quantidade de deflexão em função do tempo. A aproximadamente 1600 segundos, começando o colapso da rede a ocorrer e a resistência à deformação declina rapidamente com o retorno a valores de deflexão de novo aos níveis de coagulação anteriores.



Uma vantagem particular da técnica presente é que o desenvolvimento de força e o módulo de elasticidade de uma única amostra de sangue podem ser determinados através de todos os estágios de tanto coagulação de sangue como de dissolução de coágulo. Assim, a instrumentação e a técnica de análise deste invento permite que uma única amostra de sangue completo (ou de plasma) seja utilizada para proporcionar informação acerca do tempo de coagulação (fase de retardo), da função das plaquetas (desenvolvimento de força), e adequabilidade da estrutura de coágulo (módulo de elasticidade). Como explicado atrás, a força "verdadeira" é calculada pela aplicação periódica de um peso à amostra de sangue através de todo o ciclo de coagulação. Esta aplicação periódica do peso e o ciclo de cálculo tem em conta o facto do módulo de elasticidade da amostra de sangue se alterar durante a coagulação. Portanto, o desenvolvimento de força durante os estados anteriores da coagulação é determinado com mais precisão.

Uma outra vantagem particular da presente técnica é que o potencial fibrinolítico do sangue do paciente pode ser facilmente identificado. Especificamente, proporcionando a amostra de sangue com tPA, o período de tempo para a dissolução de coágulo pode ser determinado. Pela comparação do tempo para a dissolução do coágulo com a resposta determinada para as amostras de sangue normais, os pacientes em risco de trombose devido a uma capacidade diminuída de dissolver os coágulos podem ser identificados e tratados. Outros agentes de dissolução de coágulos podem ser também utilizados. Tudo o que deve ser necessário é determinar um tempo de dissolução normalizado para o sangue normal, de modo que quando o tempo de dissolução para uma amostra em teste se afasta para além de um período normal, o sangue do paciente pode ser identificado como tendo o potencial fibrinolítico reduzido. Esta medição não estava disponível para o sangue completo antes do desenvolvimento deste instrumento e análise técnica.

Um outro aspecto deste invento refere-se à medição da deformabilidade ou flexibilidade dos eritrócitos. A flexibilidade dos eritrócitos é um parâmetro importante em doenças tais como a drepanocitose.

Existe uma evidência crescente de que o sistema de coagulação é activado na drepanocitose. Os marcadores da activação das plaquetas, tais como o factor de plaquetas 4 e a beta-tromboglobulina são elevados. O nível de fibrinogénio na drepanocitose em estado estável e aumenta mesmo para níveis mais elevados durante a crise vaso-oclusiva. Os marcadores de activação da trombina, tais como



o fragmento de protrombina II e a geração de fibrina, tal como o fibrinopéptido A são elevados na drepanocitose. Os níveis dímero D que indicam a deposição e a subsequente dissolução da fibrina reticulada estão rotineiramente elevados na drepanocitose apresentam um pico durante a crise vaso-oclusiva. Enquanto os níveis de alguns coagulantes são elevados, os níveis de anticoagulantes naturais, incluindo o ATIII, a proteína C e a proteína S estão diminuídos na drepanocitose. Finalmente o plasma da drepanocitose contém espículas prothrombicas da membrana dos eritrócitos SS. Estas espículas de conformação fosfolipídica alterada mostraram aumentar a coagulação em ensaios tais como o teste do veneno de víbora de Russell. Em resumo a drepanocitose é um estado caracterizado pela elevação da circulação de procoagulantes de depressão de certos factores de coagulação dos anticoagulantes naturais e a evidência laboratorial da activação dos coagulantes tanto de plaquetas como da fase fluida. Se e o componente patogénico activo do epifenómeno simples, ocorre a activação do processo hemostático na drepanocitose.

O papel da coagulação em eventos de coagulação vaso-oclusivos continua por ser definido. Com base nas descobertas de laboratório apresentadas atrás, alguns investigadores classificaram a drepanocitose como um estado crónico DIC. Se a coagulação é um componente do processo macrovascular envolvido na crise vaso-oclusiva, as interacções entre a fibrina e os eritrócitos podem ser importante. A diminuição ou a ausência do fluxo de sangue devido ao depósito dos eritrócitos pode elevar ainda o risco de trombose nos vasos envolvidos. Os coágulos formados na microcirculação devem certamente conter eritrócitos. Na drepanocitose estes coágulos podem conter uma combinação de células em forma de crescente reversível e irreversível. Foi demonstrado que os eritrócitos normais fluiriam para fora dos coágulos macroscópicos. O fenómeno saída dos eritrócitos é devido ao tamanho de poro grande inerente dos geles de fibrina e à apreciável deformabilidade dos eritrócitos normais. Mais recentemente, foi demonstrado que existe fluxo de volume diminuído através dos coágulos e saída diminuída de células vermelhas dos coágulos que contêm eritrócitos em forma de crescente.

O objectivo a longo prazo na drepanocitose é reduzir a morbidez e mortalidade significativas associadas. Se a oclusão vascular intermitente não ocorrer na drepanocitose, este objectivo terá sido conseguido. Uma vez que as células que contêm hemoglobina SS apresentam a forma alterada e capacidade diminuída para passarem através de poros não deformáveis, um objectivo principal

da pesquisa corrente é desenvolver modos para aumentar a deformabilidade dos eritrócitos que contém hemoglobina SS.

