COLAOB
Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais
22 a 25 de Agosto de 2012 Natal / RN

PADRONIZAÇÃO DO PARÂMETRO DE TROMBOGENICIDADE UTILIZANDO ÍNDICE SEMI-QUANTITATIVO BASEADO NOS EVENTOS CELULARES DA CASCATA DE COAGULAÇÃO

Tatiana F. da Cunha[1], Ana P. Manetta[1], Fabiana M. da Silva[1], Cynara V. Silva[2]
Olga Z. Higa[3]
[1]Laboratório Biosintesis P&D do Brasil LTDA, São Paulo (SP), Brasil
[2]Nipro Medical Brasil, Sorocaba, (SP), Brasil
[3]Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil
E-mail: tatiana@biosintesis.com.br

Resumo. *A biocompatibilidade de dispositivos médicos é orientada por normas internacionais e deve ser avaliada de acordo com a composição do material e com o tempo e ângulo de contato. Para biomateriais que entram em contato com o sangue, são recomendados, testes para determinar sua hemocompatibilidade como por exemplo a avaliação da trombogenicidade da superfície do dispositivo. Com o intuito de padronizar o método de diagnóstico da trombogenicidade, nosso grupo desenvolveu um índice semi quantitativo baseado nos eventos celulares da cascata de coagulação. O ensaio foi conduzido em suínos utilizando modelo ex vivo e com sangue bovino utilizando modelo in vitro. As amostras utilizadas para os ensaios foram fornecidas pela Nipro Medical LTDA. Fragmentos dos dispositivos cardiovasculares foram colocados em contato com sangue e em seguida preparados para visualização da superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os índices foram padronizados de 0 a 4 de acordo com a presença e morfologia das células aderidas na superfície dos biomateriais, sendo 0 o valor do índice para uma superfície não trombogênica e 4, para uma superfície severamente trombogênica. Este método permitiu a padronização e a uniformidade dos diagnósticos de trombogenicidade para biomateriais e dispositivos médicos.*

Palavras-chave: Trombogenicidade de biomaterias, Hemocompatibilidade, Índice para avaliação da trombogenicidade.

1. INTRODUÇÃO

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*". É dividida em 5 parâmetros de avaliação: adesão plaquetária e trombogenicidade, ativação da cascata de coagulação e do sistema complemento, e hematologia. Apesar desse direcionamento da norma "ISO 10993-4 – *Selection of tests for interactions with blood – part 4*" não existem protocolos padronizados para a avaliação desses parâmetros [Ratner, 2007]. Dessa forma, cada laboratório de ensaios não-clínicos e grupos de pesquisa deve padronizar e validar o método para a avaliação dos parâmetros sugeridos pela norma.

Ao entrar em contato com o sangue, o biomaterial pode adsorver em sua superfície proteínas sanguíneas como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, imunoglobulinas e fator de Von Willebrand [Elam et al, 1991]. Essas proteínas são responsáveis pela adesão, ativação e subsequente agregação de plaquetas por meio de

receptores celulares culminando na formação de trombos. A presença de trombos sobre a superfície de biomateriais pode causar o entupimento dos vasos próximos a localização do dispositivo implantado ou então se soltar na corrente sanguínea em forma de êmbolo causando sérios riscos a saúde do paciente [Braune et al, 2011]. Assim, a estimativa do potencial trombogênico dos dispositivos médicos é de extrema importância para a segurança do usuário final.

Fisiologicamente, as plaquetas estão envolvidas no processo de hemostaia que tem função de manter a fluidez do sangue nos vasos e evitar hemorragias após injúria tecidual. O processo de hemostasia está dividido em hemostasia primária, secundária e terciária.

Na hemostasia primária ocorre inicialmente a vasoconstrição primária seguida de adesão plaquetária para formação de um tampão plaquetário inicial. Nesta fase as plaquetas aderem ao local da lesão tecidual por meio de receptores de colágeno, (principalmente do tipo I e III) e de fator de Von Willebrand. A vasoconstrição se dá pela liberação de aminas vasoativas que também estimulam a agregação plaquetária. Ocorre também a ativação do fator XII que inicia a ativação da cascata de coagulação (fase secundária da hemostasia).

