

MODELO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE ACORDO COM A ISO10993-4

Passos POS.¹, Feitosa TC.¹, Cunha TF.¹, Medeiros F.^{1,2}, Higa OZ.²

¹Laboratório Biosíntesis P&D do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo. O teste de hemocompatibilidade avalia interações de um material desconhecido em contato com o sangue, explorando possíveis efeitos adversos durante a exposição. O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo para teste de hemocompatibilidade in vitro conforme os guias da International Organization for Standardization (ISO) 10993-4 - Selection of tests for interactions with blood - part 4, comparando amostras de sangue de diferentes espécies em relação a coagulação, hemólise, valores de hematócrito e número de eritrócitos. O PVC foi testado como material de referência.

O experimento foi conduzido em um modelo dinâmico usando banho-maria onde as amostras de sangue de coelho, carneiro, bovino e humano foram incubadas a 37 ± 2 °C por 120 min, com e sem o material. As amostras de sangue foram analisadas em duplicata em dois tempos: imediatamente após a coleta (T0) e após incubação em banho-maria (T2).

Foram observadas pequenas variações nos parâmetros. Os resultados de coagulação estão dentro do desvio padrão aceitável. O número de eritrócitos e a quantificação da hemoglobina obtidas na avaliação hematológica estão dentro dos valores de referência.

Concluiu-se que não houve mudança significativa na estabilidade das amostras de sangue testadas durante a condução do teste em modelo dinâmico in vitro.

Palavras-chave: Hemocompatibilidade in vitro, Biomateriais, Dispositivos médicos cardiovasculares.

1. INTRODUÇÃO

Hemocompatibilidade de biomateriais. No protocolo de avaliação da biocompatibilidade de biomateriais, o ensaio de hemocompatibilidade é um dos estudos utilizados para se conhecer o efeito biológico de dispositivos de comunicação externa e implantes cardiovasculares que entram em contato com o sangue circulante. O contato do sangue com materiais desconhecidos pode estar, em muitos casos, associado com alterações hematológicas tais como inflamação, coagulação e hemólise. De modo geral, o simples contato de um material exógeno com o tecido sanguíneo pode induzir e potencializar o mecanismo da ativação da cascata de coagulação sanguínea, e conseqüentemente promover a formação de trombos, assim como provocar hemólise e/ou ativar as vias de sistema do complemento. Dessa forma, o desenvolvimento de materiais hemocompatíveis apresenta-se como um dos principais desafios na área de biomateriais [Totea, 2014], [Balan, 2007].

Exigências Normativas. A avaliação da hemocompatibilidade de biomateriais e dispositivos médicos que entram em contato com sangue é um dos requisitos recomendados pelo conjunto de normas da International Organization for Standardization (ISO) "ISO 10993 - Biological Evaluation of Medical Devices". A avaliação preconizada pela ISO contém 5 parâmetros de avaliação: adesão plaquetária, trombogenicidade, avaliação hematológica, ativação da cascata de coagulação e do sistema complemento. Apesar do direcionamento da "ISO 10993-4 - Selection of tests for interactions with blood - part 4" não existem protocolos padronizados para a avaliação desses parâmetros [Ratner, 2007].

Interações dos biomateriais com o sangue. Avaliações da interação do biomaterial com o sangue indicam respostas biológicas relevantes, como, por exemplo, a adesão e a agregação

de plaquetas, causada pela adsorção de proteínas à superfície do biomaterial, que pode vir ocasionar a formação de trombos.

A formação de trombos sobre a superfície de biomateriais pode causar a obstrução da luz dos vasos próximos ao local de implantação do dispositivo ou então se soltar na corrente sanguínea em forma de êmbolo [Braune, 2011]. Isso ocorre devido à ação das plaquetas, as quais fisiologicamente têm participação no processo de hemostasia, e cuja finalidade é controlar a perda sanguínea após lesão vascular por meio da formação do coágulo sanguíneo. A trombina tem ação fundamental no processo de coagulação. Ela tem como precursor inativo a protrombina, que é convertida em trombina pelos fatores de coagulação os quais geralmente são inativos, sendo ativados na chamada cascata de coagulação [Barbosa, 2009].