Uma investigação que utiliza a instrumentação das Figs. 1a e 1b conduziu ao estudo dos efeitos dos eritrócitos no módulo de elasticidade do coágulo. O módulo de elasticidade do coágulo foi medido de acordo com os procedimentos descritos atrás. Como mostrado a seguir, pela comparação do módulo de elasticidade dos coágulos que contêm células vermelhas com coágulos semelhantes, formados na ausência de células vermelhas, pode ser determinada a contribuição relativa dos eritrócitos para o módulo de elasticidade do coágulo. Além disso, este estudo comparou o efeito relativo dos eritrócitos normais e os eritrócitos em forma de crescente no módulo de elasticidade. Como mostrado a seguir, os eritrócitos menos flexíveis aumentaram grandemente o módulo de elasticidade em comparação com os eritrócitos normais. Foi também investigado o efeito do "poloxamer 188", um agente reológico, na flexibilidade das células em forma de crescente e é mostrado a seguir que este agente pode aumentar significativamente a flexibilidade das células em forma de crescente. A investigação e os resultados apresentados a seguir são apenas para fins exemplificativos e não limitam, de qualquer modo, o âmbito do invento.

## Processo 2

Trombina humana, maior do que 90% alfa foi comprada em pó liofilizado na Sigma Chemical Company. O material com uma actividade específica de 4300 NH unidades/mL foi dissolvido em água diluída com 0,10 M de NaCl para a concentração final de 20 unidades/mL, dividido em lotes de 1 mL e congelado a -90°C. A trombina estava livre de plasma e de plaminogénio. Foi utilizada água nanopura na preparação de todas as soluções.

O sangue humano foi obtido em tubos de vidro com citrato por picada na veia de voluntários normais. O PPP foi preparado por rotação a baixa velocidade para remover os elementos grandes formados e por nova rotação a 20 000-1 durante 20 minutos para remover as plaquetas. O PPP foi reunido, mantido à temperatura ambiente e utilizado dentro do período de quatro horas. O revestimento amarelado foi cuidadosamente removido da superfície dos eritrócitos empacotados e as células vermelhas foram mantidas à temperatura ambiente. A concentração de fibrogénio das amostras de plasma foi determinada por um processo modificado de Clauss, *Acta Haematol.* 17, 237 (1957).

Foi obtido o sangue contendo células de apoio hemoglobina SS através de picada na veia de voluntários com a drepanocitose documentada. O PPP e os eritrócitos empacotados foram preparados como delineado atrás. Os eritrócitos foram tratados com a solução de metabissulfito misturando volumes iguais de células vermelhas e 3% de metassulfito de sódio. A mistura foi coberta e incubada à temperatura ambiente durante uma hora. A forma de crescente das células foi confirmada por exame microscópico do sangue. A percentagem de células em forma de crescente, tipicamente >90% foi determinada pela contagem de 200 células. A mistura das células e do metabissulfito de sódio foi subsequentemente centrifugada a 2 000-1 durante cinco minutos e o metabissulfito de sódio que contém o sobrenadante foi removido.

Foram feitas as medições de elasticidade, colocando o PPP, o PRP ou o sangue completo na taça de amostra com termostato 12 do medidor de refração. No instante zero foi adicionada a  $\alpha$ -trombina humana (1NIH unidades/ml). A placa superior 14 foi baixada para a posição, foi disposto em camadas óleo de silicone na interface de sangue e ar exposta 18 e foi iniciada a medição. Em cada trinta segundos foi aplicada uma força para baixo ao coágulo em formação. Esta força permaneceu no lugar durante quinze segundos, foi removida durante quinze segundos e o ciclo foi repetido. A aplicação da força produziu uma deslocação para baixo da placa superior. Estas deflexões geraram um potencial de voltagem, o qual foi registado numa impressora gráfica x-y. Como explicado em pormenor atrás, a grandeza da voltagem foi directa e inerentemente proporcional ao valor da deslocação. À medida que a coagulação continuava, a estrutura tornou-se mais rígida e o valor da deslocação diminuiu para uma força dada. A rigidez ou integridade estrutural foi quantificada como o módulo de elasticidade do coágulo.

As Figs 8a a 8c demonstram o impacto dos elementos celulares na formação e estrutura do coágulo. A Fig. 8a mostra a formação do coágulo no PPP. Foram adicionados trombina (1NIH u/ml) e cálcio (10 mM) ao PPP com citrato no instante zero. As outras condições de coagulação incluíam: 37°C de temperatura, pH 7,4 e resistência iónica 0,15. Uma vez que a estrutura de fibrina afecta também o módulo do coágulo, factores, os quais alteram a formação de fibrina (por exemplo, a resistência iónica, a concentração de cálcio, o pH) necessitam de ser estritamente controlados. As pontas de voltagem são produzidas colocando repetitivamente uma força para baixo sobre o coágulo. Cada ponta de voltagem produz uma medição de módulo de elasticidade. As deflexões declinam em amplitude à medida que o coágulo desenvolve a resiliência estrutural aumentada. O andar gradual mínimo da

voltagem em torno da linha base é provocado por forças de retracção de coágulo fracas, que resultam da contaminação residual por plaquetas. A fig. 8b apresenta os dados obtidos durante a coagulação do PRP. O andar em torno da curva para cima gradual é devido ao desenvolvimento de força por intermédio das plaquetas, durante a retracção do coágulo. A altura de cada ponta de voltagem é inversamente proporcional ao módulo de elasticidade. Quando comparada a Fig. 8c, as pontas de voltagem provocadas pela força externa são vistas como sendo menores. Assim, os coágulos formados na presença das plaquetas têm propriedades de elasticidade mais elevadas. A Fig. 8c apresenta os dados obtidos durante a coagulação de sangue completo (o hematócrito era aproximadamente de 40%) e demonstra o efeito dos eritrócitos no módulo de elasticidade. O efeito é bastante profundo com, pelo menos, a duplicação do módulo de elasticidade.

O efeito dos eritrócitos no módulo de elasticidade do coágulo na ausência de plaquetas foi avaliado através da formação de coágulos a partir de uma mistura de células empacotadas e PPP. A Tabela 1 resume os resultados destes estudos, os quais foram conduzidos com eritrócitos normais e em forma de crescente.

