



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE.

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS.

**Utilização intracoágulo de espuma fibrinolítica -
Preparação, caracterização e atividade *in vitro* de uma
espuma de estreptoquinase e proposta de uma nova
abordagem terapêutica.**

Abdo Farret Neto

Orientadora: Professora Fernanda Nervo Raffin.

**NATAL - RN
2014**

**Utilização intracoágulo de espuma fibrinolítica - Preparação,
caracterização e atividade *in vitro* de uma espuma de
estreptoquinase e proposta de uma nova abordagem
terapêutica.**

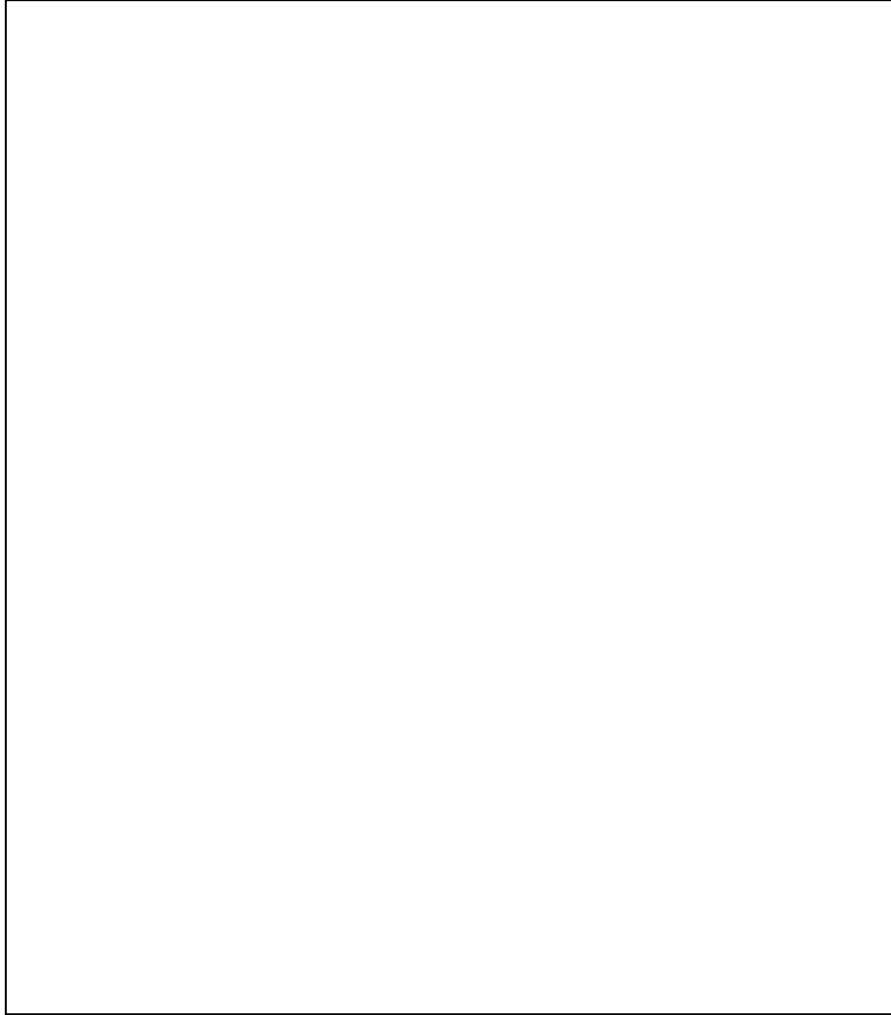
Abdo Farret Neto

Tese submetida para requerer o Título de Doutor
em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em
Medicamentos.

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte (UFRN).

Orientadora: Professora Fernanda Nervo Rafin.

**NATAL - RN
2014**



É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

*Obstacles are those frightful things you see when
you take your eyes off your goals.*

Anonymous

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa e filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram neste projeto e em especial ao Doutor Eduardo Pereira Azevedo sem o qual não teria chegado até aqui, e a minha orientadora Doutora Fernanda Nervo Raffin.

Agradeço também as enfermeiras Rosi M. Miguel e Célia Guedes, pelo apoio na pesquisa prática, e ao meu filho Luiz Faillace Farret, pela concepção artística e desenvolvimento das figuras contidas nesta tese.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADRO.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
APRESENTAÇÃO.....	vii
CAPÍTULO I (Considerações iniciais).....	01
1.1 Coagulação e Trombose.....	01
1.2 Eventos cardiovasculares.....	02
1.3 Profilaxias.....	02
1.4 Fibrinólise natural.....	03
1.5 Fibrinolíticos.....	04
1.5.1 Estreptoquinase (SK).....	04
1.5.2 Uroquinase (UK).....	05
1.5.3 Ativador tecidual do plasminogênio (t-PA).....	06
1.5.4 Outros fibrinolíticos.....	07
1.6 Utilizações clínicas dos fibrinolíticos.....	08
1.7 Vias de administração dos fibrinolíticos e sistemas de trombo Aspira- ção.....	09
1.7.1 Intravenosa sistêmica.....	09

1.7.2 Intravenosa por cateter peritrombo.....	10
1.7.3 Intratrombo.....	10
1.7.4 Fibrinólise intratrombo contínua.....	10
1.7.5 <i>Pulse spray</i>	11
1.7.6 Fibrinólise associada a métodos mecânicos.....	11
1.8 Efeitos adversos dos agentes fibrinolíticos.....	14
1.9 Proposta de estudo terapêutico.....	16
CAPÍTULO II (O dispositivo proposto).....	17
2.1. Revisão da literatura.....	17
2.1.1. Espumas como meio de realce para exames ultrassonográficos.....	17
2.1.2. CO ₂ como meio de contraste angiográfico.....	18
2.1.3. Espumas em escleroterapia venosa.....	19
2.1.4. Outros métodos propostos para aumentar a eficácia dos fibrinolíticos.....	21
2.1.5. Outros usos sugeridos e o futuro das microbolhas.....	22
2.2. Concepção do dispositivo, protótipo e patente requerida.....	23
2.2.1. A patente requerida.....	24
2.3. Discussão.....	31
CAPÍTULO III (A formulação da espuma).....	33
3.1. Revisão da literatura.....	33

3.1.1. Conceitos.....	33
3.1.2. Aspectos estruturais das espumas.....	34
3.1.3. Agentes espumantes surfactantes.....	37
3.1.4. Métodos de produção e estabilização.....	39
3.1.5. Métodos de caracterização das espumas.....	40
3.2. Materiais e Métodos.....	45
3.2.1. Preparação das espumas.....	45
3.2.2. Caracterização das espumas.....	48
3.2.3. Obtenção dos coágulos para os testes <i>in vitro</i>	49
3.2.3. Modelo <i>in vitro</i>	50
3.2.4. Observação do efeito trombolítico.....	51
3.3. Análise estatística.....	52
3.4. Resultados.....	53
3.5. Discussão.....	60
CAPÍTULO IV.....	65
Considerações finais.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	71
CURRÍCULO LATTES – Produção científica no período (2009-2014)	Anexo I
PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DO P. DE PESQUISA.....	Anexo II

Lista de Figuras

Figura 01: Representação esquemática do funcionamento do cateter de Trellis®	12
Figura 02: Representação do sistema de tromboaspiração proposto pelo autor em 2000.....	13
Figura 03: Esquema de funcionamento por aspiração de Venture dos cateteres tipo AngioJet® e o Hidrolyser®	14
Figura 4.1: Conjunto de figuras relativas à patente solicitada.....	26
Figura 4.2: Seringas conectadas pelo conector.....	27
Figura 4.3 A e B: Processo de mistura das fases pelo movimento de vai e vem entre as seringas conectadas pelo conector.....	27
Figuras 4.4 e 4.4-A: Processo de confecção da espuma concluído.....	28
Figura 05: Desenho demonstrando as bordas de Plateau e junções.....	36
Figura 06: Estabilidade da espuma em cilindro volumétrico.....	48
Figura 07: Coágulo após lavagem com soro fisiológico.....	50
Figura 08: Cateter de fibrinólise com ponta modificada.....	50
Figura 09: Espuma obtida pelo método proposto por Tessari.....	54
Figura 10: Influência da taxa de CO ₂ : sol. de albumina na estabilidade das espumas.....	55
Figura 11: Influência da taxa de CO ₂ : sol. de albumina sobre a viscosidade aparente das espumas.....	56
Figura 12: Influência da taxa de CO ₂ :sol. de albumina em relação à viscosidade das espumas.....	57
Figura 13: Determinação das viscosidades das espumas com e sem adição de estreptoquinase. Método de cisalhamento.....	58
Figura 14: Gráfico box-plot com os dados do % de lise por grupo.....	59

Lista de Quadro

Quadro 01 – Contra indicações ao uso de fibrinolíticos.....	15
--------------------------------------------------------------------	-----------

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Composição das espumas nas diferentes razões estudadas.....	46
--------------------------------------------------------------------------------	-----------

Tabela 02 - Estatísticas descritivas e teste estatístico referente ao % lise, por grupo.....	59
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

RESUMO

As trombozes vasculares representam doenças potencialmente fatais, sendo permanente a busca por fármacos eficazes e seguros para tratá-las. Novas técnicas e medicamentos tentam obter a fibrinólise sem a ocorrência de complicações hemorrágicas. Os fibrinolíticos não são isentos de tais complicações, e suas diluições aquosas não permitem uma longa permanência no local do trombo. Escleroterapias venosas têm seu efeito aumentado quando aplicadas na forma de espumas. Estas são mais viscosas que as soluções aquosas permitindo aos agentes esclerosantes permaneçam maior tempo em contato com o endotélio. Assim, uma espuma foi desenvolvida para acrescentar uma nova forma de veiculação de fibrinolítico, aumentando a área de contato e o tempo de permanência junto ao trombo acarretando maior eficiência terapêutica. Utilizando-se doses menores de fibrinolítico os potenciais hemorrágicos serão diminuídos. A espuma fibrinolítica foi criada com CO₂, albumina humana e estreptoquinase. Testes com diferentes razões de fases gás/líquido, de estabilidade e viscosidade aparente foram realizados para caracterização das espumas e escolha da mais estável. A estreptoquinase em doses reduzidas (100.000 UI/mL) foi utilizada como fibrinolítico veiculado em um mL de espuma e na solução salina isotônica (0,9%). A espuma sem fibrinolítico também foi utilizada como comparativo. Testes *in vitro* foram realizados utilizando-se coágulos frescos, secados, pesados, e colocados em tubos de ensaio e mantidos a 37°C. A espuma fibrinolítica e a solução fibrinolítica preparada pela diluição com solução salina isotônica foram testadas por aplicação intracoágulo em doses idênticas através de cateter multiperfurado e pistola de injeção. Os resultados *in vitro* evidenciaram que a espuma trombolítica apresentou atividade lítica de $44,78 \pm 9,97\%$, enquanto as mesmas doses da estreptoquinase em

solução salina isotônica promoveram $32,07 \pm 3,41\%$ de lise dos *coágulos*. Na espuma sem fibrinolítico a redução do trombo foi de $19,2 \pm 7,19\%$. Conclui-se que a espuma fibrinolítica pode potencializar o efeito fibrinolítico da estreptoquinase, quando comparado ao efeito da solução preparada com solução salina podendo ser uma alternativa promissora nos tratamentos das trombooses. Os dados obtidos sinalizam para necessidade de estudos *in vivo* para comprovação dos obtidos nos *in vitro*.

Palavras Chaves: Albumina Sérica; Emulsões; Espumantes; Estreptoquinase; Fibrinólise; Fibrinolíticos; Substâncias Viscoelásticas; Terapia Fibrinolítica; Terapia Trombolítica; Trombólise Terapêutica; Veículos Farmacêuticos.

ABSTRACT

Vascular thrombosis represents a group of potentially fatal diseases, where there is a constant search for effective and safe drugs to treat them. New techniques and drugs try to obtain fibrinolysis without the occurrence of bleeding complications. Fibrinolytics are not exempt from such complications, and its aqueous dilutions do not allow a long stay at the site of thrombus. Venous sclerosis therapies have their enhanced effect when applied in form of foams. These are more viscous than aqueous solutions enabling sclerosing agents remain longer in contact with the endothelium. Therefore, foam was developed to add a novel vehicle for fibrinolytic, increasing the contact area and the length of stay with the thrombus resulting in greater therapeutic efficacy. Using smaller doses of fibrinolytic potential bleeding will be reduced. Fibrinolytic foams were prepared using CO₂ and human albumin (at different v:v ratios), as the gas and liquid phases, respectively, and streptokinase (at a dose of 100,000 IU/mL) as the fibrinolytic agent. The foams were characterized as foam stability and apparent viscosity. *In vitro* tests were conducted using fresh thrombi, dried, weighed, and placed in test tubes and kept at 37 ° C. The *in vitro* thrombolytic effect of the fibrinolytic foam was compared to that of a fibrinolytic solution, which as prepared using the same dose of streptokinase. The foam without fibrinolytic was also used for comparison. Both foams and solution were injected intrathrombus using a multiperforated catheter. The results showed that the streptokinase foam showed a lytic activity of $44,78 \pm 9,97\%$, whereas the same streptokinase dose prepared in solution presented $32,07 \pm 3,41\%$ of thrombus lysis. In no fibrinolytic foam group reducing thrombus was $19,2 \pm 7,19\%$. We concluded that administering streptokinase as a foam could enhance its fibrinolytic effect of compared to that of a streptokinase solution, which indicates that the albumin:CO₂ foam

represents a promising alternative to the conventional solutions for the treatment of thrombosis. However, *in vivo* studies are needed in order to corroborate the results obtained *in vitro*.

