

Desenvolvimento de adesivo tecidual fibrínico para uso experimental em perfurações corneanas

Development of a fibrin glue in experimental corneal perforations

José Américo Bonatti ⁽¹⁾

José Tadeu Stefano ⁽²⁾

Luis Carlos Aparecido Matheus ⁽³⁾

Geni Aparecida de Oliveira ⁽⁴⁾

Hisashi Suzuki ⁽⁵⁾

Newton Kara José ⁽⁶⁾

RESUMO

Neste trabalho, mostramos o desenvolvimento de adesivo tecidual fibrínico para uso em perfurações corneanas experimentais. Nesse adesivo a concentração de trombina é de 1,5mg por ml de solução, o que leva a um tempo médio de solidificação da cola de 5,6 segundos, bastante adequado para esse tipo de perfuração.

Palavras-chave: Fibrina; Cola; Córnea; Perfuração.

INTRODUÇÃO

Úlceras de córnea quer de origem infecciosa quer não infecciosa (associadas a queimaduras químicas, uso de anestésicos, neurotróficas, doenças do colágeno, olho seco e doenças nutricionais) podem, apesar do tratamento clínico, ter evoluções desfavoráveis, chegando até a perfuração.

Esta complicação usualmente, é tratada aplicando-se adesivo de origem não biológica, à base de cianocrilato, para tamponar a área perfurada², seguido de ceratoplastia parcial penetrante.

Os adesivos à base de cianocrilato possuem como desvantagem o fato de não se integrar à área tamponada, o que obriga a realização da ceratoplastia parcial penetrante para substituir toda a área acometida, que geralmente é feita em olho com processo inflamatório agudo, muitas vezes com neovascularização da córnea, além da inflamação provocada pelo próprio adesivo. Estes fatores aumentam o risco de insucesso do transplante. Além disso, a superfície do adesivo sobre a área

tamponada é irregular e rígida, provocando intenso desconforto ao piscar.

Existe outra opção, a fibrina, que por ser reabsorvível e substituível por colágeno, constitui-se num adesivo com características mais fisiológicas, tendo seu uso ocorrido com sucesso em diferentes modelos experimentais em oftalmologia ^{1,3,5,6,7}.

O adesivo fibrínico é habitualmente constituído de duas partes:

- A solução I é formada por crioprecipitado, contendo fibrinogênio na concentração de 10 mg/ml, fator XIII, várias proteínas plasmáticas e por ácido tranexâmico (250mg/ml).
- A solução II é formada pela diluição de trombina liofilizada de origem bovina em solução de cloreto de cálcio 40 mmol/ml.

Após a mistura das soluções I e II, o fibrinogênio, sob a ação da trombina, é transformado em fibrina. Concomitantemente, a trombina na presença do íon cálcio converte o fator XIII em XIIIa, que promove reações cruzadas entre as moléculas de fibrina, transformando-as num polímero de alto peso molecular insolúvel, aumentando a rigidez e a resistência da colagem. O

Das Disciplinas de Oftalmologia (1,5,6) e de Técnica Cirúrgica (2) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (3,4).

⁽¹⁾ Médico Pós-Graduando (Doutorado) e Assistente do Hospital Universitário da USP

⁽²⁾ Biologista - Pesquisador

⁽³⁾ Médico Assistente

⁽⁴⁾ Química - Pesquisadora

⁽⁵⁾ Professor Associado

⁽⁶⁾ Professor Associado (USP) e Titular (UNICAMP)

fator XIIIa promove também a ligação cruzada da fibronectina presente no adesivo e provavelmente, da fibrina e fibronectina com colágeno do tecido no qual o adesivo tecidual é aplicado. Durante o processo de cicatrização, os ativadores do plasminogênio originados dos tecidos vizinhos ativam uma pequena quantidade de plasminogênio, presente no adesivo, em plasmina que lisa a fibrina em produtos solúveis. Para inibir a degradação da fibrina pela ação da plasmina, é utilizado no adesivo um inibidor da fibrinólise, no caso o ácido tranexâmico.

Estas reações são similares à coagulação fisiológica, porém, não há retração do coágulo, pois o adesivo não contém trombócitos. A fibrina adere-se aos tecidos assegurando a adequada aproximação das superfícies ⁴.