Na hemostasia secundária, a ativação da cascata da coagulação gera um processo de reações sequenciais que culmina com a formação de fibrina a partir do fibrinogênio. Os fatores de coagulação são ativados por exposição à tromboplastina tecidual, que é expressada por células endoteliais ou fibroblastos extravasculares. Os fatores são ativados sequencialmente e ampliam o estímulo inicial por retroalimentação.

Quando a cascata é ativada pelo sistema intrínseco, o processo inicia-se pelo contato do sangue com o colágeno do subendotélio ou pelo contato com um corpo estranho. Ocorre a ativação plaquetária e, do fator XII, com subsequente ativação do fator XI. O fator XI ativa o fator IX que por sua vez ativa o fator VIII. Quando a cascata é ativada pelo sistema extrínseco, as reações tem início após a lesão vascular ou exposição ao Fator Tecidual (proteína de membrana do tecido extravascular). O tecido lesado libera tromboplastina que ativa o fator VII.

A sequência tanto do sistema intrínseco quanto do sistema extrínseco, culmina no sistema comum, onde a ativação do sistema extrínseco associado ao fosfolipídeos plaquetários e ao cálcio iniciam o sistema comum pela ativação do fator X que em conjunto com os outros fatores ativam o fator II, protrombina, em trombina (fator II ativado) que converte o fibrinogênio em fibrina. Após esta conversão o fator XIII confere estabilidade à fibrina.

A hemostasia terciária, ou fibrinólise é ativada concomitantemente com a coagulação, processo pelo qual a plasmina degrada a fibrina desfazendo o coágulo formado. Os processos de coagulação e fibrinólise estão fisiologicamente em equilíbrio para garantir a hemostasia [Lopes et al, 2003].

O objetivo deste trabalho foi padronizar um método semiquantitativo para o diagnóstico de trombogenicidade por meio da criação de um índice baseado nos eventos celulares ocorridos durante a cascata de coagulação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Exposição dos biomateriais e dispositivos médicos ao sangue

Para os ensaios conduzidos em modelo *ex vivo*, foram utilizados oxigenadores de membrana, produzidos pela NIPRO MEDICAL, em procedimento de simulação de

cirurgia de circulação extracorpórea em suínos. Foram realizados 33 cirurgias para a avaliação dos oxigenadores de membrana, cada qual com a duração de 90 minutos, dos quais foram tomadas as amostras para a avaliação da trombogenicidade. Foram selecionados 5 (cinco) materiais provenientes das principais peças do equipamento.

Nos ensaios conduzido em modelo in vitro utilizou-se banho-maria *Dubnoff* com agitação horizontal e temperatura entre 36,5 e 37,5°C para mimetizar as condições semelhantes de temperatura e fluxo sanguíneo. Os tubos contendo as amostras do dispositivo médico, já totalmente imersas no sangue total, foram colocados dentro do *Dubnoff* em contato direto com a água e fixados pelas grades do equipamento para evitar a entrada de água no tubo.

2.2 Padronização do índice de trombogenicidade

Após a exposição dos biomateriais foi realizada a lavagem destes com solução salina 0,9%. As plaquetas e demais células do sangue eventualmente aderidas foram fixadas por 10 min em solução de glutaraldeído 2,5%. Após o esgotamento do glutaraldeído, as amostras foram desidratadas pela exposição às seguintes soluções: etanol 50% por 15 minutos, em seguida etanol 75% por 10 minutos e por último, etanol 95% por 5 minutos. Para os oxigenadores de membrana, a etapa da desidratação das peças foi conduzida em estufa a vácuo a 56 °C. Após a finalização do processo de desidratação, todas as amostras foram armazenadas em dessecador a vácuo até serem analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para a avaliação qualitativa do ensaio de trombogenicidade foi proposto um modelo de pontuação utilizando como base os eventos celulares envolvidos no processo fisiológico de formação de coágulos sanguíneos.

Durante esse processo ocorrem eventos celulares que podem ser identificados por MEV, como por exemplo, a conformação típica de plaquetas ativadas (emissão de pseudópodes), a agregação plaquetária, a agregação plaquetária com presença da rede de fibrina e a formação de trombos com presença de hemácias envolvidas por plaquetas ativadas e pela rede de fibrina.

