

Preparação, estabilidade e conservação do fator tecidual ativador de plasminogênio (rt-PA) para uso oftalmológico

Preparation, stability and storage of tissue plasminogen activator for ophthalmological purpose.

Juliana M. Ferraz Sallum ⁽¹⁾

Isabel Batista ⁽²⁾

Acácio Alves Souza Lima Filho ⁽³⁾

Michel Eid Farah ⁽⁴⁾

Rubens Belfort Jr. ⁽⁵⁾

RESUMO

Introdução: O fator tissular ativador do plasminogênio, um componente do sistema fibrinolítico, ativa o plasminogênio em plasmina, que degrada a rede de fibrina. O t-PA recombinante (rt-PA) tem sido utilizado em oftalmologia para diminuir as complicações fibrino-proliferativas pós-operatórias. A preparação comercial excede a dose preconizada para uso oftalmológico e o custo por injeção poderia ser reduzido se o produto fosse dividido em doses.

Objetivo: Avaliar se o rt-PA, para uso cardiológico, pode ser diluído e utilizado em oftalmologia, se a atividade é mantida após estocagem e, eventualmente determinar quais os melhores métodos de estocagem e de utilização.

Materiais e métodos: Este trabalho estudou a atividade inicial do rt-PA em placa de fibrina, a atividade residual, após 6 meses de conservação em freezer à -20°C e à -70°C; e ainda a esterilidade do material.

Resultados: A atividade residual após 6 meses de conservação em freezer à -70°C foi 40,7% da atividade inicial e em congelador de geladeira à -20°C foi 34,9%. Se descongelado e deixado à temperatura ambiente 24 horas antes de ser testado a atividade residual cai para 27,9%.

Conclusão: O rt-PA manteve-se estéril após 6 meses, independente da forma de estocagem. A melhor forma de conservação foi o freezer à -70°C. A utilização do rt-PA deve ser portanto imediata após o descongelamento.

Palavras-chave: Fator tecidual ativador de plasminogênio (t-PA); Fibrinólise; Fibrina; Inflamação.

INTRODUÇÃO

A fibrinólise é um sistema enzimático plasmático fisiológico capaz de dissolver a rede de fibrina de um coágulo e restaurar o fluxo sanguíneo de um vaso. O fator tissular ativador do plasminogênio, um componente do sistema fibrinolítico, por proteólise, ativa o plasminogênio em plasmina. A plasmina degrada a rede de fibrina insolúvel, que compõe o coágulo, em

produtos solúveis (DAVIDSON & WALKER, 1980).

A sequência de DNA que codifica os 527 aminoácidos do fator tissular ativador de plasminogênio humano (t-PA), foi isolada de células de melanoma (RIJKEN & COLLEN, 1981). PENNICA et al., 1983 prepararam plasmídios com esta seqüência para inclusão em *Escherichia coli* e, utilizando técnicas de DNA recombinante sintetizaram um peptídeo com as características do t-PA humano.

Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

⁽¹⁾ Pós-graduanda do Departamento de Oftalmologia, Instituto da Visão, da UNIFESP-EPM.

⁽²⁾ Bioquímica da Disciplina de Bioquímica da UNIFESP-EPM.

⁽³⁾ Farmacêutico responsável pela farmácia Ophthalmos, São Paulo.

⁽⁴⁾ Professor Adjunto do Departamento de Oftalmologia, Instituto da Visão, da UNIFESP-EPM.

⁽⁵⁾ Professor Titular e Chefe do Departamento de Oftalmologia, Instituto da Visão, da UNIFESP-EPM.

Endereço para correspondência: R. Botucatu, 822 - São Paulo - 04023-062 - Tel: (011) 572 7713 Fax: (011) 573 4002.