Tabela 1

Amostra	Força (Dyne)	Esforço (Dynes/cm <sup>2</sup> )	Deflexão (mV)	Tensão	E.M. (Dynes/cm <sup>2</sup> )
PPP	4 900	509,3	74	0,0285	17 900
PPP + P180	4 900	509,3	144	0,0554	9 200
PPP + RBC	4 900	509,3	39,4	0,0152	33 600
PPP + RBC + R188	4 900	509,3	52,6	0,0203	25 150
PPP + SRBC	4 900	509,3	26,4	0,0102	50 100
PPP + RBC + R188	4 900	509,3	78,4	0,0302	16 900

Em que o PPP é plasma pobre em plaquetas, P188 é Poloxamer 188, RBC são células de sangue vermelhas e SRBC são RBC em forma de crescente

Como pode ser visto da Tabela 1, os eritrócitos normais, hematócrito = 40%, aumentou o módulo de elasticidade do PPP de 17 900 para 33 600 dyne/cm<sup>2</sup>.

Quando os eritrócitos em forma de crescente são utilizados, o módulo de elasticidade aumenta para 50 100 dyne/cm<sup>2</sup>. A adição de "poloxamer 188", um copolímero com propriedades reológicas únicas ao sistema de células em forma de crescente antes da coagulação reduziu o módulo de elasticidade para 16 900 dyne/cm<sup>2</sup>. Reduções semelhantes mas muito mais pequenas ocorridas com as células normais (33 600 dyne/cm<sup>2</sup>, sem "poloxamer 188" e 25 150 dyne/cm<sup>2</sup> com "poloxamer 188"). Uma vez que o "poloxamer 188" é conhecido para afectar a montagem de fibrina, não é surpreendente que os efeitos fossem notados mesmo na ausência dos eritrócitos. De facto, o aumento do módulo de elasticidade observado quando o poloxamer foi combinado com as células vermelhas de sangue normais pode ser inteiramente devido ao efeito do "poloxamer 188" na estrutura de fibrina.

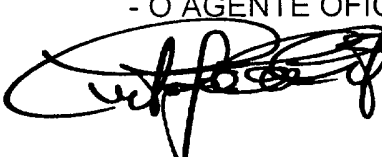
As Figs. 8a a 8b mostram que existe um significativo aumento de eritrócitos induzidos no módulo de elasticidade do coágulo. A comparação do módulo de elasticidade de compressão dos coágulos formados a partir de PPP com os coágulos formados com PPP mais eritrócitos permite a determinação do módulo de elasticidade em "excesso" devido aos eritrócitos. A Tabela 1 mostra que a monitorização do módulo de elasticidade de compressão permite a deformabilidade dos eritrócitos alterados das células SS seja detectada. Especificamente, é detectado um módulo de elasticidade mais elevado para as células em forma de crescente do que para as células normais. A Tabela 1 mostra também o efeito terapêutico potencial do agente reológico "poloxamer 188". Especificamente, é observada uma diminuição tremenda do módulo de elasticidade, quando o "poloxamer 188" é adicionado às células em forma de crescente e esta diminuição pode ser atribuída a uma aumento na flexibilidade dos eritrócitos. A partir das Figs. 8a a 8c e da Tabela 1, pode ser observado que a monitorização do módulo de elasticidade de compressão de uma amostra de sangue pode proporcionar a visão interior valiosa da flexibilidade dos eritrócitos e o efeito de certos agentes na flexibilidade dos eritrócitos.

Embora o invento tenha sido descrito em termos das suas concretizações preferidas, os especialistas na técnica reconhecerão que o invento pode ser posto em prática com modificações dentro do âmbito das reivindicações anexas.

Lisboa, -3. ABO. 2000

Por VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY  
INTELLECTUAL PROPERTY FOUNDATION

- O AGENTE OFICIAL -

  
ENG. ANTÓNIO JOÃO  
DA CUNHA FERREIRA  
Ag. Of. Pr. Ind.  
Rua das Flores, 74 - 4.º  
1200 LISBOA



## REIVINDICAÇÕES

1 – Aparelho para análise de amostras de sangue e de plasma (8), que compreende meios para análise da função das plaquetas de uma amostra (8), que utiliza um par comum de placas espaçadas entre si (12, 14), sendo os ditos meios para análise da função das plaquetas proporcionados para uma medição do desenvolvimento de força entre o dito par de placas espaçadas entre si (12, 14);

caracterizado por:

serem proporcionados meios (26) para aplicação de uma força de valor conhecido às ditas placas espaçadas entre si (12, 14), os quais pressionam as ditas placas espaçadas entre si uma para a outra;

serem proporcionados meios para análise da estrutura de coágulo para a mesma amostra para uma medição do módulo de elasticidade do coágulo ;

em que tanto os ditos meios para análise da função das plaquetas como os ditos meios para análise da estrutura de coágulo para a mesma amostra (8) utilizarem o dito par comum de placas espaçadas entre si (12, 14) e meios para detecção da sua posição, para detecção do movimento relativo das ditas placas espaçadas entre si (12, 14) uma para a outra.

2 – Aparelho de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os ditos meios (26) para aplicação poderem ser actuados intermitentemente.

3 – Aparelho de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os ditos meios (22) para detecção serem um detector de deslocação, o qual monitoriza o movimento da dita primeira placa (14), que está ligada ao dito detector de deslocação (22), para uma segunda placa (12) do dito par de placas espaçadas entre si.