A hemólise pode causar a liberação de hemoglobina, assim como a liberação de componentes intracelulares e substâncias tromboplásticas pela ruptura de eritrócitos que ativam o sistema de coagulação [Mohan, 2013].

Esses fenômenos ocorrem, fisiologicamente, em qualquer espécie de mamífero e, são ativados quando em contato com substâncias ou materiais capazes de promover reações adversas no sistema sanguíneo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar um modelo em sistema dinâmico para o ensaio de hemocompatibilidade *in vitro* por meio da avaliação comparativa de diversos parâmetros celulares hematológicos em sangue de diferentes espécies de mamíferos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos com amostras de cloreto de polivinila (PVC).

Coleta de sangue. Foram coletadas amostras de sangue humano e de sangue bovino, de coelho e de carneiro provenientes de voluntários saudáveis. A coleta foi feita por meio da utilização de sistema a vácuo, em tubos de coleta com os anticoagulantes citrato e EDTA, efetuado por profissional capacitado.

Sistema dinâmico *in vitro*. O teste de hemocompatibilidade, de acordo com a ISO 10993-4, exige a avaliação dos testes de forma dinâmica ou estática. O teste dinâmico foi escolhido, com o objetivo de mimetizar condições semelhantes ao fluxo sanguíneo.

Para a avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* as amostras de sangue foram avaliadas em dois tempos imediatamente após a coleta do sangue (T0) e após 120 minutos de incubação (T2).

O ensaio foi conduzido em banho-maria *Dubnoff* com agitação horizontal e a temperatura de 37 ± 2 °C, com e sem as amostras de PVC submersas no sangue. Após os tempos T0 e T2 foram separadas amostras de sangue para avaliação hematológica e para o teste de coagulação.

Avaliação hematológica. Hemólise significa a destruição das membranas dos eritrócitos e a liberação da hemoglobina no sangue, e pode ser considerada como um indício da toxicidade celular do biomaterial sobre os eritrócitos.

Para a avaliação hematológica foi realizado hemograma completo. Foram considerados os valores de hematócrito e hemoglobina e o número de eritrócitos a fim de determinar a presença ou a ausência de hemólise para avaliar a estabilidade sanguínea do sangue humano, bovino, de carneiro e de coelho.

Foi separado para o teste 1 mL de sangue coletado com o anticoagulante EDTA para cada replicata nos tempos T0 e T2 com e sem as amostras de PVC para a realização deste parâmetro.

Tempo de Protrombina (TP). Para avaliação da coagulação sanguínea foram separados microtubos com 1 mL das amostras de sangue coletadas com o anticoagulante citrato para cada replicata. Os microtubos com sangue foram centrifugados por 15 minutos a 3000 RPM para obtenção do plasma. Após centrifugação foi adicionado ao plasma o reagente do Kit TPClot®.

Teste de Trombogenicidade. Para a avaliação da trombogenicidade e adesão plaquetária, foram expostos no sistema dinâmico *in vitro* amostras de PVC em contato com o sangue e em contato com o vidro durante duas horas de incubação. O vidro é uma substância trombogênica e foi considerado nesta avaliação como controle positivo. Após o período de incubação, as amostras de PVC vidro foram lavadas com solução salina a 0,9%, fixadas com glutaraldeído a 2,5% durante 10 minutos, e desidratadas com álcool etílico a 50%, 75% e 95% por 15, 10 e 5 minutos, respectivamente. As amostras de vidro e PVC foram mantidas em dissecador, sob sistema à vácuo, por aproximadamente 4 horas. Após a secagem completa foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O teste de trombogenicidade e adesão plaquetária foram realizados em sangue humano, sangue bovino e de carneiro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação hematológica. A partir dos resultados do hemograma, considerando o número de eritrócitos e valores de hematócrito e leucócitos para as espécies animais avaliadas conclui-se que não houve alteração significativa nestes parâmetros, conforme a “Tabela 1”, após a comparação entre os dados obtidos com os valores de referência nos dois tempos T0 e T2 e após a comparação entre os valores encontrados em T2 com a amostra de PVC em relação à amostra de sangue antes (T0) e depois (T2) da incubação sem a amostra de PVC (Branco). Nas “Tabela 1”, “Tabela 2”, “Tabela 3” e “Tabela 4”, abaixo se pode observar os valores obtidos para cada parâmetro avaliado para cada espécie.