Key Words: Serum Albumin; Emulsions; Fibrinolysis; Fibrinolytic agents; Fibrinolytic Therapy; Foaming Agents; Pharmaceutical Vehicles; Streptokinase; Thrombolysis; Thrombolytic Therapy; Viscoelastic Substances.

APRESENTAÇÃO

As trombozes vasculares são um problema crescente que assola a população mundial. Esta situação clínica tem despertado grande interesse em pesquisadores que se dedicam tanto à prevenção quanto ao tratamento. Como resultado, inúmeras propostas terapêuticas estão disponíveis para terapia dos eventos na fase aguda [1,2,3]. Dentre elas, se destaca o uso de fibrinolíticos. Será discutido nos capítulos a seguir que a utilização desses fármacos não é isenta de complicações, principalmente as de ordem hemorrágica. Deste modo, as restrições e contraindicações ao uso destes fármacos são amplas, havendo necessidade premente da pesquisa por melhor eficiência e segurança nas suas utilizações. Tais fatos e desafios nos incentivaram na idealização e proposta desta nova abordagem relatada nesta tese.

Trata-se da preparação, caracterização e atividade *in vitro* de uma espuma trombolítica obtida por mistura de solução de albumina humana e dióxido de carbono em proporções que garantem a viscosidade e estabilidade do produto e incorporação da estreptoquinase.

O efeito trombolítico desta espuma foi avaliado *in vitro* através de injeção intracoágulo por um cateter multiperfurado em coágulos mantidos a 37°C. Os resultados foram comparados utilizando o mesmo sistema de injeção e as mesmas dosagens, empregando uma solução de estreptoquinase diluída em solução salina isotônica. Um sistema controle utilizando espuma sem fibrinolítico também foi empregado.

No Capítulo I, são discutidos os fundamentos teóricos e clínicos das trombozes e fibrinólises. Também é apresentada uma revisão da literatura sobre os fibrinolíticos e as

novas técnicas de fibrinólises e trombectomias mecânicas. Ao final do capítulo, a proposta de nova abordagem terapêutica apresentada.

O Capítulo II versa sobre a utilização clínica de espumas, e do gás carbônico com revisão da literatura fundamentando a proposta do dispositivo, cuja concepção é explanada em detalhes.

No Capítulo III, aspectos de comportamentos físicos e estruturais das espumas, assim como agentes espumantes e surfactantes são abordados. Também são enfocados os métodos de produção, estabilização e caracterização das espumas. Ao final do capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados neste trabalho, resultados e discussão sobre os dados obtidos.

O Capítulo IV encerra o estudo tecendo as considerações finais sobre os principais achados além de sugerir novos usos para espumas carreadoras de fármacos e que estudos *in vivo* serão necessários para verificação da segurança do seu emprego.

CAPÍTULO I

Considerações iniciais.

1.1. Coagulação e Trombose.

A coagulação é resultante de uma série de estímulos específicos sobre o sistema homeostático da coagulação sanguínea. Quando este processo ocorre *in vitro*, portanto, sem manifestações clínicas, recebe o nome de coágulo, enquanto que o processo *in vivo* se chama trombose.

O processo de coagulação pode ser desencadeado uma vez que um ou mais dos fatores da tríade de Virshow – lesão endotelial, estase sanguínea e hipercoagulabilidade – são estimulados, levando à formação de fibrina. No caso de lesão endotelial, a presença de substâncias marcadoras e a exposição das camadas subendoteliais positivamente carregadas, atraem as plaquetas ao local da lesão. Estas passam ao estado ativado, agregam e fazem um tampão hemostático. Neste estado, adquirem carga negativa e aderem ao colágeno subendotelial exposto, levando à secreção de adenosina difosfato (ADP), serotonina, tromboxano A₂ (TXA₂) e os fatores de coagulação V e XI presentes nos seus grânulos [4]. Simultaneamente, a trombina passa ao estado ativado atuando sobre o fibrinogênio (proteína hidrossolúvel), transformando-o em fibrina (insolúvel). Forma-se assim uma rede estável que captura elementos figurados do sangue, levando à criação do trombo [5,6].

A progressão da expansão do trombo é limitada pelo tamanho da lesão endotelial inicial e pelos fatores anticoagulantes naturais presentes no organismo, como as proteínas “C” e “S”, antitrombina, plasmina, ativadores teciduais do plasminogênio e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) [7].

1.2. Eventos cardiovasculares.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) [8], os eventos cardiovasculares lideram as estatísticas mundiais de mortes por causas naturais em adultos. Na raiz de tais eventos, encontram-se substratos vasculares, genéticos, e ocasionais – os estados trombofílicos -, que levam à formação indesejada do trombo. A trombose representa o mecanismo final no desencadeamento de diversas doenças, como por exemplo, o infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral isquêmico, a embolia arterial periférica, a embolia pulmonar, trombose venosa profunda, entre outras [9,10,11].

1.3. Profilaxias.

A redução sistemática na formação dos trombos envolve medidas preventivas relacionadas aos hábitos pessoais, como combate à obesidade, sedentarismo, tabagismo, estresses, controles de taxas glicêmicas, lipídicas e da pressão arterial, além da detecção precoce de estados trombofílicos [11,12].

A profilaxia medicamentosa de tais eventos trombogênicos é palco de permanente pesquisa, e visa dificultar o início do processo de deflagração do trombo. Neste sentido são amplamente utilizadas as heparinas de diversos pesos moleculares, os cumarínicos e vários fármacos antiagregantes plaquetários, como ácido acetil salicílico (AAS[®]), ticlopidina[®], dipiridamol[®], clopidogrel[®] e o ticagrelor[®] [13,14,15,16].

Apesar dos avanços nas profilaxias clínicas e medicamentosas, frequentemente a trombose se estabelece. Antiagregantes plaquetários e heparinas atuam na profilaxia, porém não são trombolíticos. Assim, estas situações levam à procura constante por fármacos com capacidade de dissolução rápida, seletiva e segura dos trombos. Como consequência, ao longo dos anos, inúmeros fármacos trombolíticos, também chamados

de fibrinolíticos, têm surgido no mercado [17,18], cada um deles com características distintas no tocante a doses, efeitos terapêuticos e colaterais, formas de manipulação e diluição, vias de infusão, modos de emprego, entre outras.

1.4. Fibrinólise natural.

A fibrinólise, ou seja, a degradação da fibrina é um processo fisiológico natural do organismo. É mediada pela plasmina, a qual ajuda a manter equilibrados os processos homeostáticos sanguíneos, evitando o aparecimento de coágulos desnecessários. A fibrinólise natural ajuda também a limitar a progressão do coágulo em locais onde ele não é necessário [6,19].

A plasmina é um potente fibrinolítico natural. É produzida a partir da clivagem por hidrólise da ligação peptídica (Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹) no plasminogênio presente no plasma. O plasminogênio (uma pró-enzima inativa) é assim o precursor da plasmina (enzima ativa). Esta é uma enzima proteolítica capaz de quebrar as ligações cruzadas da fibrina, provocando a dissolução do trombo. A plasmina também atua degradando o fibrinogênio, fator V e o fator VII [6]. Por outro lado, o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) é liberado pelas células endoteliais, tendo uma fraca atividade fibrinolítica quando livre no plasma, mas sendo muito eficaz quando ligado ao plasminogênio associado à fibrina. As células endoteliais produzem e liberam também a uroquinase de cadeia simples, que também ativa o plasminogênio ligado à fibrina [4,7,20].

A fibrinólise natural possui elementos moduladores limitantes presentes no plasma. Entre eles, destacam-se os inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI) e os inibidores da plasmina (as antiplasminas $\alpha 1$ e $\alpha 2$). O PAI-1, liberado pelo endotélio vascular e pelas plaquetas ativadas, inibe diretamente o t-PA. A atividade do t-PA e da

uroquinase de cadeia simples é potencializada pelo plasminogênio ligado à fibrina, fazendo com que a fibrinólise se concentre no coágulo. Porém, a plasmina presente fora do coágulo de fibrina é rapidamente inativada pelas antiplasminas presentes no plasma [5,6].

Embora em condições normais, o sistema homeostático consiga controlar o desenvolvimento de coágulos na circulação, ele pode reagir de forma exacerbada, com o intuito de prevenir a perda sanguínea, em situações como uma grande lesão vascular. Algumas patologias também induzem a um desequilíbrio nesse sistema homeostático, o que leva à eventual formação de coágulos. Nesses casos, o uso de fibrinolíticos farmacológicos para dissolução do trombo poderá ser clinicamente indicado [21].

1.5. Fibrinolíticos.

Existem dois grupos de agentes fibrinolíticos. Os de atuação indireta, como a estreptoquinase (SK), a uroquinase (UK) e o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e os de ação direta sobre o trombo, ou seja, sobre a fibrina. Os agentes do primeiro grupo convertem o plasminogênio em plasmina, a qual cliva os fios de fibrina, presentes no trombo promovendo sua dissolução. No segundo grupo estão a plasmina e seus derivados, e a alfineprase, uma enzima obtida a partir do veneno de cobra [22,23,6].

1.5.1. Estreptoquinase (SK).

Em 1933, Tillett descreveu o primeiro fibrinolítico, ao verificar em culturas de estreptococos hemolíticos a presença de uma substância com propriedades fibrinolíticas, a qual denominou de *streptococcal fibrinolysin* [24]. Em 1945, Christensen aplicou a denominação de estreptoquinase, apoiado no conceito de que ela funcionava como uma enzima, atuando no plasminogênio e não diretamente sobre o coágulo [25,26].

A estreptoquinase é um polipeptídio de cadeia única (peso molecular de 50.000 Da), produzido pelos *estreptococos β-hemolíticos* do grupo C de Lancefield. Possui meia vida plasmática de 80 minutos e atua de maneira indireta sobre o plasminogênio, formando um complexo ativador estreptoquinase-plasminogênio, levando à formação de plasmina através do consumo deste [18]. Uma vez formado o complexo ativo estreptoquinase-plasminogênio, este tem meia vida de 18-30 minutos. A plasmina assim formada atua desintegrando a fibrina e desestruturando o coágulo. Este processo ocorre à custa de alto consumo do fibrinogênio circulante, podendo desta forma levar a hemorragias indesejadas e graves [27].

Seu uso clínico ocorreu em 1949 quando o próprio Tillett administrou uma injeção de estreptoquinase no espaço pleural de um paciente com um derrame pleural organizado [28]. A primeira injeção sistêmica endovenosa foi aplicada por Fletcher em 1950 para tratar um paciente com infarto agudo do miocárdio [29].

Como a estreptoquinase é extraída de culturas de estreptococos, indivíduos que já apresentaram infecções estreptocócicas, podem estar sensibilizados e terem reações alérgicas ao seu uso, ou desenvolverem anticorpos durante o curso de tratamentos repetidos. Ela também pode ter seu efeito diminuído devido à presença dos anticorpos anti-estreptococos [30]. Estes efeitos colaterais fizeram com que o uso da estreptoquinase perdesse algum espaço para os fibrinolíticos mais recentes.

1.5.2. Uroquinase (UK).

Em 1952, foi relatado um novo fibrinolítico, descrito como uroquinase (UK) por ser observada na urina humana. Sendo uma proteína natural no organismo, esse fibrinolítico não estimula a formação de anticorpos, podendo ser utilizado inúmeras vezes no mesmo paciente, sem os inconvenientes descritos para a estreptoquinase [31].

A UK é uma enzima formada por duas cadeias polipeptídicas, uma leve com peso molecular de 31.600 Dalton (Da) e outra pesada com 54.000 Da. Embora haja efeito fibrinolítico observado em ambas as cadeias, a de maior peso é mais ativa. O mecanismo de ação compreende na clivagem da cadeia proteica do plasminogênio no nível Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹, promovendo assim sua transformação em plasmina, que atuará dissolvendo a fibrina do coágulo. A UK tem um tempo de meia vida plasmática de 15-20 minutos [31].

Riscos de transmissão viral associados ao uso da UK já foram detectados no passado, o que levou ao abandono do processo de obtenção convencional através da cultura de células do aparelho urinário humano [32]. A técnica foi então substituída pela obtenção via DNA recombinante em modelo não humano. A UK obtida por este método foi denominada de r-UK, mantendo a mesma potência fibrinolítica, mas sem os riscos de transmissão virais observados anteriormente. Atualmente, somente este modo de fabricação é empregado e a r-UK é o único tipo de uroquinase utilizada [31,33].

1.5.3. Ativador tecidual do plasminogênio (t-PA).

O ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) é encontrado naturalmente em células endoteliais. É uma serinoprotease de cadeia única com 530 aminoácidos e peso molecular de 72.000 Da, liberada fisiologicamente em situações de estase venosa, exercícios físicos, isquemias e em resposta a epinefrina, histamina e vasopressina. Existem várias apresentações comerciais que refletem modificações na estrutura e na obtenção desse agente fibrinolítico. Atualmente obtido por tecnologia recombinante, o t-PA recebe a denominação de ativador *recombinante* tecidual do plasminogênio (rt-PA), mantendo características farmacológicas semelhantes ao t-PA natural [34].