4 – Aparelho de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o dito aparelho estar adaptado para determinação da força de retracção e das características do módulo de elasticidade das ditas amostras de sangue e de plasma (8), o espaçamento (10) das ditas placas espaçadas entre si (12,14) permitir às plaquetas na amostra de sangue aderirem a ambas as placas do dito par de placas espaçadas entre si, os ditos meios (22) para detecção

compreenderem um ou mais detectores, meios para monitorização de uma força de tracção serem proporcionados para monitorização da força de tracção, exercida por uma amostra (8) entre o dito par das placas espaçadas entre si, meios (26) para compressão serem proporcionados para compressão de uma amostra de sangue (8) entre o dito par das placas espaçadas entre si (12, 14) e meios para monitorização de um grau do movimento de compressão serem proporcionados para monitorização do grau do movimento de compressão do dito par de placas espaçadas entre si (12, 14) uma para a outra exercido pelos ditos meios (26) para compressão da dita amostra (8).

5 – Aparelho de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender meios para correlação da saída dos ditos meios para monitorização de uma força de tracção com desenvolvimento de força por intermédio das plaquetas.

6 – Aparelho de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender meios para correlação da saída dos ditos meios para monitorização de um grau do movimento de compressão com o módulo de elasticidade do coágulo.

7 – Aparelho de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o dito aparelho estar adaptado para medição da força de retracção do coágulo, um detector de deslocação (22) estar ligado a, pelo menos, uma placa do dito par de placas espaçadas entre si (12, 14), e serem proporcionados meios para compressão intermitente de uma amostra de sangue (8) entre o dito par de placas espaçadas entre si (12, 14).

8 – Aparelho de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por os ditos meios para compressão intermitente incluírem meios para deslocação de uma primeira placa (14), do dito par de placas espaçadas entre si, para uma segunda placa (12) do dito par de placas espaçadas entre si.

9 – Processo para determinação de um módulo de elasticidade de uma amostra, que compreende os passos de:

posicionamento de uma amostra (8) entre um par de placas espaçadas entre si (12, 14);

compressão da dita amostra entre o dito par de placas espaçadas entre si por meio da aplicação de uma força de valor conhecido às ditas placas espaçadas entre si;

monitorização da saída eléctrica de um detector, ligado a, pelo menos, uma placa do dito par de placas espaçadas entre si, durante o dito passo de compressão; e

cálculo de um módulo de elasticidade da dita amostra com base numa relação entre a dita saída eléctrica e um grau de compressão exercido durante o dito passo de compressão.

10 – Processo de acordo com a reivindicação 9, em que o espaçamento (10) do dito par de placas espaçadas entre si (12, 14) permite que as plaquetas na dita amostra de sangue adiram a ambas as ditas placas, uma força de tracção é monitorizada, a qual é exercida numa das ditas placas, traccionando as ditas placas uma para a outra, enquanto a dita amostra de sangue está a coagular; e um desenvolvimento de força é determinado a partir das medições feitas durante o dito passo de monitorização.

11 – Processo de acordo com a reivindicação 9, em que as amostras de sangue e plasma são analisadas; a dita amostra de sangue (8) é proporcionada com um agente de dissolução de coágulos ou agente de destruição de coágulos, a dita amostra de sangue é deixada coagular e dissolver, a dita amostra de sangue é comprimida entre o dito par de placas espaçadas entre si (12, 14) intermitentemente em relação ao tempo, enquanto a dita amostra de sangue está em coagulação e em dissolução, e é identificado um tempo de dissolução para um coágulo formado a partir da dita amostra de sangue.

12 – Processo de acordo com a reivindicação 11, em que o passo de identificação inclui o passo de análise de uma força de retracção de coágulo para a dita amostra de sangue em relação ao tempo.

13 – Processo de acordo com a reivindicação 11, em que o dito passo de identificação inclui o passo de análise de um módulo de elasticidade da dita amostra de sangue em relação ao tempo.

14 – Processo de acordo com a reivindicação 11, que compreende ainda o passo de proporcionar a dita amostra de sangue com um agente de coagulação.

15 – Processo de acordo com a reivindicação 9, em que são analisadas as amostras de sangue e plasma, é comprimida a dita amostra de sangue intermitentemente em relação ao tempo entre o dito par de placas espaçadas entre si, enquanto a dita amostra de sangue está em coagulação; e são determinados uma força de retracção de coágulo e um módulo de elasticidade para a dita amostra de sangue em relação ao tempo.

16 – Processo de acordo com a reivindicação 9, em que o dito módulo de elasticidade de compressão é relacionado com a flexibilidade dos eritrócitos.

17 – Processo de acordo com a reivindicação 16, em que o passo de compressão é executado pela deslocação de uma primeira placa (14), do dito par de placas espaçadas entre si, para uma segunda placa do dito par de placas espaçadas entre si.

18 – Processo de acordo com a reivindicação 17, em que o dito passo de compressão é executado intermitentemente em relação ao tempo.

Lisboa, -3. AGO. 2000

Por VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY  
INTELLECTUAL PROPERTY FOUNDATION  
- O AGENTE OFICIAL -



ENG.º ANTÓNIO JOÃO  
DA CUNHA FERREIRA  
Ag. Of. Pr. Ind.  
Rua das Flores, 74 - 4.º  
1200 LISBOA