Tabela 1 - Valores de referência

	Eritrócitos	Hematócrito	Hemoglobina
Carneiro	8,0 a 16,0 x 10 ⁶ /L	24 a 50 %	8,0 a 16,0 x g/dL
Humano	3,9 a 5,70 milhões/mm ³	35 a 50 %	12,0 a 17,0 g/dL
Bovino	5,0 a 10,0 x 10 ⁶ /μL	24 a 46 %	8 a 15 g/dL
Coelho**	Não foram descritos valores de referência para a espécie, porém, os valores encontrados neste trabalho corroboram aos valores publicados em Freitas (2009) e Tannus (2013).		

Tabela 2 – Valores obtidos para número de eritrócitos em coelho, carneiro, humano e sangue bovino antes da incubação e após 120 minutos de incubação em sistema dinâmico *in vitro*.

ERITRÓCITOS		T0	T2	T2 PVC
Coelho *	Média	6,4	6,7	6,2
	DP	0,1	0,4	0
Carneiro 10 ⁶ /L	Média	11,4	11,4	11,4
	DP	0,8	0,4	0
Humano milhões/mm ³	Média	5,2	5,3	5,3
	DP	0,1	0,1	0,2
Bovino 10 ⁶ /μL	Média	8,1	8,5	9,2
	DP	0,1	0,1	0,0

Tabela 3 – Valores de hemoglobina obtidos em g/dL em coelho, carneiro, humano e sangue bovino antes da incubação e após 120 minutos de incubação em sistema dinâmico *in vitro*.

HEMOGLOBINA		T0	T2	T2 PVC
Coelho	Média	12,2	12,8	12,0
	DP	0,2	0,7	0
Carneiro	Média	12,6	12,6	12,8
	DP	0,8	0,4	0
Humano	Média	15,4	15,7	15,9
	DP	0,1	0,1	0,2
Bovino	Média	9,2	9,3	9,4
	DP	0,1	0,0	0,0

Tabela 4 – Valores de hematócrito obtidos em % para coelho, carneiro, humano e sangue bovino antes da incubação e após 120 minutos de incubação em sistema dinâmico *in vitro*.

HEMATÓCRITO		T0	T2	T2 PVC
Coelho	Média	39,8	42,5	40,0
	DP	0,5	2,1	0
Carneiro	Média	39,6	39,5	41,0
	DP	2,2	0,7	0
Humano	Média	46,1	48,4	47,0
	DP	1,8	0,6	2,3
Bovino	Média	32,5	33,0	33,5
	DP	0,7	0,0	0,7

Tempo de Protrombina (TP). Os resultados são uma média dos tempos obtidos em segundos da coagulação do plasma e estão apresentados na “Tabela 5” e na “Fig.1”, para cada espécie avaliada. Não houve diferença significativa entre os parâmetros e nem ativação da cascata de coagulação.

Tabela 5 - Valores obtidos em segundos para o tempo de ativação de protrombina em coelho, carneiro e humano antes da incubação e após 120 minutos de incubação em sistema dinâmico *in vitro*.

Espécies		T0	T2	T2 PVC
Coelho	Média	10,65	10,33	10,60
	DP	1,33	1,16	1,05
Carneiro	Média	32,12	30,72	32,08
	DP	5,64	3,47	2,21
Humano	Média	17,87	21,60	23,03
	DP	1,98	3,93	4,07
Bovino	Média	26,5	31,3	29,0
	DP	3,4	3,4	1,4