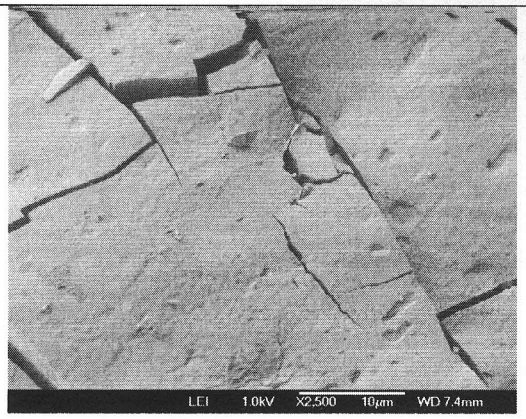
Buscou-se padronizar a classificação das imagens e homogeneizar a análise dos resultados. Dessa forma, foi elaborada a seguinte classificação apresentada na "**Tabela 1**".

Tabela 1 – Caracterização das imagens de fotomicrografia com a pontuação estabelecida para cada grau de trombogenidade.

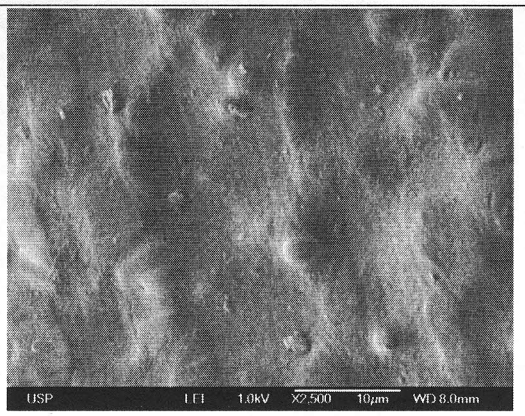
Característica presente nas imagens	Índice atribuído
1. Superfícies que não apresentam adesão de plaquetas	0
2. Superfícies que possuem plaquetas apenas aderidas, mas com conformação normal	1
3. Superfícies com adesão de plaquetas ativadas isoladas	2
4. Superfícies com plaquetas ativadas agregadas	3
5. Superfícies com presença de hemácias envolvidas por plaquetas agregadas e rede de fibrina	4

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

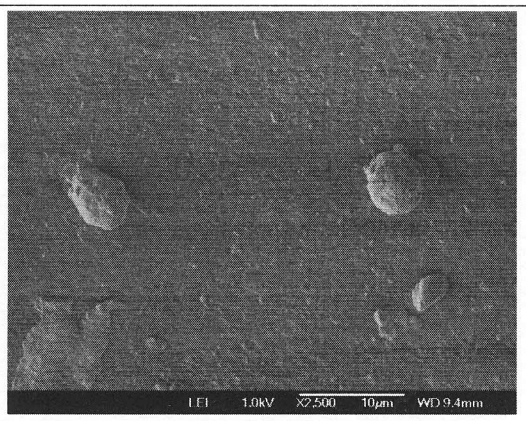
Na "Figura 1" são mostrados alguns exemplos de micrografias obtidas das superfícies e que representam cada índice de trombogenicidade atribuído.



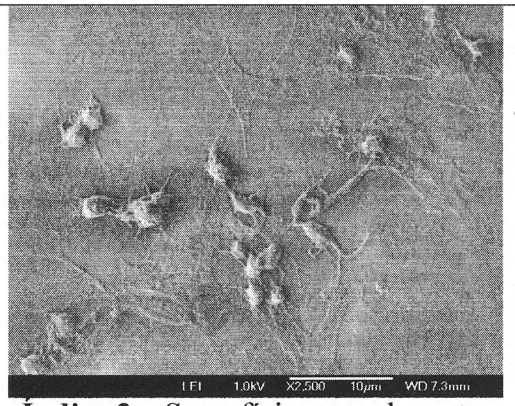
Índice 0 – Superfície sem adesão celular