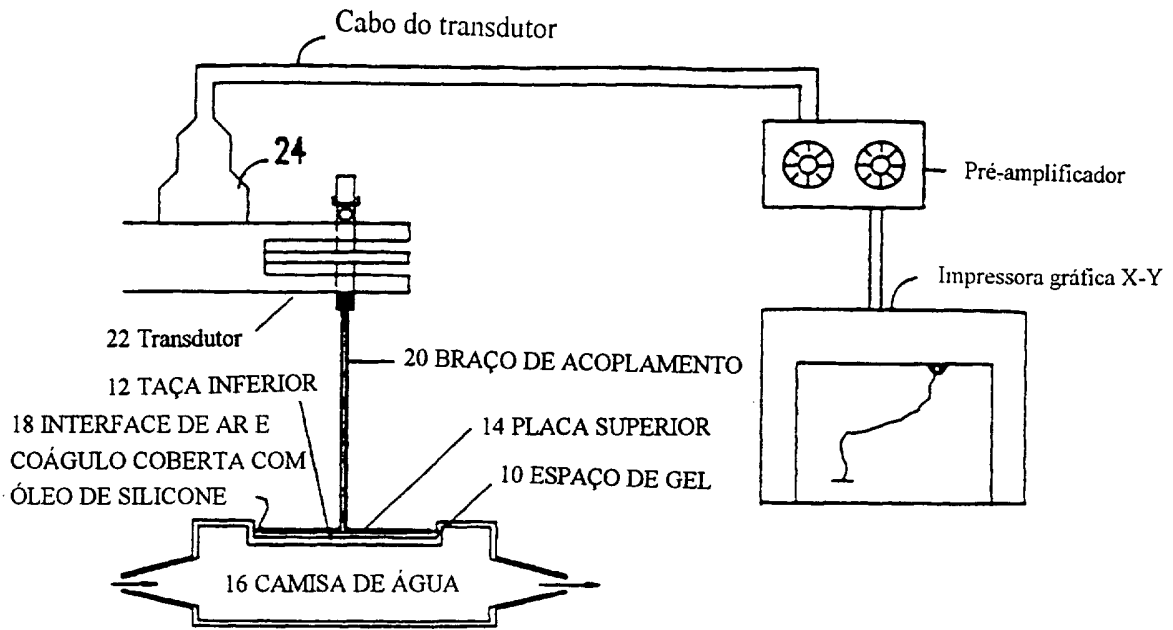


FIG.1a

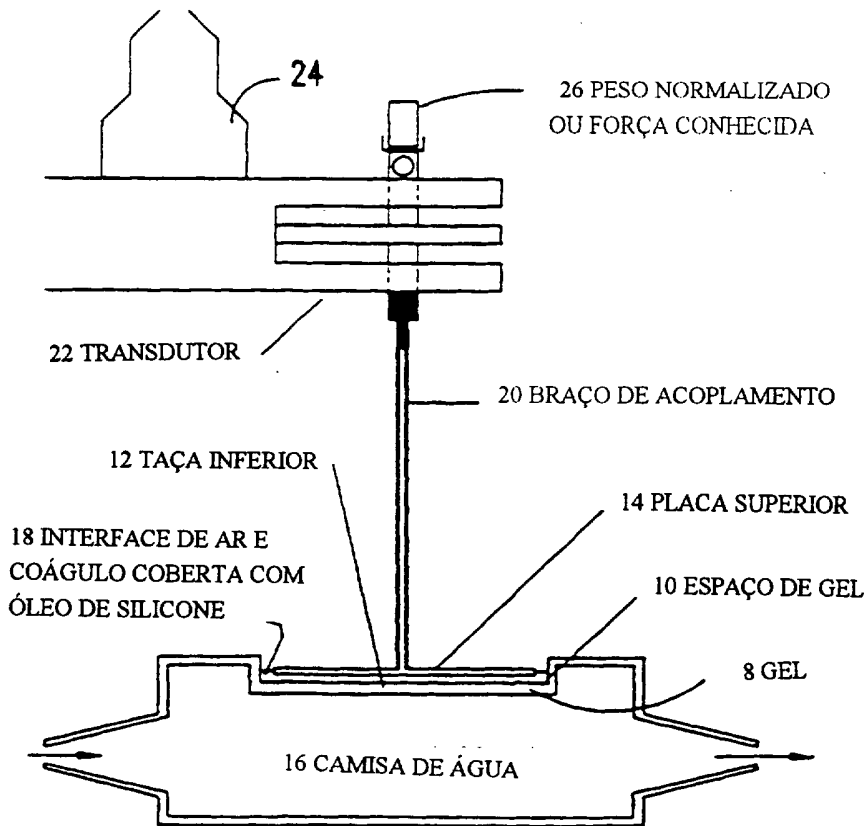


FIG.1b

CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DESLOCAÇÃO

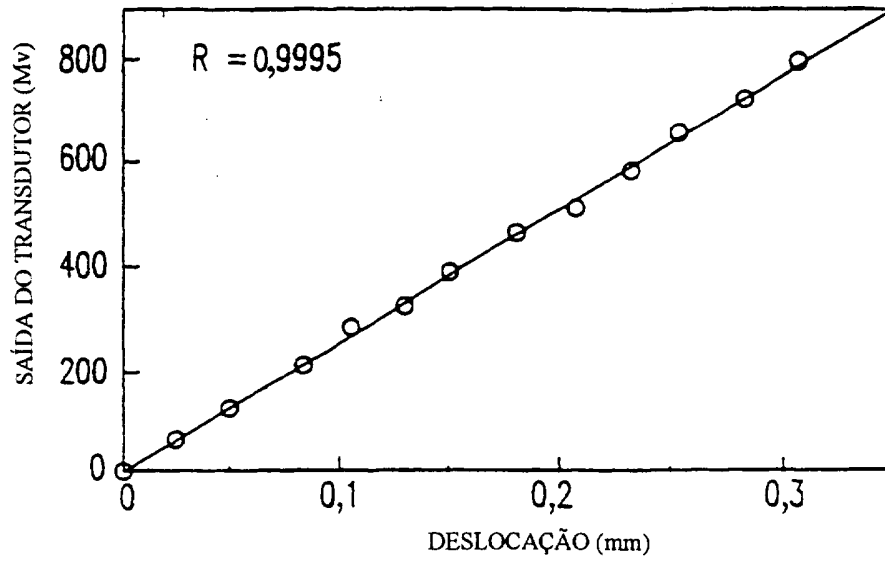


FIG.2

COAGULAÇÃO POR INTERMÉDIO DE TROMBINA E  
DISSOLUÇÃO POR INTERMÉDIO DE TPA DE UM COÁGULO  
DE SANGUE COMPLETO  
(dados não Processados)