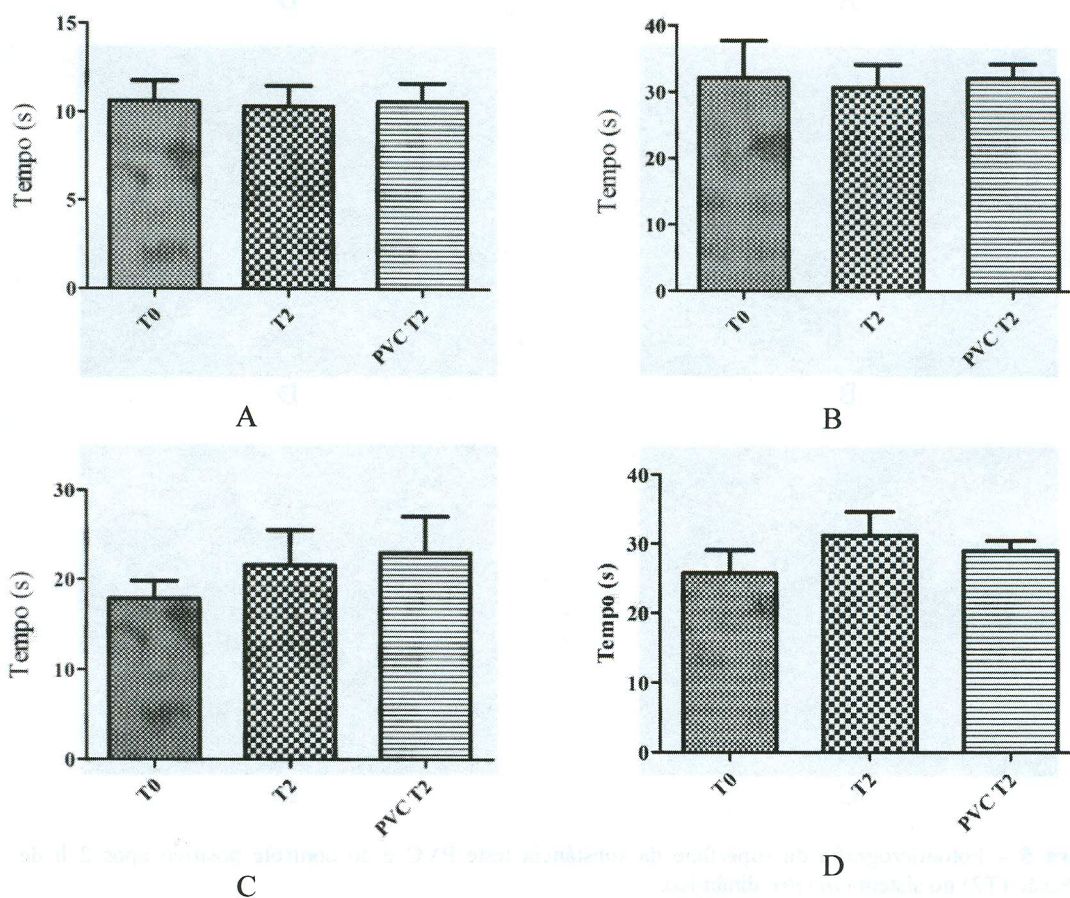


Figura 1 - Comparação dos tempos de protrombina das amostras de sangue imediatamente após a coleta (T0), após 120 min de incubação sem a amostra de PVC (T2) e com a amostra de PVC (PVC T2).

- A - Coelho
- B - Carneiro
- C - Humano
- D - Bovino

Trombogenicidade e Adesão plaquetária. Na “Fig. 5” pode-se observar o comportamento das células sanguíneas na presença do PVC e do vidro em contato com sangue humano, sangue bovino e de carneiro após o tempo T2.