Seu lançamento comercial e utilização ocorreram a partir da década de 80, sendo, portanto, mais recente que a SK e a UK. O rt-PA apresenta vantagens fisiológicas sobre estas, principalmente no tocante a sua atividade preferencial pela ativação do fibrinogênio ligado a fibrina ao invés do circulante, ou seja, a fibrinólise ocorre seletivamente no trombo. Sua meia-vida média é relativamente curta, cerca de 2-8 minutos, e por ser de ocorrência natural, é praticamente isento de reações de sensibilização [18,35].

1.5.4. Outros fibrinolíticos.

Pesquisas sobre substâncias fibrinolíticas mostram uma infinidade de possíveis fontes para sua obtenção. Algas, bactérias, fungos e derivados da saliva de morcegos (desmoteplase) [36,37] são fontes conhecidas e estudadas. Muitos desses fármacos ainda estão em fase de estudos pré-clínicos e ainda não foram traduzidos em agentes aprovados por órgãos reguladores [38].

A plasmina e seus derivados (mini-plasmina, micro-plasmina e delta-plasmina), são enzimas proteolíticas naturais que pertencem ao grupo dos fibrinolíticos de ação direta sobre a fibrina. Com isso, elas não precisam da ativação do fibrinogênio para sua atuação, não levando a depleção do mesmo. Lançada no final da década de 50, o produto foi inicialmente concebido para utilização pela via endovenosa, mas como não apresentou resultados fibrinolíticos satisfatórios foi então abandonada [39].

O motivo de sua baixa atividade fibrinolítica sistêmica deve-se à imediata inativação pela antiplasmina presente naturalmente no plasma. Contudo, com o desenvolvimento das técnicas de injeção intratrombo, seu uso volta a ser cogitado como uma alternativa medicamentosa promissora [40]. Liberada intratrombo através de cateteres multiperfurados, a plasmina entra em contato direto com a fibrina do mesmo

sem ser inativada pela antiplasmina, pois esta não penetra no trombo já consolidado. Por outro lado, nas extremidades proximais e distais ao trombo, ou seja, no sangue circulante, a plasmina volta a ser inativada pela antiplasmina plasmática, eliminando a sua atividade fibrinolítica sistêmica. Desta forma, a atividade fibrinolítica da plasmina fica restrita ao trombo no qual foi aplicada, não ocorrendo assim degradação de trombos à distância, responsáveis pela hemostasia em outros locais [38,41].

Estas características, associadas a não alergenicidade, a não depleção do fibrinogênio quando utilizada em doses terapêuticas e a possibilidade atual de sua liberação intratrombo, tornam a plasmina, novamente, um fármaco trombolítico muito promissor [35,22].

1.6. Utilizações clínicas dos fibrinolíticos.

Os fibrinolíticos têm indicações quando da ocorrência de uma trombose que necessite sua dissolução. Como virtualmente qualquer vaso ou prótese vascular pode apresentar trombose, os fibrinolíticos podem ser utilizados em tromboes arteriais, venosas localizadas, no tromboembolismo pulmonar (TEP), e outras situações nas quais se necessite a dissolução de trombos [42,43].

No grupo das tromboes arteriais, destacam-se o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI), a trombose mesentérica e as tromboes dos membros inferiores (MMII) [44,45,46,47].

No grupo das tromboes venosas, as mais significativas são as tromboes venosas dos membros inferiores e superiores, tromboes de veias pélvicas, tromboembolismo pulmonar (TEP) ou tromboembolismo venoso (TEV), tromboes da veia cava, das veias renais, e das veias mesentéricas [48,49].

Pontes vasculares (*by-pass*) realizadas com veias homólogas ou com próteses sintéticas, quando trombosadas, também podem ser submetidas ao processo de fibrinólise [50,51]. Os cateteres intravasculares, como os de acesso venoso central, para quimioterapias e hemodiálise, também podem apresentar obstruções devido às trombozes, sendo esta mais uma indicação de uso de fibrinolíticos [52].

1.7. Vias de administração dos fibrinolíticos e sistemas de trombo aspiração.

Os fibrinolíticos atualmente mais utilizados são a r-UK, a SK e o rt-PA, sendo as vias de administração e sistemas de liberação comuns a todos eles.

Assim, os fibrinolíticos podem ser administrados por diferentes vias, dependendo da localização do trombo. As principais são a intravenosa sistêmica, intravenosa por cateter peritrombo, intra-arterial e intratrombo, podendo ainda haver variantes em cada uma delas como descrito a seguir [18,35].

1.7.1. Intravenosa sistêmica.

A via intravenosa sistêmica foi a primeira via de administração empregada e ainda é a mais utilizada em casos de tromboembolismo pulmonar agudo e infarto agudo do miocárdio [53]. Tem a seu favor a facilidade de emprego, bastando para tal, ter-se uma veia periférica para a infusão do fármaco. Contudo, pelo fato do fármaco ser diluído sistemicamente, a via intravenosa apresenta a desvantagem de necessitar de doses mais elevadas para obtenção de efeito fibrinolítico no trombo. O contato com o trombo fica praticamente limitado à secção transversa da sua área proximal e distal, não havendo penetração imediata do fibrinolítico no interior do mesmo. Como há necessidade de utilização de doses mais elevadas, os efeitos sistêmicos ocorrem com maior frequência, podendo haver complicações hemorrágicas graves [33,54,47].

1.7.2. Intravenosa por cateter peritrombo.

Nesta modalidade, o fibrinolítico é aplicado através de um cateter posicionado nas proximidades do trombo venoso, permitindo assim que o agente atinja o trombo numa concentração mais elevada. É um avanço em relação à sistêmica, mas ainda apresenta a limitação da restrição da área do trombo a ser atingida pelo fibrinolítico. Esta técnica é atualmente pouco empregada, e as doses do fibrinolítico costumam ser idênticas às utilizadas pela via sistêmica [55].

1.7.3. Intratrombo.

A fibrinólise intratrombo foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a área de contato do fibrinolítico com o trombo. É realizada através de cateteres especialmente desenhados para tal, os quais apresentam multiperfurações circunferenciais em áreas delimitadas por marcas rádio opacas que orientam o correto posicionamento em relação ao trombo [50].

1.7.4. Fibrinólise intratrombo contínua.

Na fibrinólise intratrombo o cateter é posicionado dentro do mesmo e através do cateter o fibrinolítico é liberado de maneira contínua. Esta forma de liberação dos fibrinolíticos permite certa redução na dose utilizada, diminuindo os índices de complicações relacionadas ao seu emprego [56].

1.7.5. Pulse spray.

O método *pulse spray* constitui um tipo de administração intratrombo na qual o fibrinolítico é diluído em doses muito baixas, de até 0,05 mg/kg/h no caso de rt-PA [34] e injetado em pulsos de pressão elevada através de cateter multiperfurado. As injeções são feitas a cada 30 segundos durante os primeiros 15 a 20 minutos. Após este período inicial, o intervalo de injeção passa para cada minuto até 90 minutos, ou menos, se o fluxo foi restabelecido. Havendo trombos residuais, a infusão em bomba através do cateter posicionado no local da trombose, deve ser mantida por um período maior (8 a 24 horas) [52]. A injeção com pressão elevada provoca efeito de cisalhamentos no interior do trombo, aumentando assim, a área de contato do fibrinolítico com o mesmo. Esta técnica abrevia ainda mais o tempo da resposta fibrinolítica em comparação à intratrombo contínua, diminuindo consideravelmente as doses empregadas, os efeitos colaterais como a queda do fibrinogênio, o tempo de isquemia do órgão alvo e as complicações hemorrágicas locais e à distância [57,58,59,60].

1.7.6. Fibrinólise associada a métodos mecânicos.

Os princípios utilizados pelos métodos mecânicos são; fragmentação aumentando a área de contato do trombo com o fibrinolítico, aspiração do trombo e isolamento do trombo permitindo que o fibrinolítico permaneça por mais tempo em contato com o mesmo, havendo uma menor disseminação sistêmica do trombolítico [61,62,63,64].

É comum que determinado método mecânico empregue mais de um destes princípios simultaneamente, como no caso do cateter de Trellis[®] que é composto por dois balões que são insuflados antes e após a extensão do trombo (**Figura 01**). Com o trombo preso entre os balões, o fibrinolítico é liberado pelo cateter. Em seguida, são

iniciados movimentos rotacionais e excêntricos orientados por um guia, fragmentando o trombo. Após a fragmentação e lise do mesmo, ainda com o balão distal insuflado, os resíduos são aspirados e o balão distal desinflado [65].

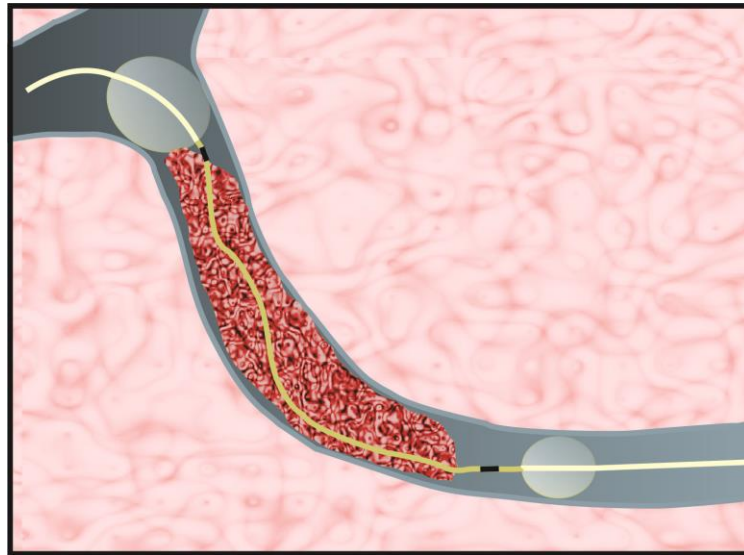


Figura 01: Representação esquemática do funcionamento do cateter de Trellis®.
Desenho, Luiz F. Farret.

A aspiração também pode ser realizada através de cateteres calibrosos, com a extremidade posicionada no trombo, sendo a sucção provocada por seringa de grande volume [64,66,67]. Alguns cateteres são especialmente desenvolvidos para tal, como o Divers Ce® e o QuickCat® [68].

Um sistema combinando as técnicas de fibrinólise, tromboaspiração e embolectomia por cateter balão de Fogarty® que navega sobre um fio guia (*over the wire*), foi idealizado pelo autor desta tese, com patente solicitada em novembro de 2000 [69]. O conjunto é composto por dois cateteres: um cateter guia e outro com a ponta que abre em forma de funil ao ser exteriorizado do primeiro. O conjunto é posicionado próximo ao trombo. A seguir, o cateter balão de Fogarty® é avançado até ultrapassar a região da trombose, sendo então insuflado. O fibrinolítico é injetado, ficando contido

entre o cateter em forma de funil e o balão. Após um determinado tempo, o balão ainda insuflado é retraído em direção ao funil. Simultaneamente, o trombo parcialmente liquefeito é aspirado para dentro do sistema e da seringa (**Figura 02**).

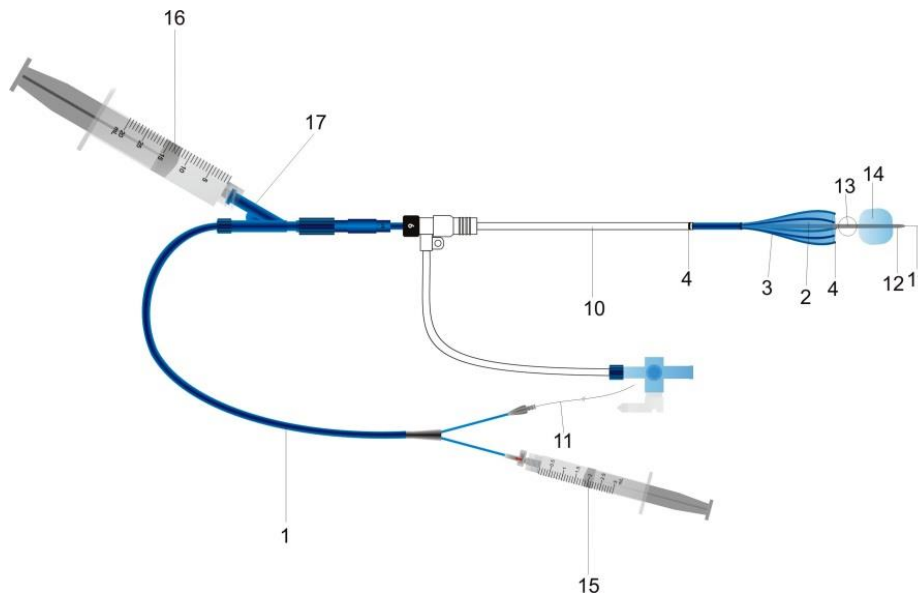


Figura 02: Representação do sistema de tromboaspiração proposto pelo autor em 2000.
Desenho, Luiz F. Farret.

O sistema Merci[®] utiliza uma combinação de um fio guia com memória térmica o qual é inserido dentro de um microcateter. Após o sistema ultrapassar o trombo, o microcateter é recolhido expondo o fio guia que adquire uma forma helicoidal cônica. O trombo preso ao fio guia é então tracionado em direção a um cateter de maior calibre e aspirado por esta via [70,71].