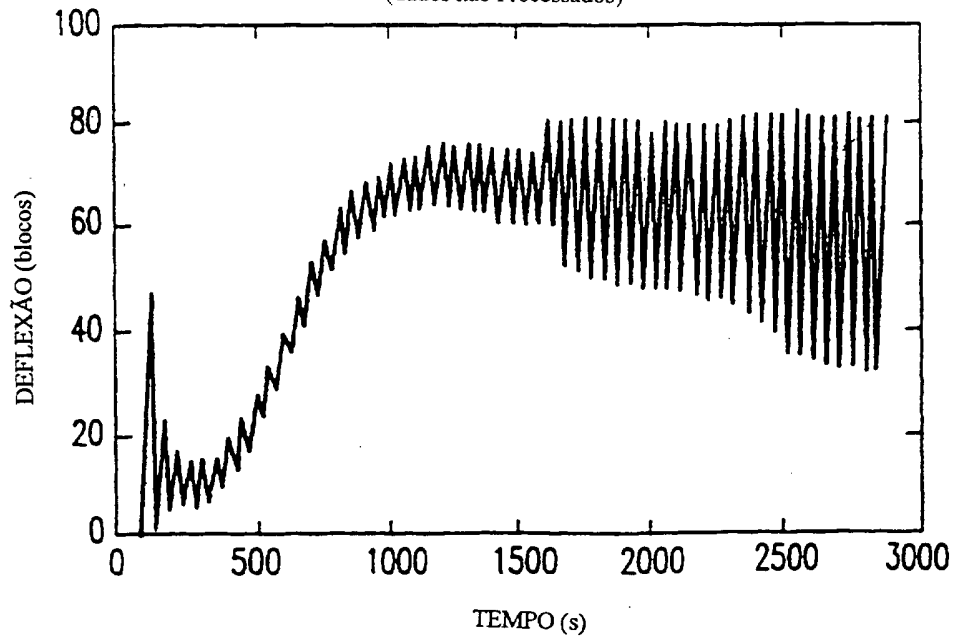
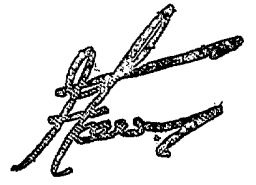


FIG.3



COAGULAÇÃO POR INTERMÉDIO DE TROMBINA E  
DISSOLUÇÃO POR INTERMÉDIO DE TPA DE UM COÁGULO  
DE SANGUE COMPLETO

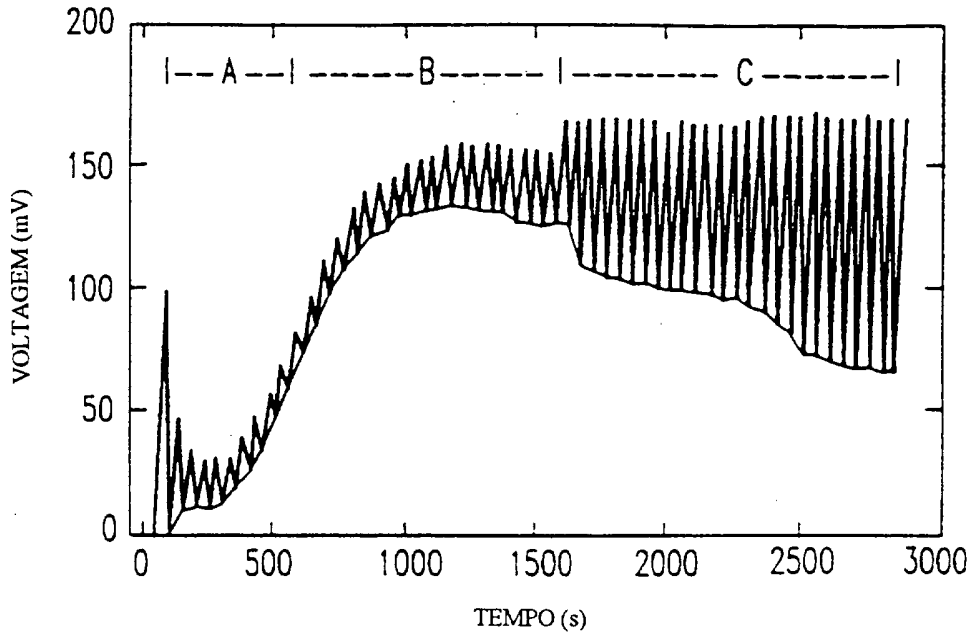


FIG.4

DESENVOLVIMENTO DE FORÇA POR INTERMÉDIO DE  
PLAQUETAS DURANTE A COAGULAÇÃO E DISSOLUÇÃO  
DE UM COÁGULO DE SANGUE COMPLETO