Algumas drogas ativadoras do plasminogênio como a estreptoquinase, uma proteína bacteriana e a uroquinase, isolada da urina humana são utilizadas na terapêutica trombolítica, principalmente na terapia das coronariopatias. A fibrinólise com estas drogas, no entanto, ativa o plasminogênio sistêmico e provoca digestão indiscriminada dos fatores da coagulação, aumentando o risco de hemorragias durante o tratamento (AGNELLI et al., 1985).

Este t-PA recombinante (rt-PA), produzido por engenharia genética, é indistinguível do t-PA, extraído dos tecidos humanos e não é antigênico. Por esse motivo pode ser utilizado repetidas vezes sem que ocorra resistência, ou reações alérgicas, como ocorre com a estreptoquinase. O rt-PA apresenta maior afinidade com a fibrina, e por apresentar reação enzimática de superfície, necessita da superfície do coágulo de fibrina para agir, o que explica seu efeito apenas local, sem ativação sistêmica do plasminogênio, o que o torna mais específico e seguro (CRABBE & CLONINGER, 1987).

Aspectos práticos e econômicos dificultaram o estudo desta droga em oftalmologia. Os produtos, comercialmente disponíveis, para uso cardiológico contêm 20 ou 50mg de rt-PA liofilizado e um frasco de diluente (água destilada) contendo 50ml. O fabricante recomenda que a droga seja utilizada, se conservada a 22°C, dentro de 8 horas após reconstituição e dentro de 24 horas, se em geladeira. A preparação para uso cardiológico excede em muito a dose preconizada para uso oftalmológico e o custo por injeção poderia ser sensivelmente reduzido se o produto liofilizado fosse diluído e dividido em múltiplas doses, desde que o rt-PA permanecesse estável durante períodos de estocagem mais longos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o rt-PA, para uso cardiológico, pode ser diluído e utilizado em oftalmologia, se a atividade é mantida após

estocagem e, eventualmente determinar quais os melhores métodos de estocagem e de utilização.

Para responder a estas perguntas o presente trabalho analisou:

- A atividade dose dependente “in vitro” do rt-PA.
- A atividade residual do rt-PA após seis meses da diluição, conservando em freezer à -70°C e em congelador à -20°C.
- A atividade residual do rt-PA estocado por 6 meses em congelador de geladeira à -20°C, e conservado à temperatura ambiente por 24 horas antes de ser testado.
- A esterilidade do rt-PA, após 6 meses de conservação à -20°C e à -70°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

O rt-PA foi preparado de acordo com JAFFE; GREEN & ABRAMS, 1989, a partir da preparação comercial para uso cardiológico do rt-PA, (Actilyse 20 mg, Boehringer De Angeli Quim. e Farm. Ltda). Este rt-PA apresentava 500.000 UI/mg (JAFFE et al., 1989).

Inicialmente o rt-PA liofilizado para uso cardiológico foi reconstituído no seu diluente de acordo com a indicação do fabricante. As diluições sucessivas foram feitas em solução salina balanceada na proporção de 1:4 realizadas com técnica estéril em capela com fluxo laminar. Foram imediatamente divididas em várias alíquotas, embaladas e congeladas em frascos ampola estéreis, contendo 0,3 ml ou 0,5 ml de rt-PA na concentração de 25 µg / 0,1 ml. A técnica de congelamento utilizada foi a congelamento natural em freezer -70°C ou em congelador de geladeira à -20°C.

Foi realizado teste “in vitro” do material, logo após diluição, para determinação da atividade inicial do rt-PA. A atividade foi medida em placa de fibrina, para três doses: 2,5 µg; 5 µg e 7,5 µg correspondentes a um volu-

me de 30 µl do rt-PA nas diluições 8 µg/0,1 ml, 16 µg/0,1 ml, e 25 µg/0,1 ml respectivamente. As placas de fibrina foram preparadas com solução de fibrinogênio humano a 1,0mg/ml e trombina a 20 UI/ml, agitadas para espalhar e precipitar homogeneamente nas placas de Petri, formando uma malha de fibrina.

