

# Desenvolvimento de adesivo tecidual fibrínico para uso experimental em perfurações corneanas

## *Development of a fibrin glue in experimental corneal perforations*

José Américo Bonatti <sup>(1)</sup>

José Tadeu Stefano <sup>(2)</sup>

Luis Carlos Aparecido Matheus <sup>(3)</sup>

Geni Aparecida de Oliveira <sup>(4)</sup>

Hisashi Suzuki <sup>(5)</sup>

Newton Kara José <sup>(6)</sup>

### 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 perfurada<sup>2</sup>, 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 <sup>1,3,5,6,7</sup>.

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).

<sup>(1)</sup> Médico Pós-Graduando (Doutorado) e Assistente do Hospital Universitário da USP

<sup>(2)</sup> Biologista - Pesquisador

<sup>(3)</sup> Médico Assistente

<sup>(4)</sup> Química - Pesquisadora

<sup>(5)</sup> Professor Associado

<sup>(6)</sup> 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<sup>4</sup>.

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 Fibrinklesbung. 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.