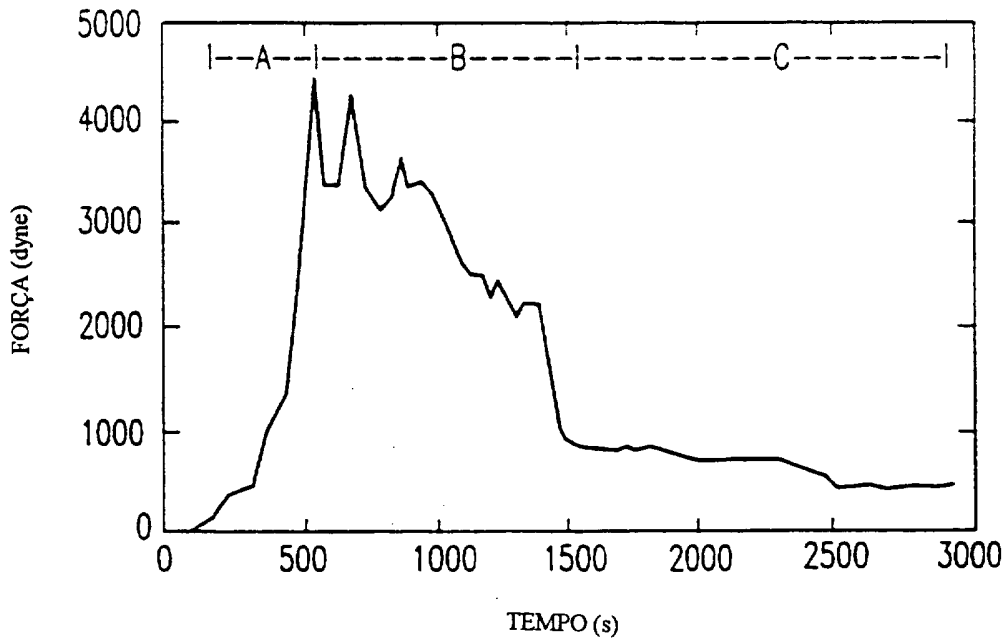


FIG.5

VARIAÇÃO DA ELASTECIDADE DE COÁGULO DURANTE A  
A COAGULAÇÃO E A DISSOLUÇÃO DE UM COÁGULO  
DE SANGUE COMPLETO

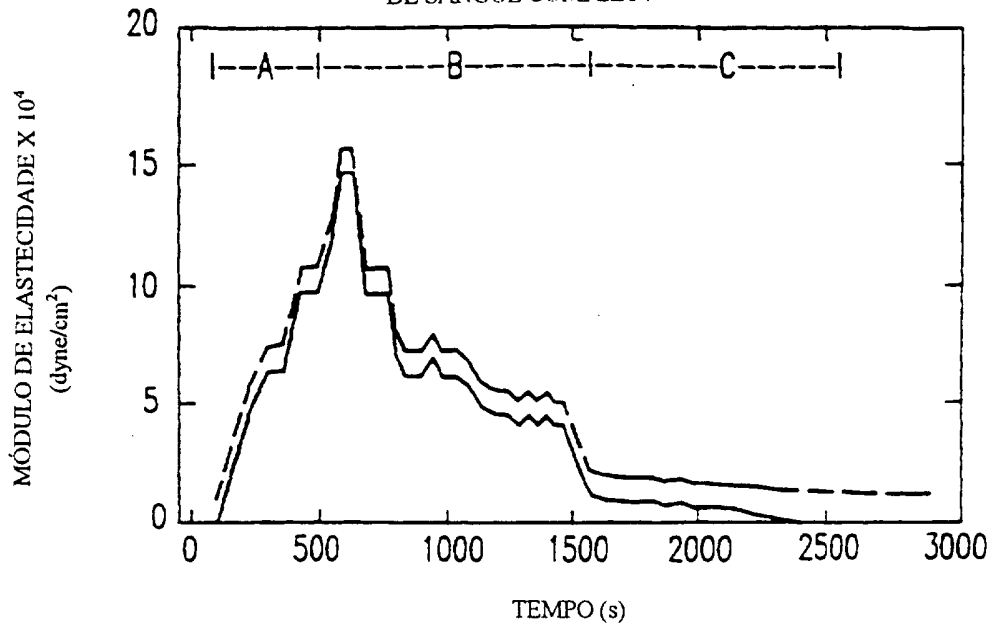


FIG.6

VARIAÇÃO DA ELASTECIDADE DE COÁGULO DURANTE A  