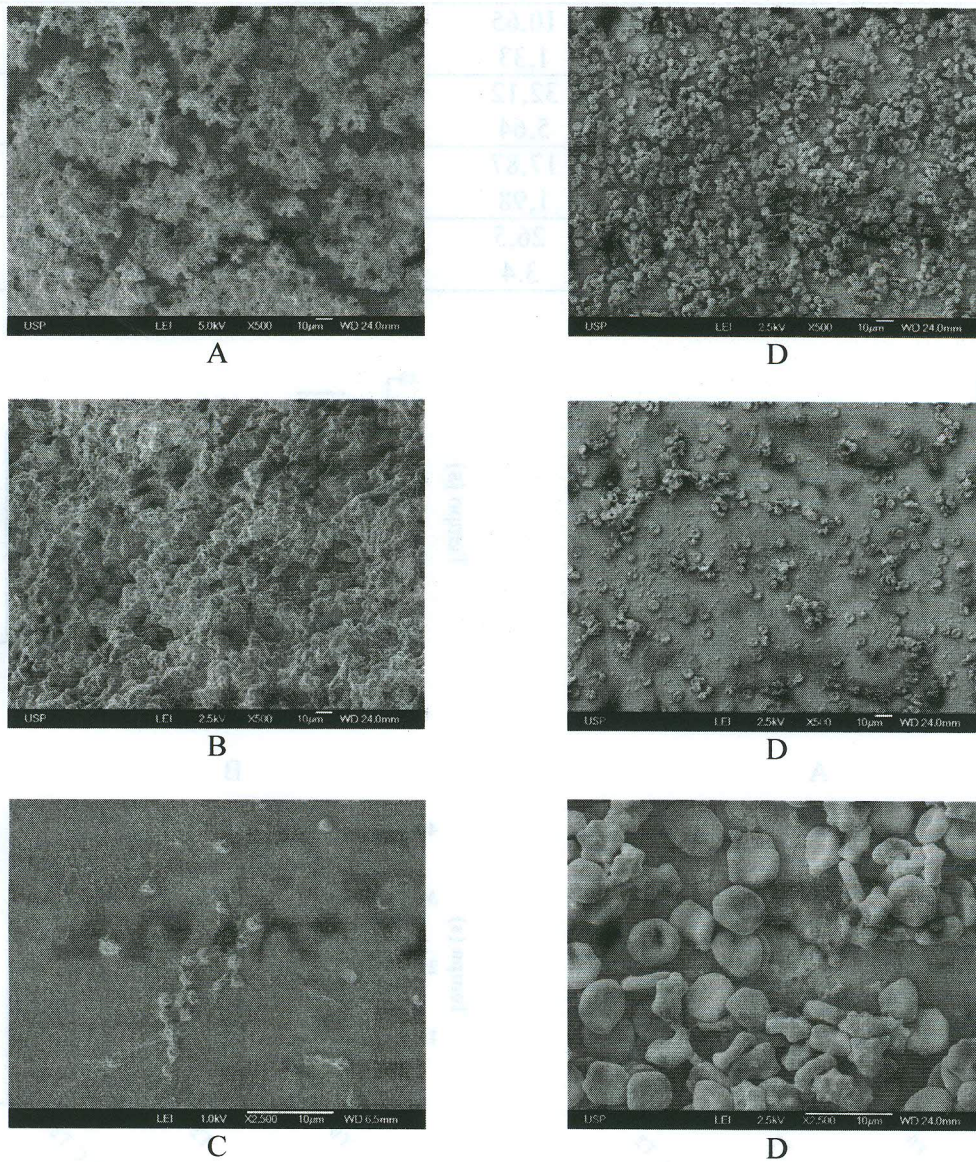


Figura 5 – Fotomicrografia da superfície da substância teste PVC e do controle positivo após 2 h de incubação (T2) no sistema *in vitro* dinâmico.

A – amostra de PVC após contato com sangue de carneiro. Aumento de 500x.

B – amostra de PVC em contato com sangue humano. Aumento de 500x.

C – amostra de PVC em contato com sangue bovino. Aumento de 2500x.

D – amostra do Controle Positivo. Aumento de 2500x e 500x.

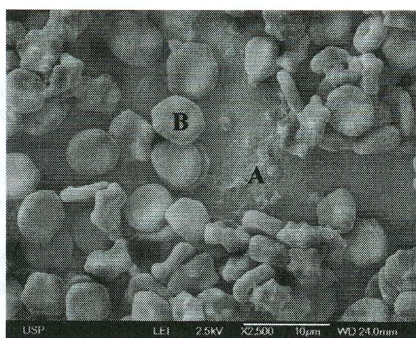


Figura 6 – Fotomicrografia do controle positivo obtida em microscópio eletrônico de varredura (MEV); (A) Plaquetas e (B) Eritrócito. Aumento de 2500x.

Nas “Fig. 5A”, “Fig. 5B”, “Fig. 5C”, foi possível visualizar a presença de plaquetas, com alterações morfológicas, em várias regiões da superfície da substância teste, com a presença de rede de fibrina.