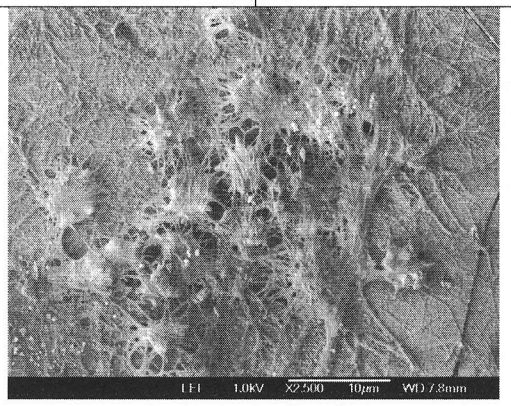
Índice 1 – Plaqueta aderida na superfície com morfologia normal



Índice 2- Superfície com plaquetas ativadas e isoladas



Índice 3 – Superfície com plaquetas ativadas (rompidas) sem formação da rede fibrina e sem adesão de hemácias



Índice 4 – Material plaquetário espraiado com rede de fibrina e hemácias aderidas na superfície.

Figura 1 – Exemplo de micrografias para cada valor de índice estipulado.

Utilizando os mesmos parâmetros descritos na "Tabela 1", as imagens com características celulares próximas ao primeiro estágio da coagulação (plaquetas aderidas sem alteração morfológica) receberam nota 1 e imagens com características celulares próximas ao último estágio da coagulação (plaquetas agregadas, rompidas e envolvidas por rede de fibrina) receberam nota 4. A repetição do ensaio permitiu a uniformização das avaliações para cada nível da escala e permitiu a criação de um índice de trombogenidade para cada biomaterial e oxigenador de membrana testado.

Para evitar a interpretação errônea das micrografias, utilizou-se a confrontação da superfície do material exposto ao sangue contra à do material não exposto, visando excluir imagens próprias da superfície do material que poderiam ser semelhantes ao material celular.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível padronizar um método semiquantitativo para avaliar a trombogenicidade de biomateriais e dispositivos médicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ pelo fomento por meio do projeto RHAE, e a Nipro Medical pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS

Braune, S. Hoenow, A. e 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.

Elam, J. H. e Nygren, H. (1992), "Adsorption of coagulation proteins from whole blood to polymer materials: relation to platelet activation", *Biomaterials*, 13, 3-8.

Lopes-Bezerra, L. M. e Filler, S. G. (2003), "Endothelial cells, tissue factor end infectious diseases", *Brazilian Journal os Medical and Biological Research*, 36, 987-911.

Ratner, B. D. (2007), "The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st century", *Biomaterials*, 28, 5144-5147.

EVALUATION OF THROMBOGENICITY IN MEDICAL DEVICE THROUGH A LABORATORY STANDARDIZATION BASED ON THE COAGULATION CASCADE

Tatiana F. da Cunha[1], Ana P. Manetta[1], Fabiana M. da Silva[1], Cynara V. Silva[2]
Olga Z. Higa[3]
[1]Laboratório Biosintesis P&D do Brasil LTDA, São Paulo (SP), Brazil
[2]Nipro Medical Brazil, Sorocaba, (SP), Brazil
[3]Center of Biotechnology, Institute Energetic and Nuclear Research, São Paulo (SP), Brazil
E-mail: tatiana@biosintesis.com.br

Abstract. The biocompatibility evaluation of medical devices is regulated by international standards and shall be analyzed according to geometry and duration of contact, and material composition. For blood-contact biomaterials, hemocompatibility tests, such as routine blood analysis, analysis of complement and coagulation activation, platelet adhesion and thrombogenicity, are recommended. Aiming to create a semi quantitative and more homogenous analysis of thrombogenicity our group was established a score for each phase of coagulation cascade. Pigs were used in ex vivo

experiments and bovine blood were used for In vitro experiments. The samples used at this work were supplied by Nipro Medical LTDA. The medical devices fragments were put on contact with blood and then, They were prepared to Scaning Eletron Microscopic (SEM) visualisation. The score were standardized from 0 to 4, being 0 the score for non trombogenic surface and 4 the score for severe trombogenic surface. This method allowed better standardization and uniformity of results at hemocompatibility evaluation.

Keywords: First keyword, Second keyword, Third keyword (minimum of three and maximum of five keywords)