Foram inoculados três pontos em cada uma das placas mantidas então em estufa à 37°C por uma hora. As placas foram então retiradas da estufa e a atividade foi interrompida com adição de solução de ácido tricloroacético. Os halos de lise da malha de fibrina da placa, considerados como correspondentes à área de difusão e atividade lítica do rt-PA, foram medidos em dois diâmetros perpendiculares, com a utilização de um paquímetro manual. Foram calculadas as áreas dos halos de lise e construído um gráfico da área de lise da placa por dose de rt-PA, e a partir deste gráfico calculada a atividade do rt-PA inicial por unidades internacionais da droga.

Cinquenta frascos foram armazenados durante seis meses das seguintes formas: 25 frascos em freezer (Forma Scientific Inc.® à temperatura de -70°C com a temperatura monitorizada por gráficos automáticos, controle da abertura da porta do freezer e garantia de gerador elétrico); e 25 em congelador de geladeira duplex Brastemp quality 440 à temperatura de -20°C, com garantia de gerador.

Após seis meses foram realizados novos testes em placa de fibrina para determinação da atividade residual. Foram testados três lotes de rt-PA, segundo a forma de conservação: em freezer à -70°C, em congelador de geladeira à -20°C e conservado em congelador de geladeira e em seguida retirado do congelador descongelado e mantido à 24°C, 24hs antes de ser testado.

A atividade nos três lotes foi testada em placas de fibrina utilizando-se a

mesma técnica descrita para o material inicial. Foram inoculadas nas placas três doses (2,5 µg; 5 µg e 7,5 µg) para cada um dos três lotes de rt-PA. Foram então construídas curvas de atividade dos três lotes de rt-PA de acordo com as doses. A atividade nos três lotes foi calculada e apresentada como porcentagem da atividade do material inicial. Isto é, o rt-PA inicial foi considerado como 100% de atividade com 500.000 UI/mg.

Para a pesquisa de microrganismos, amostras destes grupos foram semeadas em placas de ágar sangue, ágar chocolate e ágar Saboraud e observadas diariamente por 10 dias consecutivos.

RESULTADOS

A figura 1 mostra o experimento com a primeira placa de fibrina, onde a atividade do rt-PA logo após a diluição foi medida, nas três doses de rt-PA: 2,5 µg; 5 µg e 7,5 µg.

Os valores de atividade do rt-PA conservado nos três métodos de acordo

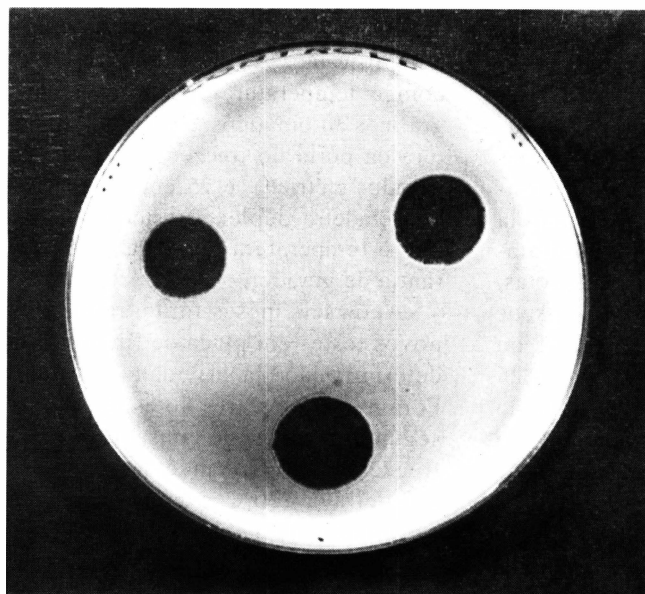


Fig. 1 - A placa controle mostra a atividade inicial do rt-PA imediatamente após a diluição nas doses 2,5 µg; 5 µg e 7,5 µg, correspondentes a um volume inoculado de 30 µl do rt-PA nas diluições 8 µg / 0,1 ml, 16 µg / 0,1 ml, e 25 µg / 0,1 ml respectivamente.