Comparando a substância teste com o controle positivo pode-se observar a presença de eritrócitos, macrófagos e plaquetas rompidas com a presença de fibrina no controle positivo, e na substância teste pode-se observar agregados plaquetários com a presença da rede de fibrina, formando um trombo.

4. CONCLUSÃO

O teste de hemocompatibilidade foi realizado de acordo com os parâmetros da ISO 10993-4. Os resultados encontrados na avaliação hematológica, e no teste de protrombina, mostraram que não houve alteração na estabilidade das amostras de sangue após o período de incubação durante o modelo dinâmico *in vitro*, uma vez que as células do sangue avaliadas permaneceram dentro dos padrões de normalidade e o tempo de protrombina não foi alterado de forma significativa.

Quanto ao teste de trombogenicidade os dados obtidos mostraram que a amostra de PVC, assim como a amostra de vidro utilizada como controle positivo, causaram alteração no comportamento celular, ativando o mecanismo de agregação plaquetária e consequentemente à formação de trombos.

Diante disso conclui-se que o modelo *in vitro* para o estudo de hemocompatibilidade é válido não só para o sangue humano como também para as outras espécies estudadas, para a avaliação da biocompatibilidade de biomateriais que tem contato com o sangue.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Nipro Medical pela disponibilização das amostras de PVC.

REFERÊNCIAS

- Balan, V., Verestiuc, L. (2014), "Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review", 53, 171-188.
- Barbosa, RG et al. (2009), *Fisiopatologia da trombose da veia jugular em equinos: revisão*. Vet e Zootec. v. 16, n.1, mar. 26-37.
- Braune S, Hoenow A, Mrowietz C. (2011), "Hemocompatibility of soft hydrophobic poly(n-butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries". *Clinical Hemorheology and Microcirculation.*, 49, 375-390.
- Freitas, F. (2009), "Avaliação fisiopatológica de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Eimeria stiedae* (apicomplexa: *Eimeriidae*)", Tese de Doutorado, UNESP, Jaboticabal.
- Mohan, CC., Chennazhi, KP., Menon, D. (2013), "In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications", 9, 9568-9577.
- Ratner, BD. (2007), "The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st century", *Biomaterials*, 28, 5144-5147.
- Tannus, LF, Eurides, D, Guimarães, EC, et al (2013), "Avaliação hematológica e bioquímica renal de coelhos sob anestesia no acuponto yintang com tiletamina e zolazepam", *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 16, n. 2, p. 149-153.
- Totea, G., Ionita, D., Demetrescu, I., Mitache, MM. (2014), "In vitro hemocompatibility and corrosion behavior of new Zr-binary alloys in whole human blood+", 12(7), 796-803.

IN VITRO MODEL TEST FOR HEMOCOMPATIBILITY ASSESSMENT ACCORDING TO ISO10993-4

Passos PQS.¹, Feitosa TC.¹, Cunha TF.¹, Medeiros F.^{1,2}, Higa OZ.²

¹Laboratório Biosíntese P&D do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
E-mail: priscila.passos@biosintese.com.br

Abstract. Hemocompatibility test evaluates interactions of an unknown material in contact with the blood, exploiting possible adverse effects due to exposure. The aim of this study was to establish a model for in vitro hemocompatibility test following the guidelines of the International Organization for Standardization (ISO) 10993-4 - Selection of tests for interactions with blood - part 4, comparing blood samples from different species in relation to coagulation, hemolysis, hematocrit values and erythrocytes number. The polyvinyl chloride was tested as reference material. The experiment was conducted in a dynamic system using a water bath where blood samples from rabbit, sheep, bovine and human blood were incubated at 37 ± 2 °C for 120 min, with and without the raw material. The blood samples were analyzed in duplicate at two times: immediately after the withdrawal (T0) and after water bath incubation (T2).

Small variations in the parameter values were observed. The results of coagulation values are within the acceptable standard deviation. The number of erythrocytes and hemoglobin quantification obtained in hematological evaluation were also within normal standards considering the reference values.

It was concluded that there was no significant change in the stability of all blood samples tested during the in vitro dynamic model.

Keywords: In vitro hemocompatibility, Biomaterials, Cardiovascular medical devices.