Na aspiração utilizando o princípio de Venturi, os cateteres tipo AngioJet[®] e o Hidrolyser[®] aspiram o trombo por injeção de soluções fisiológicas em altas pressões, que são direcionadas no sentido retrógrado, provocando pressão negativa próximo à ponta do cateter, aspirando assim o mesmo (**Figura 03**) [72,73,74].

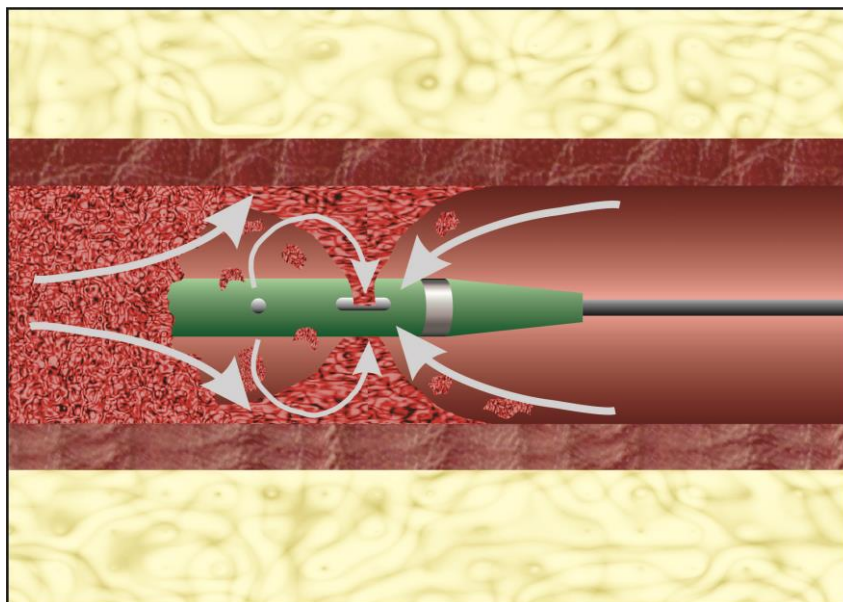


Figura 03: Esquema de funcionamento por aspiração de Venture dos cateteres tipo AngioJet[®] e o Hidrolyser[®]. Desenho, Luiz F. Farret.

Cateteres como o Amplatz[®], Rotarex[®], e o Aspirex[®], apresentam na extremidade distal um sistema com formato de concha que abriga pequenas lâminas em forma de hélices, ou roscas sem fim, que giram em alta velocidade dentro do trombo, provocando sua fragmentação e aspiração [63,75].

O emprego externo de ultrassom no local da trombose, ou através de cateter intratrombo, ajuda a fragmentar o coágulo, potencializando assim, a ação do fibrinolítico [76,77].

1.8. Efeitos adversos dos agentes fibrinolíticos.

Os efeitos adversos decorrentes do uso de fibrinolíticos podem estar relacionados a hemorragias e reações alérgicas. Estas últimas são raras em decorrência do uso de UK ou rt-PA, e um pouco mais frequentes quando da utilização da SK [30].

O risco de sangramento é a complicação mais preocupante, embora apresente diminuição com a utilização de técnicas que empregam doses menores de fibrinolíticos, e menor tempo de exposição aos mesmos [78].

As complicações hemorrágicas são também diminuídas quando observadas as contra-indicações, absolutas e relativas, ao seu emprego (**Quadro 01**). Tais complicações são divididas em menores e maiores [53].

- As menores são mais frequentes, não necessitam de transfusão sanguínea, não deixam sequelas e não atingem o sistema nervoso central (SNC).
- As complicações maiores são as que exigem transfusão sanguínea ou que atingem o SNC.

<p>Contra indicações absolutas</p> <ul style="list-style-type: none">• Trauma crânio encefálico (TCE) ou cirurgia cerebral há menos de 6 meses.• História de acidente vascular hemorrágico (AVH).• História de acidente vascular cerebral isquêmico (AVI), demência, ou lesão do sistema nervoso central (SNC) há menos de 1 ano.• Tumor maligno intracraniano.• Suspeita de dissecação aórtica.• Hemorragia interna há menos de 6 semanas.• Sangramento ativo ou distúrbio já conhecido da coagulação.• Cirurgia de grande porte, trauma ou sangramentos há menos de 6 semanas.• Ressuscitação cardiopulmonar há menos de 3 semanas.• Pericardite aguda <p>Contra indicações relativas</p> <ul style="list-style-type: none">• Uso de anticoagulante oral.• Pancreatite aguda.• Úlcera péptica ativa.• Gravidez, ou parto há menos de 1 semana.• Demência há mais de 1 ano.• Ataque isquêmico transitório há menos de 6 meses.• Endocardite infecciosa.• Tuberculose pulmonar cavitária em atividade.• Doença hepática grave.• Trombose intracraniana.• Hipertensão arterial não controlada (sistólica > 180 mmHg, ou diastólica > 110 mmHg).

Quadro 01 – Contra-indicações ao uso de fibrinolíticos. (Adaptada dos autores Kunadian, e Gibson) [53].

1.9. Proposta de estudo terapêutico.

Habitualmente os agentes trombolíticos são apresentados liofilizados, sendo administrados na forma líquida após sua reconstituição. A administração sistêmica de agentes trombolíticos é associada a várias horas de infusão, alta incidência de trombose residual e um significativo índice de complicações hemorrágicas [79,80]. Sendo assim, é vital desenvolver novas estratégias no emprego de trombolíticos com objetivo de diminuir suas complicações, mantendo ou mesmo aumentando sua eficácia [50,81,82,3]. A infusão intratrombo de agentes trombolíticos tem demonstrado altos índices de sucesso na restauração do fluxo sanguíneo, além de diminuir as complicações hemorrágicas [83,58].

Contudo, a administração intratrombo é associada a prematura saída do fibrinolítico para a circulação sistêmica a medida que o fluxo sanguíneo é gradualmente restabelecido, diminuindo assim, seu tempo de contato com o mesmo [84,85].

Fica evidente a necessidade de avanços ainda maiores que potencializem os efeitos fibrinolíticos através de mudanças de paradigmas no modo de administração e ação dos mesmos, fazendo com que definitivamente se transformem em fármacos absolutamente seguros, permitindo assim, que novas janelas de utilização sejam criadas.

Se fazem necessárias novas formas de veiculação e aplicação, com objetivo de aumentar a permanência do agente fibrinolítico no interior do trombo ou ao seu redor, aumentando a área de contato entre ambos, levando assim a uma maior eficácia. Como consequência, ter-se-á a manutenção do efeito fibrinolítico com doses menores, reduzindo-se os efeitos colaterais como os sangramentos.

Com esta nova abordagem terapêutica, espera-se aumentar o escopo das indicações trombolíticas para um maior número de pacientes portadores de trombooses agudas, pois as complicações advindas do seu emprego seriam menores.

CAPÍTULO II

O dispositivo proposto.

Neste capítulo serão abordados os principais usos de espumas e gases injetáveis, referidos na literatura, assim como a possibilidade de melhorar a disponibilidade do fibrinolítico no trombo, aumentando o efeito fibrinolítico através dessa abordagem. Também serão descritos a concepção e confecção do dispositivo proposto, a patente requerida, finalizando com a discussão.

2.1. Revisão da literatura.

2.1.1. Espumas como meio de realce para exames ultrassonográficos.

Até o início da década de 80 as preparações com espumas tinham suas utilizações voltadas para cosméticos, e usos tópicos e em mucosas [86]. Nessa época, a partir de experimentos realizados em cães iniciaram-se as pesquisas de espumas como contrastes para realçar a visualização ecocardiográfica [87]. Desde então, contrastes em forma de espumas para ecocardiogramas têm utilizado duas principais fontes geradoras de espumas: a albumina humana e derivadas de fluoretos e outros gases inertes.

O Alburnex[®] (Mallinckrodt, St. Luis, Mo, USA) foi o primeiro agente comercialmente disponível, estando hoje fora de mercado. A espuma era produzida pela emulsificação ultrassônica, proposta por Suslick e Price [88], utilizando solução de albumina humana a 5% e ar ambiente. Era apresentado em frascos com pó liofilizado que era reconstituído pelo acréscimo de solução salina isotônica seguida de agitação para promoção da espuma [89]. Tal espuma injetada por via endovenosa perdia muito de sua capacidade de opacificação do ventrículo esquerdo após a passagem pela

circulação pulmonar. Tal inconveniente era devido à alta difusibilidade do ar ambiente que compunha a fase gasosa [90]. O problema foi contornado modificando-se a fase gasosa de ar para o fluorocarbono, um gás insolúvel no sangue e de alto peso molecular, o que resultou na estabilização das bolhas mesmo quando da passagem pela circulação pulmonar [91]. Autores que preconizavam a utilização de albumina humana como meio de contraste ecocardiográfico, relatavam ser um meio ideal, pois não produzia alterações significativas na perfusão coronariana, na contratilidade do ventrículo esquerdo assim como na circulação sistêmica [92,93,89].

O Sono-Vue[®] (Bracco, High Wycombe, UK) utiliza micro bolhas estabilizadas a partir de fosfolipídios que atuam como tensoativos e hexafluoreto de enxofre, como fase gasosa [94]. Inúmeros outros contrastes utilizam gases de alto peso molecular e imiscíveis ao plasma, como os fluorocarbonos associados a fosfolipídios, e transformados em espumas pela emulsificação ultrassônica. Todos eles apresentam microbolhas que não agregam, são biologicamente inertes e seguras. Dentre eles, merecem destaque o Definity[®] (Lantheus Medical Imaging, N. Billerica, MA, USA) que utiliza o octafluoropropano, e o Optison[®] (Mallinckrodt) empregando o perflutren, ambos aprovados pelo FDA para opacificar cavidades ventriculares. O Sonazoid[®] (Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan) que utiliza fosfolipídios e perflubutano tem sua utilização aprovada no Japão para opacificação hepática no auxílio de diagnóstico de tumores de fígado [95].

2.1.2. CO₂ como meio de contraste angiográfico.

Outro elemento significativo na confecção da espuma proposta é o CO₂. Este gás inerte é utilizado há longa data como contraste angiográfico para diagnóstico e intervenções em pacientes com história de alergia a contrastes iodados, ou com função

renal diminuída. Observa-se também a utilização de angiografias por CO₂ em associação a espumas em procedimentos terapêuticos de esclerose de varizes esofágicas e gástricas [96,97]. Os resultados das imagens obtidas são de boa qualidade, especialmente quando os exames são realizados nos novos aparelhos com subtração digital. A velocidade de injeção do gás é elevada, na ordem de 10 mL/s e os volumes oscilam de 10 a 50 mL por cada injeção, intravenosa ou intra-arterial [98,99,96,100].

2.1.3. Espumas em escleroterapia venosa.

Em campo diametralmente oposto aos objetivos fibrinolíticos do trabalho ora apresentado, encontram-se as propostas de espumas como agentes esclerosantes venosos. Em interessante artigo de revisão intitulado “The History of Sclerosing Foams” publicado por Christoph e Wollmann (2004), [101] os autores relatam que o primeiro artigo publicado sobre o assunto foi o de Stuard McAusland em 1939, que obteve espuma esclerosante, pela agitação do frasco contendo uma solução de morruato de sódio (agente esclerosante) e ar.

Outros autores seguiram esta técnica sem grandes variações, até a publicação de Ree em 1953, *apud* [101]. Este autor empregou pela primeira vez o termo “espuma” e a obteve pela agitação do frasco como proposto por Stuart, acrescentando uma melhora técnica ao aspirar o conteúdo com o bisel da agulha parcialmente imerso na solução. Novo avanço foi obtido em 1957 por Mayer e Bücke, *apud* [102], que criaram uma seringa de dois êmbolos especialmente destinada para formação de microespuma. O primeiro êmbolo possuía finos orifícios que permitia a mistura das fases ao se realizar movimentos de vai e vem sobre o líquido e o ar contido na seringa com o bico temporariamente ocluído. O segundo êmbolo tinha a função de promover a injeção do volume de espuma criada.

Em 1962, Flückiger, *apud* [101] descreveu pela primeira vez a técnica de obtenção de espumas a partir de fluxo turbulento. A espuma era obtida pela introdução e aspiração repetidas vezes por seringa da substância esclerosante no frasco que a continha. Um novo método utilizando baixa pressão foi descrito em 1969 por Gillesberg *apud* [101]. Nele o líquido esclerosante necessário era aspirado numa seringa de vidro, e enquanto a agulha da seringa era temporariamente mantida no frasco acima do nível do líquido fazia-se uma aspiração no êmbolo de vidro permitindo que o ar penetrasse na região de baixa pressão passando entre o êmbolo e o cilindro da seringa. Esta técnica possuía muitas variáveis, como por exemplo, a pressão exercida sobre o êmbolo, o tipo e fabricante da seringa, a quantidade de ar deixada junto ao líquido, resultando em espumas de difícil padronização.

Em 1984, Hauer [103] criou e patenteou uma técnica que empregava duas seringas em paralelo, uma contendo o esclerosante e a outra contendo ar, ambas conectadas a uma câmara de mistura. A utilização do CO₂ foi sugerida pela primeira vez por Garrido em 1995 [104], que utilizou um sistema rotacional idealizado a partir de escova de dente elétrica. Finalmente, em 2000, Tessari [105] propôs a técnica de turbilhonamento composta de duas seringas, uma contendo ar e a outra o esclerosante conectadas por uma torneira de três vias. Além da obtenção de espumas de maneira simples, o método permite variação da abertura da passagem da torneira, criando maior ou menor pressão e turbulência no fluxo entre as fases, permitindo confeccionar espumas de bolhas menores resultante da maior turbulência e pressão [101].