Este trabalho mostra o desenvolvimento do adesivo tecidual fibrínico a partir de crioprecipitado, com a finalidade de ser usado em estudos de perfurações corneanas experimentais, em animais, e mais especificamente no trabalho de tese de doutoramento do autor nº 1.

Estas perfurações exigem um adesivo que tenha uma coagulação rápida (cerca de 5 segundos) para que não seja lavado pelo humor aquoso e nem se espalhe dentro do olho, agindo basicamente no fechamento da perfuração da córnea.

O adesivo tecidual fibrínico foi desenvolvido na Divisão de Produção e Desenvolvimento Industrial da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

1. Materiais Permanentes

- Liofilizador - Marca Edwards
- Modelo Liomax I

2. Materiais de Consumo

Solução I

- Crioprecipitado Liofilizado -

preparado a partir do plasma fresco de doadores humanos sadios submetidos a uma bateria de testes sorológicos para descartar doenças infectocontagiosas.

- Ácido tranexâmico (Transamin) - Química e Farmacêutica NIKKHO DO BRASIL LTDA., na concentração de 250 mg/ml de solução. Maltose - MERCK (4%).

Solução II

- Trombina - ROCHE - Suíça, de origem bovina, em pó.
- Cloreto de cálcio - MERCK na concentração de 40 mmol/ml de solução.

MÉTODOS:

MÉTODOS LABORATORIAIS:

1) Preparo do Crioprecipitado

O crioprecipitado foi preparado a partir de um pool de plasma fresco de doadores de sangue voluntários que comparecem à Divisão de Transfusão de Sangue do Hospital das Clínicas - FMUSP - Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo após triagem clínica e hematológica (este produto é preparado rotineiramente em Banco de Sangue).

As bolsas de crioprecipitado utilizadas para liofilização estavam isentas de plasma. Em cada bolsa foi adicionada uma solução de maltose na concentração de 4% como estabilizador (segundo metodologia do Instituto Santa Catarina - RJ.).

A pasta de crioprecipitado foi dissolvida com solução de maltose e homogeneizada eficientemente sendo em seguida filtrada em equipo de transfusão em frações de 3 ml.

O produto foi congelado e liofilizado por 48 horas.

2) Preparo do Kit e Teste dos Tempos de Coagulação

O crioprecipitado foi redissolvido em 1 ml de solução de ácido tranexâmico (250 mg/ml). Estes dois reagentes formaram a solução I do Kit.

A trombina e a solução de cloreto de cálcio (40 mmol/ml) compuseram a solução II do Kit, com volume de 1 ml.

A trombina teve sua concentração progressivamente aumentada de 0,15 mg/ml em 0,15 mg/ml na solução II a partir de 0,15 mg/ml iniciais até que se obtivesse tempo de coagulação da mistura das soluções I e II de cerca de 5 segundos.

As soluções I e II foram misturadas à base de 1 ml cada uma injetadas simultaneamente num equipo plástico com duas vias de entrada (uma para cada solução) e uma só saída para mistura das duas soluções através de agulha 30 x 7 de ponta romba, constituindo a cola de fibrina propriamente dita. A mistura era eliminada do equipo sobre uma placa de Petri e imediatamente começava-se a contar o tempo de coagulação da cola, passando-se outra agulha 30 x 7 de um lado para outro desta cola até que fosse sentida a sua solidificação (coagulação), sendo este tempo registrado num cronômetro, em segundos. Na concentração de trombina na solução II que resultou no tempo de coagulação de aproximadamente 5 segundos, foram preparados 10 kits com esta concentração para realização de um ensaio de coagulação com cada kit para confirmação do resultado através do mesmo método acima descrito.

RESULTADO

Após serem testadas concentrações crescentes de trombina na solução II, chegou-se à concentração de 1,5 mg de trombina/ml da solução II, que resultava num tempo de coagulação de cerca de 5 segundos.

Os 10 kits com esta concentração de trombina (1,5 mg/ml), foram a seguir testados e obtiveram-se os resultados mostrados na Tabela I.

