

Técnica de preparação do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado*

JOSÉ AMÉRICO BONATTI¹; SAMIR JACOB BECHARA²; NEWTON KARA JOSÉ³; JORGE ALBERTO FONSECA CALDEIRA⁴; MÁRCIA LÚCIA DE MARIO MARIN⁵

INTRODUÇÃO

A conservação de córneas para transplantes pode ser feita através de vários métodos, variando em complexidade de preparo e em tempo durante o qual as córneas permanecem viáveis para transplante. O método de conservação de olho inteiro em câmara úmida a 4° C ainda é o mais utilizado em nosso meio, contudo possui um tempo de utilização muito limitado (cerca de 24 a 36 horas após o óbito), sendo mais seguro utilizá-lo nas primeiras 24 horas após a morte.

Outros métodos, como a técnica de cultura de órgãos⁵, que pode preservar a córnea por cerca de 1 mês, e a criopreservação³, que preserva a córnea por vários meses, são métodos muito dispendiosos e de execução complexa.

Existe, no entanto, um método de conservação de córneas de custo relativamente baixo, cujo tempo de validade se situa entre os acima citados, mantendo a córnea viável por 72 a 96 horas, que é o meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado (Meio M-K modificado) a 4°C^{1, 4, 9, 10}. Este período de conservação da córnea permite seu transporte do local da doação até o hospital onde se realiza a cirurgia, melhor seleção dos receptores, execução da cirurgia em horário de rotina e, mais recentemente, a obtenção dos resultados dos testes para AIDS. Entretanto, a necessidade de importação tem sido um obstáculo a seu uso em nosso meio.

O presente trabalho relata a preparação do meio M-K modificado, realizada na Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O meio M-K modificado foi preparado diluindo-se 1 pacote de meio de cultura de tecidos 199 de peso 11,03 g ("Meio 199 modificado com sais de Hank, com glutamina, sem bicarbonato de sódio para preparo de 1 litro de solução, produzido pela Interlab, sob licença de Lab. Flow Ltda.") e 50 g de dextran de peso molecular 40.000 (marca Pharmacia) em 1 litro de água bidestilada⁶. O meio de cultura de tecidos 199 utilizado contém o indicador de pH vermelho fenol (fenolsulfonftaleína).

Adicionaram-se 3,6 g da substância estabilizadora de pH sintética HEPES[®] ("N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid"; peso molecular 238,3; faixa útil de pH: 6,8 a 8,2; marca registrada de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO 63178, U. S. A.)¹¹.

Foram acrescentados os antibióticos gentamicina, na concentração 200 µg/ml, e polimixina, na concentração 50 µg/ml¹⁸.

Ao final obteve-se uma solução ácida, com pH 5,0 aproximadamente, que foi acertado com NaOH 1N, adicionado em gotas na solução sob agitação contínua, até obter-se pH final 7,4⁶.

O preparo do meio foi feito em ambiente asséptico, sob fluxo laminar de ar, e a esterilização feita através da passagem desta solução por filtro "Milipore" (0,2µm)⁷.

Foi feito controle de esterilidade do meio semeando-se amostras da solução para cultura bacteriana (aeróbica e anaeróbica) e fúngica.

RESULTADO

Obteve-se uma solução límpida cujos valores finais foram pH 7,4 e osmolaridade 290 mOsm/litro.

Os resultados da cultura para contaminação bacteriana e fúngica foram negativos quanto à presença destes microrganismos.

DISCUSSÃO

O meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman (meio M-K) foi originalmente produzido em 1974⁶, utilizando-se meio de cultura de tecidos 199, dextran e como substância tampão bicarbonato de sódio¹. A solução obtida necessitava do gás dióxido de carbono para que se estabelecesse um equilíbrio químico e o pH permanecesse estável, mas a manutenção deste gás no frasco era muito difícil¹⁸.

Em 1978, WALTMAN⁸ e PALMBERG¹¹ introduziram o uso da substância tampão HEPES[®] como substituto para o bicarbonato de sódio, obtendo uma mistura de pH mais estável e dispensando a utilização do gás dióxido de carbono. Este preparado é chamado de meio M-K modificado¹ e foi elaborado neste trabalho. A quantidade preconizada de HEPES[®] e de 15 a 20 mM/l de meio¹¹.

Julgamos importante a utilização do meio de cultura de tecidos 199 com indicador de pH (fenolsulfonftaleína ou vermelho fenol) pois, apesar da estabilidade de pH proporcionada pelo HEPES[®], é um fator de proteção a mais para a utilização segura do meio. Quando, por exemplo, o meio torna-se ácido por contaminação bacteriana, a coloração torna-se amarela. Outro sinal que sugere contaminação é a turvação da solução.

O pH correto do meio é essencial para a preservação do endotélio. BUXTON e colaboradores², estudando 1351 casos de ceratoplastias penetrantes, encontraram 5 casos de falência primária do enxerto (todos de córneas provenientes do mesmo banco de olhos), em que o meio de conservação apresentava um pH alcalino (pH 10,2).

Na preparação do meio, seguindo a orientação da literatura, obtivemos consistentemente uma solução ácida. A cor-

* Do Laboratório de Investigação em Oftalmologia (nº 33)^{1, 2, 3 e 4} e da Divisão de Farmácia⁵ do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1 Médico Colaborador do HCFMUSP e Assistente do HU-USP

2 Médico Assistente

3 Professor Adjunto da USP e Titular da UNICAMP

4 Professor Titular

5 Farmacêutica-Chefe da USP

reção do pH até obter-se o valor 7.4 foi conseguida com a adição de NaOH 1N em gotas, sem prejuízo da osmolaridade.