A justificativa para o emprego de espumas em escleroterapia reside nas suas características. Observa-se aumento da adesividade e do tempo de permanência da espuma junto ao endotélio, aumento do poder esclerosante com redução da quantidade do fármaco e da concentração utilizadas, além de aumento da visibilidade das veias ao

ultrassom no momento do tratamento. A durabilidade da espuma está relacionada ao tamanho das bolhas, a tensão superficial da fase líquida, o gás utilizado, e as condições nas quais a espuma foi formada e armazenada [106].

O emprego de CO₂ como fase gasosa, por ser 1,5 vezes mais denso que o ar, cria bolhas menores com maior efeito sobre o endotélio. Contudo, as espumas geradas por este gás tem menor tempo de duração devido ao fato de bolhas menores terem maior pressão interna o que provoca seu rompimento mais facilmente. Devido a esta característica associada à alta difusibilidade e inocuidade do gás, os efeitos colaterais relatados na utilização destas espumas são menores do que quando utilizado ar ambiente [107].

2.1.4. Outros métodos propostos para aumentar a eficácia dos fibrinolíticos.

Na busca de métodos que aumentem a eficácia e reduzam os riscos de sangramentos da terapia trombolítica, inúmeras abordagens têm sido sugeridas além das já relatadas no capítulo I. Entre elas destacam-se as que propõem associação de bloqueadores das glicoproteínas trombocitárias IIb/IIIa (tiroxiban) ao uso de fibrinolíticos, e o aumento da disponibilidade do plasminogênio plasmático [1]. Outra abordagem interessante é a utilização de nano agente para fixar as moléculas de fibrinolíticos às moléculas com trombo afinidade. Os nano agentes são carreadores biodegradáveis de nano escala (<1µm), como polímeros, lipídios, fosfolipídios e compostos organometálicos, que transportam substâncias ligadas a eles a nível molecular ou supramolecular. Fazem parte dos nano carreadores as nanopartículas, nanocápsulas, lipídios complexos, micelas poliméricas e dendrímeros [108]. Assim, é

possível através de injeção sistêmica endovenosa, direcionar e fixar o fibrinolítico à superfície do trombo [3].

A sonotrombólise utiliza fibrinolíticos sistêmicos associados ao uso de ultrassom por transdutor aplicado externamente sobre a região da trombose, como agente vibratório potencializador do efeito trombolítico [2,109]. Uma variante técnica muito promissora e recentemente proposta é a que utiliza um cateter emissor de ultrassom para ser aplicado intratrombo com vistas a potencializar o efeito fibrinolítico [110,111].

O emprego de microbolhas utilizadas como contrastes para ecocardiografia, com fibrinolíticos incorporados à superfície através de técnicas de conjugação, potencializadas pelo ultrassom também tem sido preconizado [112]. Uma abordagem muito interessante foi proposta por Um, e cols. [113] na qual utilizaram microbolhas de contraste ultrassonográfico (SonoVue[®]) conjugadas à uroquinase, aos aminoácidos Arginina, Glicina, Aspartato e Serina (RGDS) e a um marcador fluorescente. Como a sequência Arg-Gli-Asp (RGD) é de reconhecimento específico no local de ligação das glicoproteínas Iib/IIIa na membrana plaquetária (GP-Iib/IIIa), o RGDS foi o marcador usado no estudo de trombo alvo. Assim, o preparado de microbolhas foi injetado via sistêmica em coelhos que apresentavam trombose induzida nas artérias femorais. Ao término da experiência, os autores demonstraram pela presença da fluorescência que a uroquinase estava agregada à superfície dos trombos. Concluíram que é possível transportar a uroquinase em microbolhas e que o marcador RGD é efetivo para dirigir e agregar o sistema aos trombos [113].

2.1.5. Outros usos sugeridos e o futuro das microbolhas.

Outros dois usos experimentais para microbolhas são relatados. Um como carreador de material genético em terapia gênica. Os genes podem ser incorporados em

agentes de contraste ultrassonográficos através da fixação na composição da membrana das microbolhas, nas suas superfícies ou no seu interior. Uma vez injetados via sistêmica venosa, ao passar pelo órgão alvo, coração, como descrito pelos autores, as microbolhas contendo o material genético seriam destruídas pelo ultrassom liberando o material. Deste modo, seria possível através de uma injeção sistêmica liberar o material genético em um órgão alvo específico [114].

Outro uso experimental bastante interessante é o emprego de microbolhas como transportadoras intravasculares de oxigênio, CO₂ e outros gases. Os autores, que receberam suporte financeiro da Atividade de Pesquisa do Exército dos USA, propõem a confecção de microbolhas a partir de uma emulsão feita por dodecafluorpentano (DDFP). Sugerem que o tratamento poderá ser efetivo em choques hemorrágicos e síndromes descompressivas de mergulhadores [115].

Apesar de idealizadas como contrastes para ultrassonografias cardíacas, o uso destas microbolhas evoluiu para campos diversos, sendo hoje utilizadas como contrastes ultrassonográficos para pesquisa de tumores hepáticos, de mamas, prostáticos, perfusão renal, carótidas e pesquisa de trombose venosa [116].

Utilizadas como carreadoras de material genético, conforme descrito, especula-se que também poderão carrear antibióticos e quimioterápicos, sendo destruídas nos órgãos alvos através de ultrassom aplicado externamente. Desta forma, parecem ser alternativas interessantes e promissoras como carreadoras de substâncias ativas [86,116].

2.2. Concepção do dispositivo, protótipo e patente requerida.

Pautados nos embasamentos e necessidades descritas no capítulo I e no subcapítulo anterior, novas formas de veiculação e aplicação de trombolíticos foram

propostas. Publicações demonstram que formulações de esclerosantes em forma de espumas são mais efetivas do que sob a forma líquida no tratamento de esclerose de varizes e microvarizes [106,117]. Assim, com o suporte de publicações prévias que relatam a utilização de espumas intravasculares para esclerose venosa, procurou-se aplicar estes conceitos no sentido antagônico, ou seja, no tratamento fibrinolítico.

O protótipo foi construído a partir da conexão de duas seringas através de uma torneira de três vias. Contudo, o sistema proposto na Patente é composto de seringa com CO₂ e o agente terapêutico em pó liofilizado soldados à torneira que permanece em posição fechada e lacrada até o momento de iniciar a confecção da espuma. Tal cuidado é para evitar a perda do CO₂ para o meio ambiente ou ainda, que ar ambiente seja aspirado inadvertidamente ao sistema antes da confecção da espuma. No caso de agentes apresentados em forma líquida o mesmo estará associado e dissolvido na seringa que contém a solução de albumina.

2.2.1. A patente requerida.

Em 16 de janeiro de 2013 solicitamos ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) a proteção nacional e internacional através de Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT) da nossa invenção.

Deste pedido, descreveremos os segmentos de textos mais significativos.

**“PREPARAÇÃO MEDICINAL SOB A FORMA DE ESPUMA PARA A
LIBERAÇÃO PROLONGADA DE MEDICAMENTOS E SISTEMA PARA
OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO MEDICINAL [118]”**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve uma preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos e o sistema para obtenção da preparação medicinal. Mais especificamente compreende uma preparação medicinal sob a forma de espuma obtida a partir de albumina e gás carbônico com a finalidade de carrear e liberar medicamentos mediante injeção intravascular (arterial ou venosa), intracavitária através de cateteres ou punções, aplicação tópica ou mesmo via parenteral, com a finalidade de atingir órgãos alvos e prolongar o tempo de contato do medicamento.

SUMÁRIO

É objeto da invenção uma preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos que compreende uma solução de albumina e gás carbônico, provendo uma espuma totalmente biocompatível.

É objeto da invenção uma preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos que provê maior tempo de residência dos fármacos no órgão ou tecido alvo, promovendo a liberação gradual e prolongada, reduzindo a retirada desses fármacos do local de ação pela corrente sanguínea e o seu eventual transporte para outros órgãos e tecidos, reduzindo a toxicidade e efeitos colaterais de fármacos como os quimioterápicos.

É objeto da invenção uma preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos com efeitos farmacológicos mais acentuados e utilizando doses menores de fármacos.

É objeto da invenção uma preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos com potencial aplicação no tratamento de doenças ou situações nas quais haja necessidade de liberação gradual de medicamento em locais específicos e geralmente em menores doses, tal como trombozes arteriais ou venosas, infecções, neoplasias, úlceras, feridas, entre outras.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **figura 4.1** apresenta o sistema para a preparação da formulação sob a forma de espuma, sendo previstas duas seringas (A e B) de volumes variados com encaixe tipo rosca (*luerlock*) e uma torneira de duas vias.

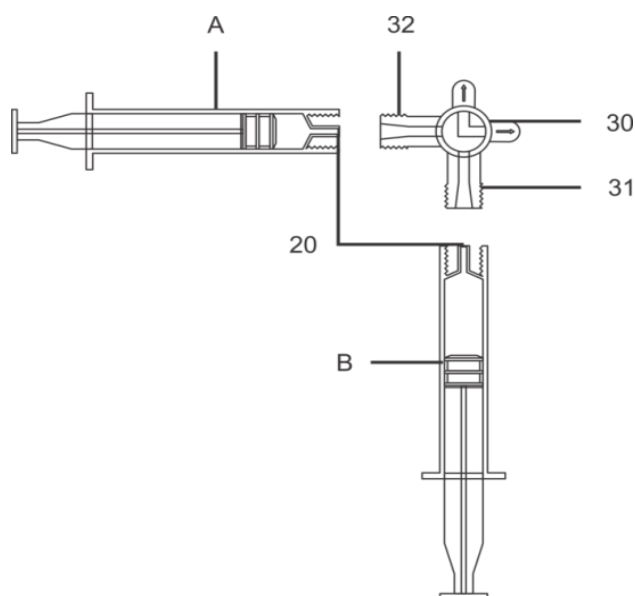


Figura 4.1: Conjunto de figuras relativas à patente solicitada. Observam-se as seringas “A” e “B” e o conector de três vias “30”. Desenho, Luiz F. Farret.

A **figura 4.2** apresenta o sistema montado, evidenciando as seringas interligadas entre si através da torneira de duas vias, de forma que a seringa (A) contém albumina e a seringa (B) contém o gás carbônico (CO₂) e o(s) fármaco(s) ou substâncias a serem incorporadas à espuma.

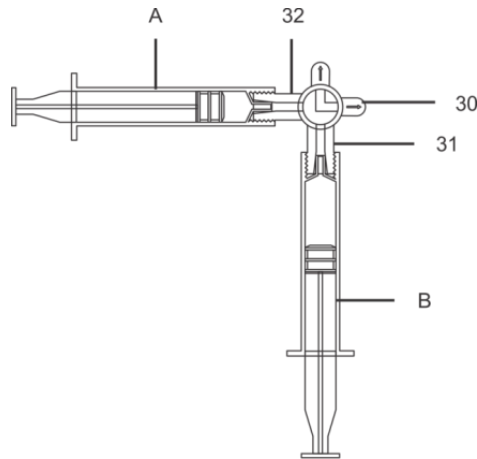


Figura 4.2: Seringas conectadas pelo conector. Seringa “A” contendo albumina e seringa “B” contendo o CO₂ e pó liofilizado. Observar que a válvula “30” está na posição fechada. Desenho, Luiz F. Farret.

A **figura 4.3 A e B** evidencia o processo de mistura da albumina com o gás carbônico, onde o conteúdo das seringas (A e B) transita através da torneira de duas vias.

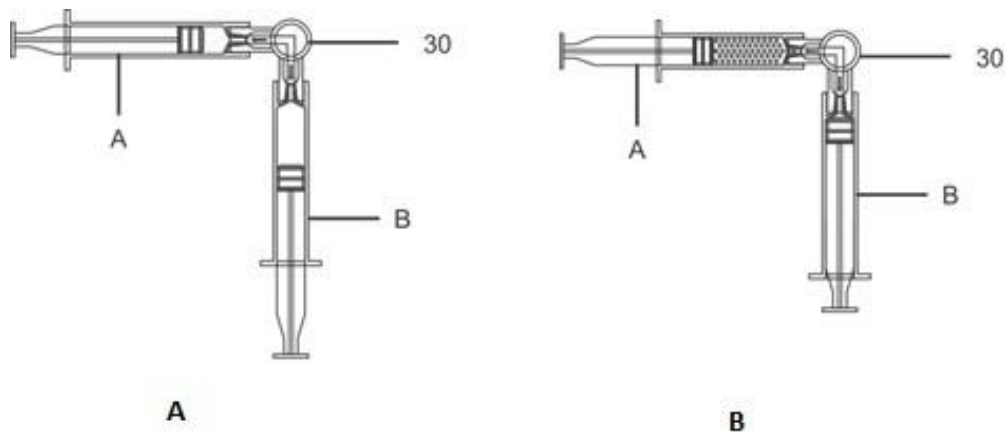


Figura 4.3 A e B: Processo de mistura das fases pelo movimento de vai e vem entre as seringas conectadas pelo conector. Observar que a válvula “30” está na posição aberta. Desenho, Luiz F. Farret.