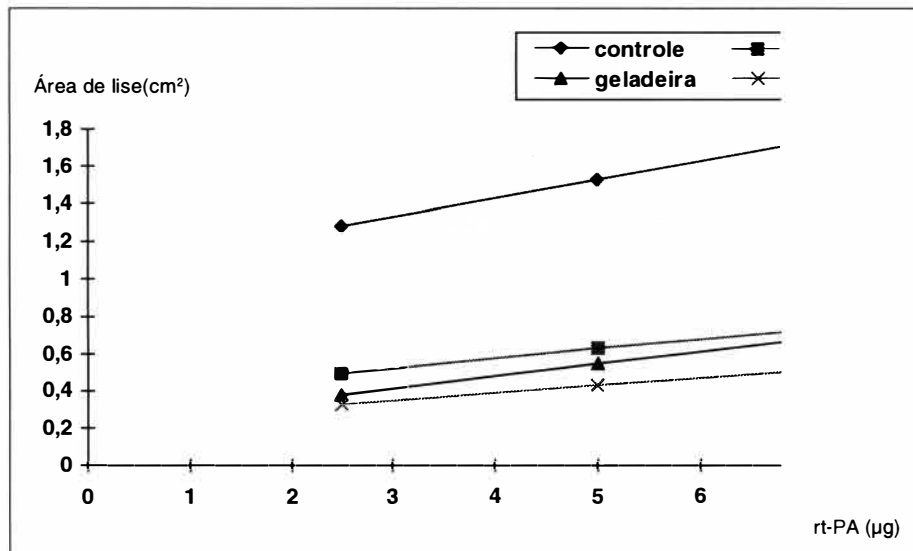


GRÁFICO 1 - Área (cm²) de lise da placa de fibrina por dose de rt-PA (ug), para cada método de conservação do rt-PA.

com as doses, encontram-se apresentadas no gráfico 1.

Os resultados deste trabalho mostraram que a atividade residual após 6 meses de conservação em freezer à -70°C é 40,7% e em congelador de geladeira à -20°C foi 34,9%. Se descongelado e deixado à temperatura ambiente 24 horas antes de ser testado, a atividade residual caiu para 27,9%. Estes valores são proporcionais a atividade inicial do rt-PA comercial 500.000 UI/mg, que apresenta 100% de atividade (Tabela 1).

Todas as culturas permaneceram negativas por todo o período de observação de 10 dias.

DISCUSSÃO

JAFFE et al., 1989 descreveram que o rt-PA perde pouca atividade após seis meses de armazenamento em

freezer à -70°C. Entretanto os valores de atividade medidos neste trabalho mostram que ocorre perda significativa da atividade. E que a perda é maior quando a temperatura de estocagem é mais elevada.

Não houve contaminação bacteriana ou micótica do material. O rt-PA manteve-se estéril após 6 meses, independente da forma de estocagem.

Portanto a melhor forma de conservação foi o congelamento em freezer à -70°C, que manteve 40% de atividade e verificou que a utilização do rt-PA deve ser imediata, após o descongelamento.

A literatura indica posologias variando de 3 µg a 25 µg para uso intra-ocular (IRVINE et al., 1991). Mas trabalhos recentes sugerem que o efeito terapêutico do rt-PA é obtido mesmo com baixas doses, portanto é provável que o rt-PA, mesmo quando estocado, ainda mantenha atividade suficiente para se

TABELA 1

Atividade do rt-PA para cada um dos três métodos de conservação, calculada e apresentada como porcentagem da atividade do material inicial.

	Atividade
Controle Inicial, logo após a diluição	100%
Freezer à -70°C	40,7%
Congelador à -20°C	34,9%
Temperatura ambiente 24 hs antes	27,9%

conseguir o efeito terapêutico desejado. BOLDT et al., 1992 indicaram que a menor dose efetiva do rt-PA para lise de fibrina pós vitrectomia é 3 µg.