A COAGULAÇÃO E A DISSOLUÇÃO DE UM COÁGULO  
DE SANGUE COMPLETO

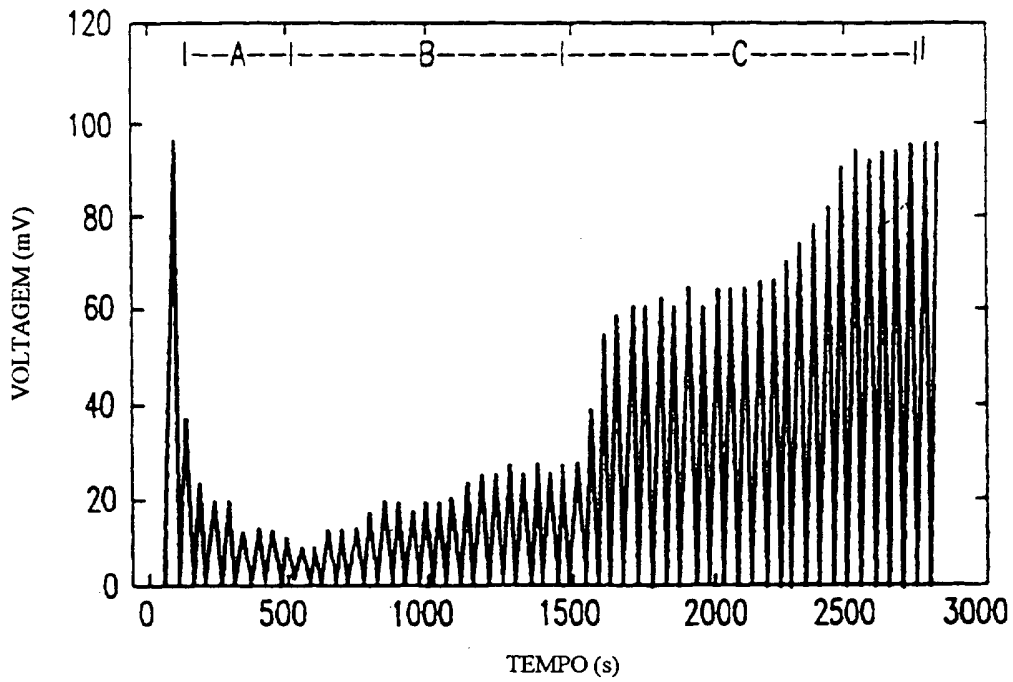


FIG.7

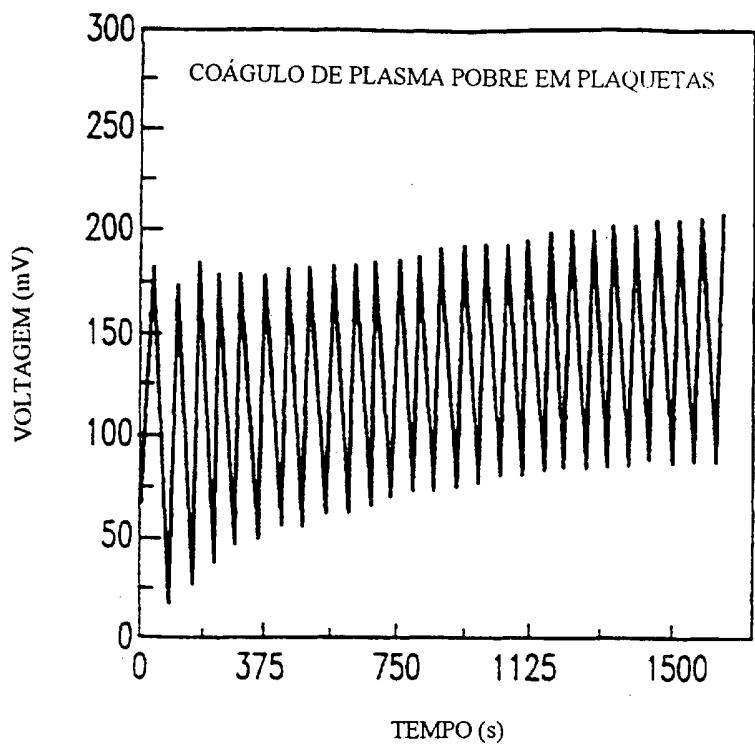


FIG.8A

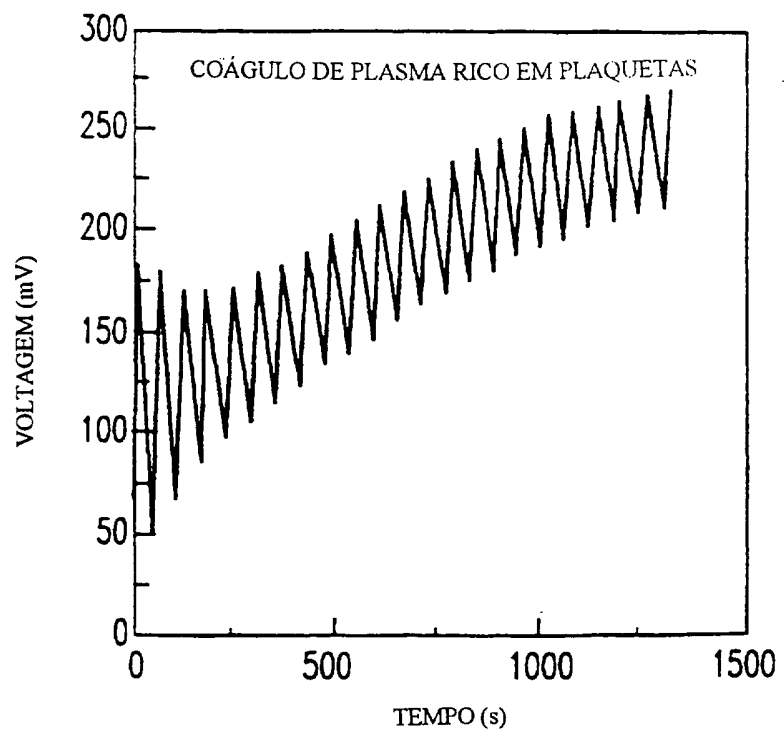


FIG.8B

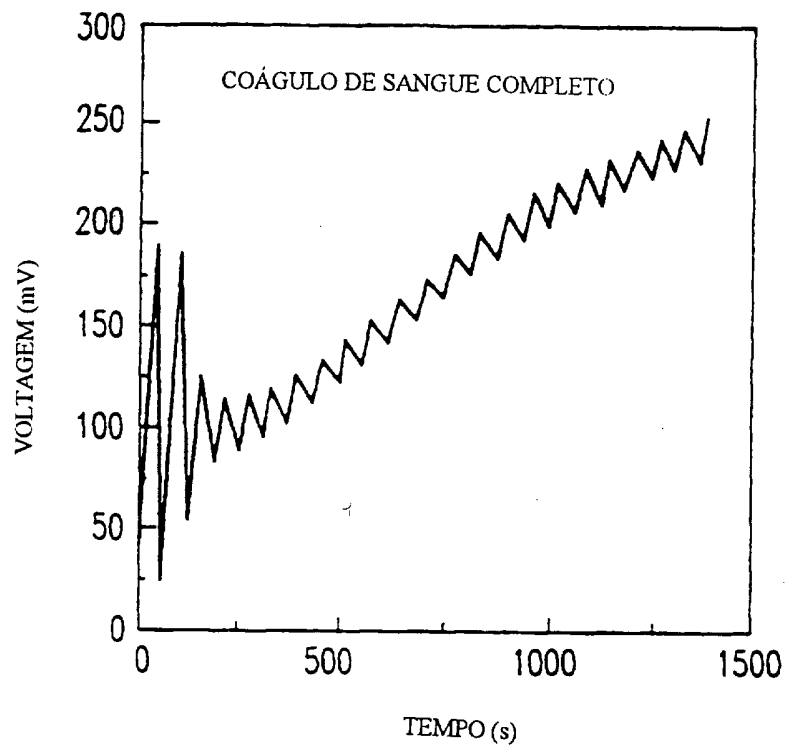


FIG.8C