A **figura 4.4** apresenta a desconexão de uma das seringas da torneira de duas vias e a **figura 4.4A** apresenta a seringa contendo a mistura de albumina e gás carbônico em condições de uso.

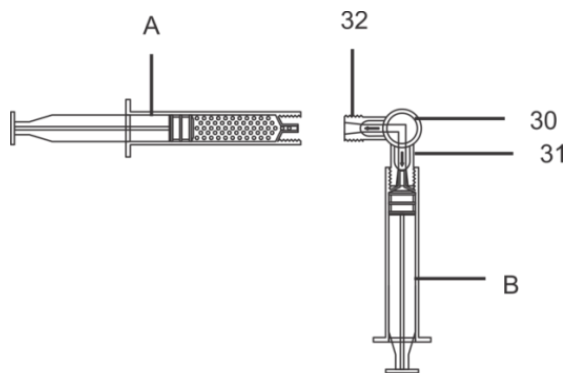


Fig. 4

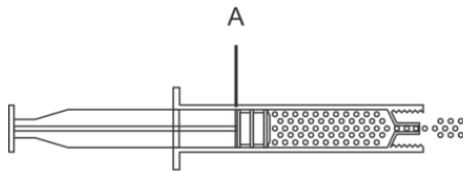


Fig. 4A

Figuras 4.4 e 4.4-A: Processo de confecção da espuma concluído. Desconexão da seringa “A” na figura 4 e a seringa com a espuma pronta para uso em 4A. Desenho, Luiz F. Farret.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos, objeto da presente invenção, compreende albumina humana, preferentemente na concentração de 20%, e gás carbônico (CO₂).

Preferentemente, a proporção de mistura de gás carbônico (CO₂) e a solução de albumina são de 3:1 v/v, resultando em uma espuma com melhor estabilidade e maior viscosidade.

O sistema para obtenção da preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos compreende uma primeira seringa (A) dotada de albumina humana e uma segunda seringa (B) dotada de gás carbônico.

As seringas (A e B) são conectadas na extremidade distal (20) a uma torneira de duas vias (30) de forma a impedir a entrada de ar ambiente, estando a segunda seringa (B) fixada de forma amovível à uma das vias (31) da torneira (10) e a primeira seringa (A) fixada à segunda via (32) da torneira (10) de forma removível.

Preferentemente, um ou mais medicamentos são acrescentados na seringa (B) que contém gás carbônico, em dosagens específicas, de acordo com o tratamento.

Opcionalmente, um ou mais medicamentos são associados na seringa (A) que contém a albumina, caso seja estritamente necessário por razões específicas de incompatibilidade de armazenamento com o gás carbônico, ou por melhor estabilidade da substância quando dissolvida na albumina.

Para a preparação da formulação, a torneira (10) é aberta de forma a promover a mistura da albumina com o gás carbônico. Para a formação da espuma, os êmbolos de ambas as seringas (A e B) são pressionados de forma a promover o fluxo ininterrupto entre as seringas, gerando a espuma.

Para a aplicação, a seringa não soldada a torneira de duas vias (10) é liberada para ser utilizada na aplicação da composição medicamentosa.

REIVINDICAÇÕES:

1. PREPARAÇÃO MEDICINAL SOB A FORMA DE ESPUMA PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE MEDICAMENTOS caracterizada por compreender albumina humana e gás carbônico.
2. PREPARAÇÃO MEDICINAL SOB A FORMA DE ESPUMA PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE MEDICAMENTOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da albumina humana preferentemente apresentar concentração de 20%.
3. PREPARAÇÃO MEDICINAL SOB A FORMA DE ESPUMA PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE MEDICAMENTOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de preferentemente compreender três partes de gás carbônico e uma parte de albumina humana.
4. SISTEMA PARA OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO MEDICINAL caracterizado por compreender uma primeira seringa (A) dotada de albumina humana e uma segunda seringa (B) dotada de gás carbônico, dita primeira seringa (A) com extremidade distal (20) conectada de forma removível a segunda via (32) de uma torneira de duas vias (30) e a segunda seringa (B) com extremidade distal (20) conectada de forma amovível a primeira via (31) da torneira de duas vias (30).
5. SISTEMA PARA OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO MEDICINAL, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de preferentemente serem acrescentados um ou mais medicamentos na segunda seringa (B).
6. SISTEMA PARA OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO MEDICINAL, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de opcionalmente serem acrescentados um ou mais medicamentos na primeira seringa (A).

2.3. Discussão.

Neste capítulo, verificou-se que as espumas há algum tempo deixaram suas utilizações meramente cosméticas para tornarem-se veículos medicamentosos. Na nova condição, foram utilizadas desde meios de realce para exames ultrassonográficos a escleroterapia venosa. Novos usos são frequentemente propostos, como suas associações ao transporte genético e de gases, como já citados.

Como visto, o CO₂ mostra-se como gás inerte ao organismo tendo sido bastante utilizado em procedimentos angiográficos e também como fase gasosa em espumas para escleroterapia.

Relatou-se que a albumina humana é uma proteína hidrossolúvel presente no plasma sendo, portanto, atóxica. É disponível em apresentações comerciais prontas para injeção endovenosa.

Várias formas de se confeccionar espumas são descritas, oscilando desde complexos processos utilizando sonificação, até os mais simples como o turbilhonamento entre as fases.

As espumas foram obtidas pelo método proposto por Tessari, misturando-se e turbilhonando-se as fases através de duas seringas ligadas por um conector; uma contendo a fase líquida e a outra contendo a fase gasosa [105]. A espuma confeccionada utiliza gás carbônico como fase gasosa, e albumina humana a 20% como fase líquida. O volume total de CO₂ assim como a velocidade de injeção proposta no experimento *in vitro*, 1mL/s são muito reduzidas em relação ao utilizado nas angiografias por gás carbônico.

O sistema proposto, para o qual solicitamos proteção intelectual, fundamenta-se nestes princípios. Ele contempla um conjunto para confecção de espuma a partir de CO₂ e albumina mantendo a proporção de 3:1 (CO₂:albumina). Para isto, a seringa que contém o CO₂ conterá também a substância liofilizada em dosagem pré-determinada e será apresentada hermeticamente isolada do restante do sistema. A outra seringa conterá a albumina e poderá ser desatarraxada do sistema após a espuma ser confeccionada. O sistema proposto não é exclusivo para injeção de espumas fibrinolíticas a partir da SK. Qualquer outra substância que mantenha as propriedades das fases na formação de espuma, e que apresente características vantajosas em sua veiculação por esta forma poderá ser utilizada.

O emprego da espuma confeccionada com albumina humana e CO₂ associada a um fibrinolítico utilizando-a como potencializadora do efeito lítico fundamentou-se na observação que espumas deslocam o sangue contido nos vasos, permitindo um contato ampliado com os mesmos. Outro atributo significativo é o relacionado à sua viscosidade, que lentifica a sua passagem pelo mesmo, além de dificultar os efeitos de diluição e remoção pelo fluxo sanguíneo [102,106,117]. Assim, supõe-se que tal efeito benéfico também ocorreria se a espuma fosse injetada no interior de trombos. Esta hipótese foi fundamental no desenvolvimento da pesquisa.

CAPÍTULO III

A formulação da espuma.

3.1. Revisão da literatura.

Nestes subitens serão considerados aspectos da estrutura, composição, preparação e caracterização das espumas úmidas aquosas.

3.1.1. Conceitos.

Como citado por Denis Weaire [119], “*espumas pertencem à categoria dos fluidos complexos*”, pois são constituídas de líquidos em constante rearranjo para manter as finas camadas das bolhas o mais estável. Deste arranjo dinâmico, surgem várias definições possíveis como as relatadas a seguir:

“Espumas são coloides compostos por duas ou três fases distintas: um líquido, habitualmente hidrofílico, como fase contínua associada a um agente espumante, através dos quais uma fase gasosa dispersa é distribuída, podendo haver também uma fase hidrofóbica dispersa associada” Wilson [120].

“Espumas são uma dispersão de bolhas gasosas num volume relativamente pequeno de líquido contendo surfactante ou outro agente de superfície ativo” BikermanJJ (1973) *apud* [121].

“É a dispersão de bolhas de gás num líquido ou gel (que poderá se solidificar), desde que o volume da fração de gás na espuma esteja entre 0,5 a 0,97 e o diâmetro das bolhas oscile entre 0,1 e 3 mm” [122].

“São formulações consistindo de uma grande quantidade de gás dispersa numa fase líquida” European Pharmacopeia, 6.0 (2011) *apud* [86].

Ainda em relação a conceitos, pode-se dividi-las em espumas secas (sólidas) e espumas úmidas (líquidas) [121]. As espumas secas, também referidas como estáticas, ocorrem quando a fase líquida se transforma em gel ou sólido, após a formação da mesma. São exemplos de espumas secas as esponjas sintéticas e algumas apresentações de borrachas. As espumas úmidas têm comportamentos dinâmicos, com aumento de volume por acréscimo de gás como nas fermentações, ou diminuição volumétrica devido à decantação gravitacional natural da fase líquida.

O volume da fração gasosa e o diâmetro das bolhas são fatores fundamentais na estrutura e comportamento das espumas [86].

Uma classificação antiga dividia as espumas em duas classes, as aquosas e as hidro-etanólicas. Contudo a demanda da indústria de materiais, farmacêutica e cosmética tem provocado o desenvolvimento de várias outras classes, como; oleosas, suspensões, cerâmicas, metálicas e biológicas (ossos e cortiças) [123,124] e Tamarkin et al (2006) *apud* [86].

3.1.2. Aspectos estruturais das espumas.

As espumas são compostas por bolhas de formas diversas, e estas por filmes. O filme é a “parede” da bolha.

A estrutura relativa à homogeneidade e comportamento das espumas úmidas depende do tamanho e formato das suas bolhas, da maneira como estão distribuídas, do modo como foram obtidas, e de quais excipientes foram utilizados. Outros fatores como, viscosidade, pH, concentração dos componentes, pressão, temperatura e características dos tensoativos também influenciam as estruturas e comportamentos das espumas.

As bolhas sofrem variações de forma de acordo com o volume da fase gasosa. Em fases gasosas com volume menor que 0,75 (75%) elas estarão dispersas e com aspecto esférico. À medida que esta fase aumenta para valores maiores que 0,75, as bolhas ficam comprimidas entre si e adquirem aspecto poliédrico. As espumas também sofrem o efeito gravitacional, o qual modifica a conformação das bolhas, comprimindo-as num efeito de empilhamento. Assim, após algum tempo em repouso, observa-se a presença de bolhas maiores na superfície e bolhas menores nas camadas mais profundas da espuma [121].

As espumas também são modificadas ao longo do tempo por efeitos como a desproporção entre o tamanho das bolhas. As pequenas se rompem com mais facilidade do que as maiores porque possuem maior pressão interna. Quando rompem para dentro de outras bolhas ocorre a coalescência, sendo o gás absorvido pelas maiores que aumentam ainda mais de tamanho (efeito de maturação de Ostwald). Outros fatores contribuintes para a instabilidade das espumas são os choques entre as bolhas em movimento Browniano promovendo as rupturas devido à energia cinética, as diferenças de pressões entre o interior e o exterior das mesmas, e diferenças de cargas elétricas que favorecem a ruptura dos filmes [86,122,125].

Como dito, a parede que forma a bolha recebe o nome de filme, e dois filmes contíguos recebem o nome de lamela. O espaço de forma triangular formado pelo encontro de três lamelas em ângulos de 120° é denominado de bordas de Plateau, em homenagem ao físico Belga que primeiro descreveu este achado [126]. Ou seja, uma borda de Plateau é o local onde três bolhas se tocam formando um espaço de baixa pressão. Junção é a denominação dada quando várias bordas se juntam formando redes interconectadas, como canais (**Figura 05**).

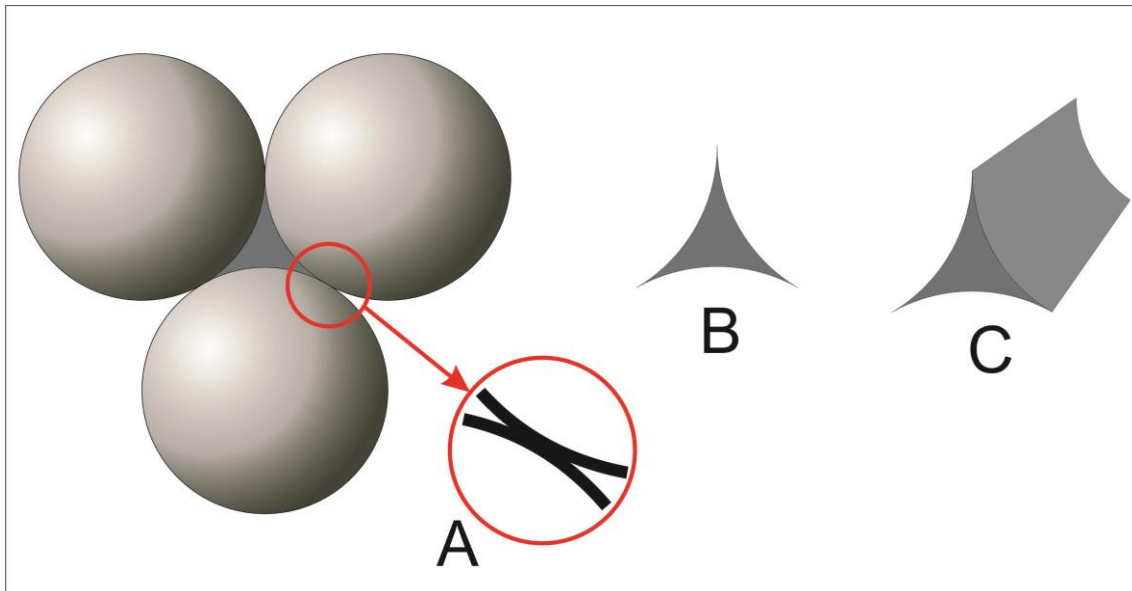


Figura 05: Desenho demonstrando as bordas de Plateau e junções. Os filmes das bolhas se tocam e formam lamelas (A). O espaço de forma triangular formado pelo encontro de três lamelas é denominado de bordas de Plateau (B). As bordas de Plateau formam canais chamados de “junção” (C) formados pelos líquidos que escorrem dos filmes. Desenho, Luiz F. Farret.