O rt-PA para uso cardiológico pode ser diluído e utilizado em oftalmologia, mas a atividade diminui após estocagem, devendo-se ter o cuidado para usá-la imediatamente.

SUMMARY

Introduction: The tissue plasminogen activator (t-PA), a fibrinolytic system component, activates the plasminogen into plasmin, which degrades the fibrin net. The recombinant tissue plasminogen activator has been used in ophthalmology to control the post-operative fibrin formation complications. The commercial t-PA available has a higher dose than necessary in ophthalmology. If it can be shared in doses the costs will be reduced.

Purpose: To check if the commercial rt-PA, for cardiologic use, can be

diluted and used in ophthalmology, and if the activity remains after storage, and eventually determine the best storage and utilization methods.

Material and methods: The rt-PA initial lytic activity was studied on fibrin net substrate, and residual activity after long term storage at -20°C and -70°C. The material sterility was tested in culture plates.

Results: The rt-PA activity after 6 months storage at -70°C was 40,7% of non storage rt-PA activity, and at -20°C it was 34,9%. Samples kept at -20°C for 6 months and then left at room temperature 24 hours before testing, showed an activity of 27,9%. No contamination was found in any sample.

Conclusion: The best way tested of storage rt-PA is at -70°C. And in order to keep the total potential activity, it should be used immediately after defrost.

Key words: Tissue plasminogen activator, fibrinolysis, fibrin, inflammation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGNELLI, G.; BUCHANAN, M.; FERNANDEZ, F.; BONEU, B.; VAN RYN, J.; HIRSH, J.; COLLEN, D. - A comparison of the thrombolytic and hemorrhagic effects of the tissue-type plasminogen activator and streptokinase in rabbits. *Circulation*, **72**: 178-182, 1985.
2. BOLDT, H. C.; ABRAMS, G. W.; MURRAY, T. G.; HAN, D. P.; MIELER, W.F. - The lowest effective dose of tissue plasminogen activator for fibrinolysis of postvitrectomy fibrin. *Retina*, **12**: S75-S79, 1992.
3. CRABBE, S. J. & CLONINGER, C. C. - Tissue plasminogen activator: A new thrombolytic agent. *Clin Pharm.* **6**: 373-386, 1987.
4. DAVIDSON, J. F. & WALKER, I. D. - Biological role of fibrinolysis. *J. Clin. Pathol.*, **33**: 1-47, 1980.
5. IRVINE, W. D.; JOHNSON, M. W.; HERNANDEZ, E.; OLSEN, K. - Retinal Toxicity of Human Tissue Plasminogen Activator in Vitrectomized Rabbit Eyes. *Arch Ophthalmol*, **109**: 718-722, 1991.
6. JAFFE, G. J.; GREEN, G. D. J.; ABRAMS, G. W. - Stability of recombinant tissue plasminogen activator. *Am. J. Ophthalmol.*, **108**: 90-91, 1989.
7. PENNICA, D.; HOLMES, W. E.; KOHR, W. J.; HARKINS, R. N.; VEHAR, G. A.; WARD, C. A.; BENNETT, W. F.; YELVERTON, E.; SEEBURG, P.; HEYNEKER, H. L.; GOEDEL, D. V. - Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, **301**: 214-221, 1983.
8. RIJKEN, D. C. & COLLEN, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**: 7035-7041, 1981.

VII SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE GLAUCOMA

8 a 10 de Maio de 1997

Hotel Transamérica - São Paulo

Convidados Internacionais confirmados:

- M. Bruce Shields (EUA)
- Juhani Airaksien (Finlândia)
- Alon Harris (EUA)
- Richard Wilson (EUA)
- Anja Tuulonen (Finlândia)

Informações: S. H. Congressos e Eventos

Rua Itamirindyba, 1 - 05429-060 - S. Paulo - SP

Tel.: (011) 815-4319 - 814-9470 - Fax: (011) 210-6410