A adição dos antibióticos gentamicina e polimixina foi baseada em suas propriedades de estabilidade e atividade bactericida contra os microrganismos patogênicos mais comuns⁸.

CONCLUSÃO

Obteve-se uma solução de meio de cultura de tecidos 199, dextran a 5%, HEPES[®] e antibióticos em água destilada, chamada meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado (meio M-K modificado), com pH 7,4 e osmolaridade 290 mOsm/litro, produzido na Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que está de acordo com os padrões estabelecidos na literatura^{6, 8, 11}.

Após o resultado negativo no exame de cultura para detecção de contaminação bacteriana e fúngica, o meio passou a estar disponível para utilização, que, de início, será experimental, a fim de se estudar sua eficácia na conservação de córneas; posteriormente, se eficaz, será utilizado clinicamente na conservação de córneas humanas para transplantes.

Atualmente a exigência do teste para AIDS no doador é um fator a mais que pode retardar a execução do transplante por períodos superiores a 24 horas. Tal fato aumenta a necessidade de se ter à disposição um método de conservação de córneas de duração mais prolongada, como o meio que preparamos, que mantém o endotélio corneano em condições funcionais adequadas por 72 a 96 horas^{1, 4, 9, 10}.

RESUMO

Este trabalho relata a técnica de preparação do meio de conservação de córneas de McCarey-Kaufman modificado na Divisão de

Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (meio "MMK-HC"), tendo-se obtido um meio que está de acordo com os padrões estabelecidos na literatura.

SUMMARY

The authors report a technique of preparation of the modified McCarey-Kaufman medium, produced at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, according to the patterns established in the literature.

REFERÊNCIAS

1. BRIGHTBILL, F. S. — Tissue Storage: Short term comparison of methods and results. In Brightbill, F. S., *Corneal Surgery*. St. Louis: The C. V. Mosby Co., 1986: pp. 75-78.
2. BUXTON, J. N.; SEEDOR, J. A.; PERRY, H. D.; EAGLE, R. C. & PECEGO, J. — Donor failure after corneal transplantation surgery. *Cornea*, 7: 89-95, 1988.
3. CAPELLA, J. A.; KAUFMAN, H. E.; ROBBINS, J. E. — Preservation of viable corneal tissue. *Cryobiology*, 2: 116, 1965.
4. CASEY, T. A. & MAYER, D. J. — The organisation of an eye bank. In CASEY, T. A. & MAYER, D. J. *Corneal Grafting*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1984: p. 82.
5. DOUGHMAN, D. J.; HARRIS, J. E.; SCHMITT, M. K. — Penetrating keratoplasty using 37°C organ culture cornea. *Ophthalmology*, 81: 778-793, 1976.
6. MCCAREY, B. E. & KAUFMAN, H. E. — Improved corneal storage. *Invest. Ophthalmol.*, 13: 165-173, 1974.
7. POLACK, F. M. In: POLACK, F. M. — *Corneal Transplantation*. New York: Grune & Stratton, 1977: p. 240.
8. SCHIMMELPFENNIG, B. H. — In: BRIGHTBILL, F. S. — *Corneal Surgery*. St. Louis: The C. V. Mosby Co., 1986: p. 67.
9. STARK, W. J.; MAUMENEE, A. E.; KENYON, K. R.: Intermediate-term corneal storage for penetrating keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol.*, 79: 795-802, 1975.
10. VAN-HORN, D. N.; SCHULTZ, R. O.; DeBRUIN, J. — Endothelium survival in corneal tissue stored in M-K medium. *Am. J. Ophthalmol.*, 80: 642-647, 1975.
11. WALTMAN, S. R. & PALMBERG, P. F. — Human penetrating keratoplasty using modified M-K medium. *Ophthalmic Surg.*, 9: 48, 1978.

RESUMO DE ARTIGOS PUBLICADOS NO EXTERIOR POR AUTORES BRASILEIROS

Split lengthening of the inferior oblique muscles *

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (1988) 226: 181-182

HENDERSON C. ALMEIDA and MIGUEL A. G. ALVARES

Split lengthening of the inferior oblique muscle(s) was performed in 20 patients for the correction of V-pattern, employing bilateral or unilateral surgery. In four patients unilateral split lengthening of the inferior oblique was done for the correction of hypertropia. The

average correction of V-pattern was 16.9 pd with bilateral surgery and 13.3 pd with unilateral surgery. The average correction of hypertropia was 11.8 pd with only unilateral surgery.

* Dedicated to Dr. G. K. von Noorden on the occasion of his 60th birthday
Offprint requests to: H. C. Almeida — Department of Ophthalmology, UFMG Medical School, Belo Horizonte MG, Brasil

Unilateral Pigmentary Retinopathy Associated With Ocular Toxoplasmosis

Amer. J. Ophthalmol., 107: 682-4, 1989

CLAUDIO SILVEIRA, M. D., RUBENS BELFORT, Jr., M. D., ROBERT NUSSENBLATT, M. D., MICHEL FARAH, M. D., WALTER TAKAHASHI, M. D., PAULO IMAMURA, M. D., and MIGUEL BURNIER, Jr., M. D.

Inquiries to Rubens Belfort, Jr., M. D., Caixa Postal 4086, 01051 - São Paulo, Brazil.