As bolhas não são estáticas, e isto se deve ao constante movimento da fase líquida pelas lamelas. Contudo, as moléculas surfactantes promovem um rápido reequilíbrio à medida que o líquido da lamela se move. Este mecanismo de estabilização recebe o nome de Gibbs-Marangoni [86,127] sendo de ocorrência comum nos detergentes. A estabilização de bolhas proteicas ocorre preferencialmente por mecanismo diverso ao de Gibbs-Marangoni. Como as moléculas proteicas são maiores que a dos detergentes, elas se movem mais lentamente nas lâminas. Ao se alinharem nas superfícies das lâminas, deixam o segmento hidrofóbico voltado para dentro da bolha, e o hidrofílico em contato com a fase líquida. Estes alinhamentos provocam uma atração visco elástica de superfície da lâmina que auxiliam na estabilidade da bolha.

Contudo, os mecanismos citados não impedem que a fase líquida sofra o efeito gravitacional. Este, associado à baixa pressão presente nas bordas de Plateau, provoca a

gradual drenagem da fase líquida para esta região, deixando as lâminas e os filmes mais finos e propensos a romperem. Se as rupturas ocorrem entre as lamelas, as bolhas tendem a coalescerem ficando maiores devido à incorporação do gás da bolha vizinha, resultando numa espuma de aspecto mais grosseiro. Se a ruptura ocorrer no filme, a fase gasosa é perdida para o meio ambiente. O líquido drenado se deposita no fundo, havendo gradual decantação entre a fase líquida e a gasosa, significando a desintegração da espuma, Philipis (1981) *apud* [128] [86,127].

3.1.3. Agentes espumantes surfactantes.

Líquidos puros não formam espumas. Portanto, há necessidade da presença de um agente espumante, isto é, um surfactante. Os surfactantes (*surface active agent*) ou tensoativos são agentes com capacidade de formar gradientes de tensão interfaciais estabilizando as bolhas recém-formadas evitando suas coalescências imediatas [122].

Os mecanismos de estabilização das interfaces das bolhas ocorrem normalmente de dois modos principais.

Os agentes surfactantes (proteicos), possuindo moléculas anfifílicas de baixo peso molecular, quando em contato com a água se arranjam colocando a parte hidrofóbica para o lado do gás ficando a parte hidrofílica da molécula em contato com a água, criando-se assim uma camada gel bidimensional, visco elástica.

Outro mecanismo de estabilização é o já descrito efeito de Gibbs-Maragoni- a fase líquida não sendo estável (efeito gravitacional e a baixa pressão presente nas bordas de Plateau) provoca constantes mudanças na espessura da lâmina das bolhas podendo provocar rupturas e coalescências. Esta instabilidade é contra balanceada pelo rápido

movimento das moléculas de surfactante adsorvidas nas superfícies das lâminas. Ao se deslocarem para o local onde houve movimento com diminuição da fase líquida e afinamento da lâmina, trazem junto novas moléculas que ocupam o local da perda repondo-a antes que a ruptura da lâmina ocorra.

Para que haja a criação das bolhas que formarão a espuma é necessária a presença do surfactante e da fase gasosa em concentrações adequadas. Contudo para que a espuma se forme, há necessidade de uma força adicional capaz de provocar a dispersão do gás na fase líquida, formando as bolhas. Assim, há três estágios na formação de espumas, sendo eles; a dissolução do agente espumante, a emulsificação do gás e a formação da espuma.

A densidade do gás que compõe a fase gasosa influencia no tamanho e na estabilidade das bolhas. Quanto mais denso o gás, menores serão as bolhas geradas e menor será a estabilidade das mesmas. Assim, o CO₂ sendo 1,5 vezes mais denso que o ar, gera espumas com bolhas menores e menos estáveis que as obtidas com ar ambiente. Assim, as bolhas obtidas com CO₂ provocam desestabilização três vezes maior que as obtidas com ar ambiente [107].

Há duas grandes classes de moléculas com propriedades tensoativas utilizadas para produção de espumas. As de baixo peso molecular, como lipídios e emulsificadores, e as de alto peso molecular como as proteínas.

Segundo Ramos-Clamont [128], o emprego de albumina obtida de soro suíno se mostrou adequado na formação de espumas para fins de consumo alimentar. Os autores obtiveram êxito utilizando concentrações de 8% de albumina, formando espumas estáveis.

3.1.4. Métodos de produção e estabilização.

As espumas podem ser produzidas por métodos mecânicos ou através da supersaturação da fase líquida pela gasosa [122].

Os métodos mecânicos visam fornecer energia para obter o encapsulamento da fase gasosa pela fase líquida. As técnicas mais utilizadas são as de movimentos de turbilhonamentos manuais ou por batedeiras, as que mexem as fases, as que agitam, que sacodem, que injetam a fase gasosa através de finos orifícios, os aerossóis que utilizam baixa pressão gerada por fluxo laminar de alta velocidade (princípio de Venturi), efervescências nas quais a fase gasosa é gerada *in loco* por reação química a partir da adição da fase líquida, por fermentação, bombas de dispersão como *Airspray*[®], ultrassom, entre outras [86,122].

Espumas com altos volumes de fração gasosa (até o limite de 75%) são mais estáveis devido à drenagem da fração líquida ser retardada. Altas concentrações do agente surfactante também aumentam a estabilidade das espumas por deixarem os filmes mais elásticos. A drenagem da fase líquida da lâmina é inversamente proporcional à viscosidade da fase. Assim, quanto mais viscosa for a fase líquida mais estável será a espuma. Devido a esta característica, acréscimos de substâncias que promovam aumento da viscosidade, como metil celulose, goma arábica, e outras substâncias hidrofílicas de alto peso molecular têm sido empregadas para aumento da estabilidade das espumas Bikerman, (1973) *apud* [86]. A temperatura e pressão também afetam a estabilidade das espumas.

3.1.5. Métodos de caracterização das espumas.

A perda de gás leva à diminuição do volume da espuma. Contudo esta diminuição não é linear à perda do volume total da espuma, pois embora o líquido decantado seja facilmente quantificado e represente uma clara evidência de perda estrutural, a coalescência formando bolhas maiores pode manter o volume final desproporcional à perda real ocorrida. Este fato dificulta as mensurações feitas pelas observações baseadas puramente nos aspectos volumétricos das espumas.

- **Avaliação macroscópica**

Dentre os métodos macroscópicos de caracterização de espumas destacam-se a estimativa da densidade relativa da espuma, o tempo de expansão da espuma e a medida do volume de líquido decantado em determinado tempo, comparado com o volume inicial da espuma.

A densidade da espuma (DE) é obtida dividindo-se o peso de determinado volume de espuma, em gramas $E(g)$, pelo peso do mesmo volume de água, também em gramas $A(g)$.

$$DE = \frac{E(g)}{A(g)}$$

O tempo de expansão da espuma é determinado pelo aumento do volume da espuma em determinado tempo quando deixada em uma bureta volumétrica.

Pela observação macroscópica as espumas podem ser classificadas como sendo, finamente porosas, grosseiramente porosas, viscosas e semifluidas.

Outra característica importante a ser observada nas espumas é quanto à facilidade de desestabilização. Neste aspecto, podem ser divididas em categorias diversas, como.

- Espumas de rápida desestabilização, como as hidro-etanólicas, que são termicamente instáveis e colapsam a simples exposição da temperatura cutânea.
- Espumas saponáceas, que crescem ao serem esfregadas e se mantêm estáveis por longo tempo ao contato com a pele, como os cremes de barbear.
- Espumas quebradiças, mas estáveis à temperatura cutânea. Contudo, colapsam e espalham-se ao ser aplicada moderada força de cisalhamento. São ideais para usos dermatológicos e em mucosas.

- **Avaliação microscópica**

Estas técnicas visam analisar as características como tamanho, uniformidade e quantidade de bolhas por área ou volume, através da microscopia estérea. Esta técnica utiliza microscópio com objetivas independentes e em ângulos separados permitindo uma maior profundidade de campo. Contudo, alguns fatores como a dificuldade de visualização de campo em três dimensões associada à visualização de imagens ao campo de ondas visíveis ao olho humano, limita a aplicabilidade desta técnica [127,120].

- **Análise da espuma por analisador de textura**

Nesta técnica a espuma é disposta em um recipiente, e um disco penetra até uma determinada profundidade, sendo logo a seguir retirado. As forças necessárias para sua penetração e retirada são registradas graficamente.

- **Método do cilindro**

Através deste teste é possível determinar a expansão da espuma (EE), a estabilidade líquida (EL), a estabilidade do volume da espuma (EVE) e a fração gasosa (FG). A espuma recém-formada é colocada num cilindro de vidro e o volume inicial anotado. Após determinado tempo (30 minutos, por exemplo), o volume residual da espuma (Vre) assim como o volume líquido drenado, também são medidos. Os dados obtidos são expressos em percentual (%) em relação ao tempo observado.

Assim, a expansão da espuma (EE) é dada pela fórmula:

$$EE(\%) = \frac{\text{Volume da espuma} - \text{Volume da formulação}}{\text{Volume da formulação}} \times 100$$

Onde o volume da espuma (Ve) representa o volume obtido pelo volume da formulação que gerou a espuma (Vf). Quanto maior for EE, maior será a capacidade geradora de espuma pela formulação.

A estabilidade líquida da espuma (EL) é obtida pela divisão do volume líquido drenado após o tempo determinado (Vl) pelo volume da formulação que gerou a espuma (Vf). Quanto mais baixo for a EL mais estável será a espuma produzida.

$$EL(\%) = \frac{Vl}{Vf} \times 100$$

A estabilidade do volume da espuma (EVE) é dada pela divisão do volume da espuma após determinado tempo (V_{re}) dividido pelo volume inicial da espuma (V_e).

$$EVE(\%) = \frac{V_{re}}{V_e} \times 100$$

Neste caso, quanto maior for o EVE, maior será a estabilidade da espuma produzida.

- **Estabilidade da espuma pelo método Turbiscan**

Esta técnica permite uma abordagem rápida e prática para caracterizar a estabilidade da espuma.

O método utiliza o princípio de dispersão de luz de Faraday e Tindall, o qual postula que substâncias coloidais fracionam a luz recebida. Desta forma utiliza a diferença de refração da fase líquida comparada à fase sólida. A medida é obtida através da comparação da intensidade luminosa do feixe emitido com o feixe refletido. A fonte luminosa utilizada para análise de espumas costuma ser a infravermelha na faixa de 850nm ($\lambda=850\text{nm}$).

- **Propriedades reológicas das espumas**

As propriedades reológicas das espumas são difíceis de serem medidas devido à instabilidade da fase líquida e pelo deslizamento da fase líquida sobre as lâminas das bolhas [129]. O método pode ser utilizado no modo oscilatório para estudo da elasticidade do filme e conseqüentemente a estabilidade da espuma.

- **Medidas da capacidade de formação de espuma em formulações cosméticas**

O método mais utilizado é o de Ross e Miles [86] o qual se apoia no fato que o volume da espuma é uma função praticamente linear do peso de todos os materiais que a compõe e não das suas capacidades de formar espumas. O líquido teste com o agente espumante é pipetado, medido e colocado no reservatório que contém a solução teste. O volume de espuma gerado é medido imediatamente e após 5 minutos, objetivando avaliar a estabilidade da coluna de espuma.

Uma variação do método para determinar as características de geração de espuma consiste em colocar a solução que formará a espuma num cilindro graduado medindo os volumes antes e após a obtenção da espuma por agitação.

Inúmeros outros testes são descritos para esta finalidade, como o do rotor, o de Schlachter-Dierkes e Colson, o de estresse e estabilidade, e o de meia-cabeça (para shampoos) [86], porém suas descrições detalhadas fogem ao escopo desta Tese.

3.2. Materiais e Métodos.

3.2.1. Preparação das espumas.

Várias fórmulas foram testadas até se obter a que atendesse as necessidades, ou seja, uma espuma consistente e homogênea, com viscosidade e estabilidade que permitisse navegar por cateter e com capacidade de agregar o fibrinolítico.

A espuma deveria ser constituída por substâncias isentas de toxicidade e preferencialmente de uso comprovado em humanos sem provocar efeitos colaterais nocivos.