O Tempo Médio de coagulação

TABELA I

KIT	TEMPO DE COAGULAÇÃO (SEGUNDOS)
01	6
02	5
03	5
04	6
05	7
06	5
07	5
08	6
09	5
10	6

dos Kits com trombina na concentração de 1,5 mg/ml foi de 5,6 segundos.

DISCUSSÃO

O resultado mostrou a obtenção de uma cola de fibrina cujo tempo de coagulação médio foi de 5,6 segundos, bastante apropriado para uso em perfurações corneanas.

Desenvolveu-se pela primeira vez em nosso meio uma cola de fibrina para uso em oftalmologia que antes só se obtinha comprando no exterior, onerando significativamente a estrutura onde fosse utilizada, principalmente tratando-se de trabalhos experimentais, onde são utilizados muitos Kits, cujo custo gira em torno de US\$ 170,00 por Kit de 1ml, suficiente para no máximo 2 a 3 olhos de animais.

É difícil calcular-se o preço exato de cada Kit por nós produzido, pois ainda não entrou em escala industrial

de produção e esterilização por termoviro-inativação para ser utilizado em humanos.

Cálculos preliminares, entretanto, indicam que cada Kit de 1 ml custaria cerca de US\$ 65,00, sendo US\$ 60,00 correspondentes ao crioprecipitado com fibrinogênio e os US\$ 5,00 restantes referentes aos outros componentes, o que torna esta cola bastante competitiva em relação à importada.

Mas um dado interessante é que o custo do fibrinogênio (obtido gratuitamente de doadores) é quase todo composto do custo dos testes para detecção de doenças infecto-contagiosas neste plasma.

Portanto se, ao ser feita a cola, utilizar-se plasma do próprio paciente para produção do crioprecipitado com fibrinogênio, estes testes estariam dispensados e o custo deste fibrinogênio seria muito baixo, em se tratando de uma Instituição Pública na qual já existe estrutura montada para este processamento, totalizando o Kit com 1 ml de cola de fibrina cerca de US\$ 10,00, o que traria considerável economia para a Instituição e facilitaria o acesso dos pacientes a este tipo de tratamento.

Caso se quisesse obter cola apenas para uso experimental em animais não haveria necessidade obrigatória dos testes acima e portanto o custo também seria o mesmo, barateando substancialmente a realização de experimentos animais, permitindo que se realizasse maior número de trabalhos experimentais a um custo compatível com a nossa realidade.

SUMMARY

This paper shows the development of a fibrin glue to be used in experimental corneal perforations. We found the concentration of thrombin of 1.5mg/ml of solution to be very adequate because the average time for solidification of the glue was 5.6 seconds, rapidly enough for this kind of perforation.

Key words: fibrin, glue, corneal perforation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RIES, H. G. & HESSEM, W. - Fibrin adhesion in ophthalmic surgery. *Wien Klin. Wochenschr.* **98**: 346-347, 1986.
2. HYNDIUK, R. A.; HULL, F. S. & KINYOUN, J. L. - Free tissue patch and cyanoacrylate in corneal perforations. *Ophthalmol. Surg.*, 5:50-55, 1974.
3. KATZIN, H. M. - Aqueous fibrin fixation of corneal transplants in the rabbit. *Arch. Ophthalmol.* **35**: 415-420, 1946.
4. REDL, H.: Grundlagen der Fibrinklebung. In COTTA, H. & BRAUN, A. - *Fibrinkleber in Orthopaedie und Traumatologie*. HEIDELBERGER ORTHOPAEDIE SYMPOSIUM, 4., Heidelberg, 1981. Stuttgart, Georg Thieme, 1982, p.18-21.
5. ROSENTHAL, A. R.; EGBERT, P. R.; HARBURY, C.; HOPKINS, J. L. & RUBENSTEIN, E. Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **207**: 111-115, 1978.
6. TASSMAN, I. S. - Experimental studies with physiologic glue (autogenous plasma plus thrombin) for use in the eyes. *Am. J. Ophthalmol.*, **33**:870-878, 1950.
7. BONATTI, J. A.; MATHEUS, L. C. A.; TOLOSA, E.M.C.; LEITÃO, R.; SUZUKI, H. & KARA-JOSÉ, N. - Cola de Fibrina em Perfuração Corneana Experimental em cão. *Arq. Bras. Oftalmol.*, **58**: 88-92, 1995.