Inicialmente foram realizados experimentos de confecção de espumas empregando água, albumina de ovo em pó liofilizado como agente proteico tensoativo adicionado à glicose, com intenção de funcionar como agente estabilizador da espuma, em proporções de 3:1:0,5; 3:0,5:1 e 3:1:1. Os componentes eram colocados em frascos tampados e agitados manualmente por 1 minuto.

Com base nos efervescentes houve tentativa de obtenção da espuma a partir de bicarbonato de sódio em pó e ácido cítrico nas proporções de 3g:1mL sendo repetidas com o ácido a 0,5; 1 e 5%. Estas substâncias foram escolhidas por serem de uso médico habitual. Suas reações químicas geram como fase gasosa o CO₂, um gás inerte para o organismo.

Outra tentativa envolveu a utilização de *Tween* 80 (polissorbato) como tensoativo em diluições em água nas proporções de 0,5:3; 1:3 e 1:4. Nesta ocasião empregou-se pela primeira vez nos experimentos, a técnica proposta por Tessari [105] para a obtenção da espuma.

Nenhum dos experimentos testados havia empregado somente elementos naturalmente presentes no plasma humano. Percebeu-se, que se a espuma fosse realizada utilizando somente tais substâncias, não deveria apresentar toxicidade significativa.

Assim, empregou-se o método de Tessari [105] utilizando-se albumina humana a 20% como fase aquosa e proteica e CO₂ como fase gasosa. Deste modo as espumas puderam ser feitas a partir de elementos naturalmente presentes no plasma.

As espumas foram obtidas com 1 mL de albumina humana a 20% lote LB009878 (Baxter Healthcare Co. CA, USA) e preparadas utilizando-se duas seringas de vidro de 10 mL (Normax, Marinha Grande, Portugal) conectadas por uma torneira de três vias. Após a conexão da seringa à torneira de três vias, um volume de CO₂ era aspirado e a seguir, a seringa contendo a albumina era conectada. Os volumes de CO₂ variaram de modo a se obter a espuma mais estável (**Tabela 01**).

Volume de CO ₂ (mL)	Volume da solução de albumina (mL)	Razão da solução CO ₂ :albumina (v:v)
1	3	1:3
1,5	2,5	1,5:2,5
2	2	2:2
2,5	1,5	2,5:1,5
3	1	3:1
3,5	0,5	3,5:0,5

Tabela 01 – Composição das espumas nas diferentes razões estudadas.

O CO₂ e a albumina eram misturados em movimentos de “vai e vem” durante 20 passagens entre as duas seringas conforme preconizado por Tessari. A espuma assim obtida era imediatamente caracterizada.

Para o preparo da espuma fibrinolítica, a estreptoquinase (Solustrep[®], 1.500.000 U, Bergamo, Brasil) era previamente dissolvida na solução de albumina. Esta solução era misturada ao CO₂ aspirado pela outra seringa conectada ao sistema de três vias e o processo de mistura e obtenção da espuma era realizado conforme o método já descrito. A concentração final da estreptoquinase na espuma era de 100.000 U/mL.

3.2.2. Caracterização das espumas.

A estabilidade, a viscosidade aparente e a densidade das espumas foram os parâmetros utilizados para caracterizar as espumas obtidas.

O método do cilindro, conforme descrito por Arzhavitina and Steckel [86] foi empregado para determinar a estabilidade das espumas. Quatro mL da espuma recém-obtida eram colocados num cilindro de vidro de 10 mL. Após 30 minutos o volume residual da espuma era medido e comparado ao seu volume inicial. Assim, estabilidade da espuma (EE) foi determinada conforme a fórmula abaixo;

$$EE = \frac{V_{E(30\text{ min})}}{V_{E(\text{inicial})}} \times 100$$

Sendo respectivamente $V_{E(30\text{ min})}$ e $V_{E(\text{inicial})}$ o volume da espuma após 30 minutos e o volume inicial da espuma (~ 4 mL) **Figura 06**.



Figura 06: Estabilidade da espuma em cilindro volumétrico. Imagem da esquerda no tempo = 0 minuto e imagem da direita no tempo = 30 min.

A viscosidade aparente das espumas foi determinada a temperatura ambiente em viscosímetro de Brookfield do tipo cone e placa, modelo DV-III ULTRA (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA), utilizando o *software* Rheocalc V3.3 Build 49-1. Após a preparação da espuma, 1 mL da amostra era colocada no cone com uma haste CP-52 e submetida a índices de cisalhamento na ordem de 40 a 240 (seg^{-1}), onde a viscosidade aparente era determinada de acordo com a taxa de cisalhamento.

A densidade da espuma foi obtida dividindo-se o peso de 4 mL de espuma (0,99g) pelo peso de 4 mL de água (4g).

3.2.3. Obtenção dos coágulos para os testes *in vitro*.

O sangue foi obtido por punção venosa de um doador voluntário masculino, jovem e saudável. Após a assinatura do termo de doação, foram colhidos 350 mL de sangue total, grupo A+ em bolsa de coleta sanguínea (Terumo Medical do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), contendo CPDA-1 (citrato com fosfato dextrose e adenina) como anticoagulante. O sangue foi armazenado a 4°C durante 26h, tempo que durou o experimento. Os coágulos foram obtidos após colocar-se 10 mL do sangue em 15 tubos de ensaio de vidro, e acrescentar-se 2 mL de gluconato de cálcio a 10% para indução da trombose [3]. Os tubos foram mantidos a 37°C por 3 horas, sendo então os coágulos de aproximadamente 7 cm de extensão, retirados sobre uma peneira. Os coágulos eram então lavados com soro fisiológico, secados com papel filtro e pesados para proceder-se o experimento *in vitro* **Figura 07**.



Figura 07: Coágulo após lavagem com soro fisiológico.

3.2.3. Modelo *in vitro*.

Para realização do modelo *in vitro* utilizou-se um cateter de trombólise Multi-Sideport 5F de 100 cm (Cook Medical Inc. Bloomington, IN, USA) que apresenta múltiplos furos dispostos de modo circular estendendo-se por 7 cm na região distal. O cateter foi modificado pelo acréscimo de um segmento de ponta de agulha 0,7x25mm. A ponta foi obstruída por cola sendo ela também colada à extremidade distal do cateter **Figura 08**. Esta modificação teve os objetivos de facilitar a penetração do cateter no trombo e de impedir que o fluxo saísse pelo orifício distal.



Figura 08: Cateter de fibrinólise com ponta modificada por segmento de agulha obstruída.

Cada coágulo foi colocado sobre uma placa de vidro e penetrado pelo cateter no sentido longitudinal. Teve-se o cuidado que o cateter permanecesse o mais centrado possível no seu interior e o coágulo bem distendido sobre a região multiperfurada.

Após a obtenção da espuma com o fibrinolítico incorporado (100.000 U/mL), a seringa contendo a mesma era conectada à pistola do Fountain Infusion Systems® (Merit Medical Systems Inc. UT, USA), sendo então, conectada ao cateter. A pistola era ajustada para disparar o volume de 1 mL. O primeiro disparo era desprezado, sendo realizado antes da introdução do cateter no coágulo. Este cuidado foi tomado para preencher completamente o cateter com a espuma, garantindo que todos os disparos nos experimentos tivessem a mesma pressão e volume liberado dentro do coágulo, ou seja, 1 mL. Assim que o disparo intratrombo ocorria o mesmo era colocado dentro de um novo tubo de ensaio, retornando-se ao banho Maria (37°C) e acrescentando-se 5mL do mesmo sangue citratado. Não foi empregado qualquer tipo de anticoagulação adicional que não fosse o citrato presente na bolsa de coleta.

Do mesmo modo procedeu-se em relação ao experimento da espuma sem o fibrinolítico.

Uma solução de estreptoquinase preparada pela dissolução do pó liofilizado em solução salina isotônica e contendo 100.000 U/mL era utilizada como controle e injetada do mesmo modo e pelo mesmo sistema descrito para as espumas.

3.2.4. Observação do efeito trombolítico.

As condições experimentais eram mantidas por 30 min. Após este período o coágulo residual era removido do tubo de ensaio. O conteúdo do tubo era filtrado

através de fina peneira drenando assim, o excesso de líquido. O coágulo retido na peneira era lavado com soro fisiológico, secado com papel filtro e pesado. As diferenças entre os pesos obtidos antes e depois do experimento foram expressas como porcentagem de lise dos coágulos. Os experimentos foram realizados cinco vezes para a espuma fibrinolítica, a solução controle e a espuma sem fibrinolítico.

3.3. Análise estatística.

O experimento foi dividido em três grupos, cada um com cinco réplicas.

A quantificação do resultado baseou-se no percentual de dissolução dos coágulos, após o término de cada experimento.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a hipótese nula de não existir diferença entre os três grupos (espuma com estreptoquinase, estreptoquinase em soro fisiológico e espuma sem estreptoquinase). O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para comparação *post-hoc* dos grupos entre si, ajustando-se os valores p para as comparações múltiplas com a correção de Bonferroni. O software Stata *release* 11 (Stata Corp, College Station, TX, EUA) foi utilizado para análise estatística.

Supondo um desvio padrão da variável de estudo de 6,5 e um erro alfa de 0,025, o tamanho da amostra desta pesquisa confere uma potência de 58% para detectar um aumento de 50% na média da variável do estudo.

3.4. Resultados.

As espumas obtidas a partir de água, albumina de ovo e açúcar apresentaram aspecto não homogêneo, com bolhas de tamanhos irregulares com a predominância dos tamanhos grandes. A espuma não apresentava estabilidade, havendo rápida coalescência das bolhas menores formando bolhas grandes. Alterações nas concentrações de glicose não mostraram afetar significativamente estas características. Assim, esta opção foi abandonada.

A pesquisa visando obter espuma a partir de efervescência também revelou espumas sem estabilidade e com bolhas de tamanhos irregulares e grandes com uma característica adicional que era o aumento de volume quando a reação química desencadeava. Esta característica representava um desafio adicional que seria como manter a expansão volumétrica em ambiente estéril, já que o propósito da espuma era ser futuramente injetada na circulação. Esta opção também foi abandonada.

A utilização de *Tween* 80 em água com obtenção de espuma pelo método das duas seringas proposto por Tessari [105] revelou espumas de consistência homogênea e com boa viscosidade ao exame macroscópico. Contudo, apresentava baixa estabilidade, havendo rápida separação de fases quando em repouso. Devido a esta característica da espuma e o fato de o polissorbato (*Tween*) ser um elemento estranho ao organismo, este experimento também foi abandonado.

Em nenhum dos experimentos acima relatados foram obtidas espumas com as características desejadas de consistência, homogeneidade, viscosidade, estabilidade e ausência de toxicidade de seus componentes.

Contudo, quando se empregou a albumina humana preparada de acordo com o modelo descrito por Tessari [105], obteve-se a espuma com as características necessárias.

A obtenção da espuma pelo método proposto por Tessari e modificado neste trabalho pela utilização de CO₂ e albumina humana a 20% como fases gasosa e líquida respectivamente é simples e fácil de realizar. Todas as razões testadas entre o gás e o líquido produziram espumas de consistência cremosa (**Figura 09**).



Figura 09: Espuma obtida pelo método proposto por Tessari.

A estabilidade das espumas em função das diferentes razões de volume entre o CO₂ e a albumina, apresentou uma razão linear ($R^2 = 0.999$) conforme gráfico apresentado na **Figura 10**.

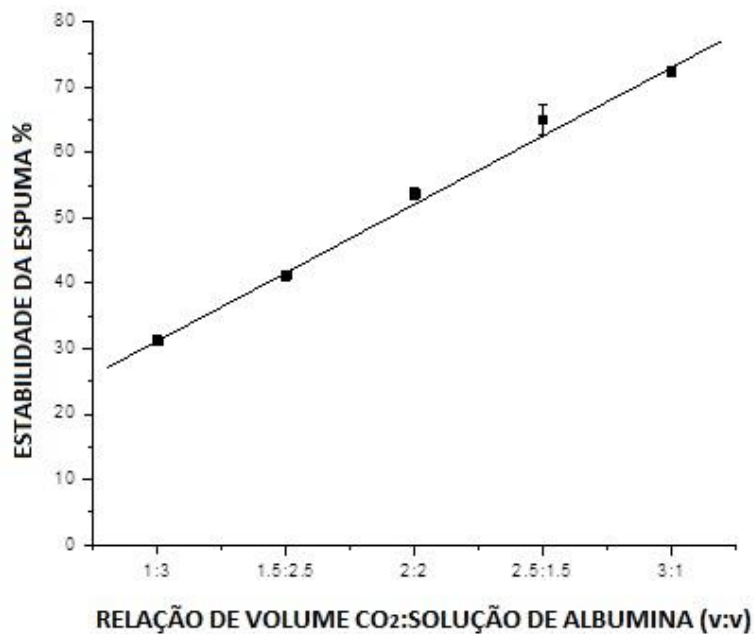


Figura 10: Influência da taxa de CO₂: solução de albumina na estabilidade das espumas. n = 3.

A solução com relação de 3:1 mostrou ser a que produz a espuma mais estável, onde $72.5 \pm 0.7\%$ do volume inicial da espuma permanecia após 30 minutos de observação.

Com objetivo de verificar a influência destas relações sobre a viscosidade das espumas, a viscosidade aparente de cada amostra foi determinada com um índice de cisalhamento entre $40 - 240 \text{ seg}^{-1}$ (**Figura 11**).

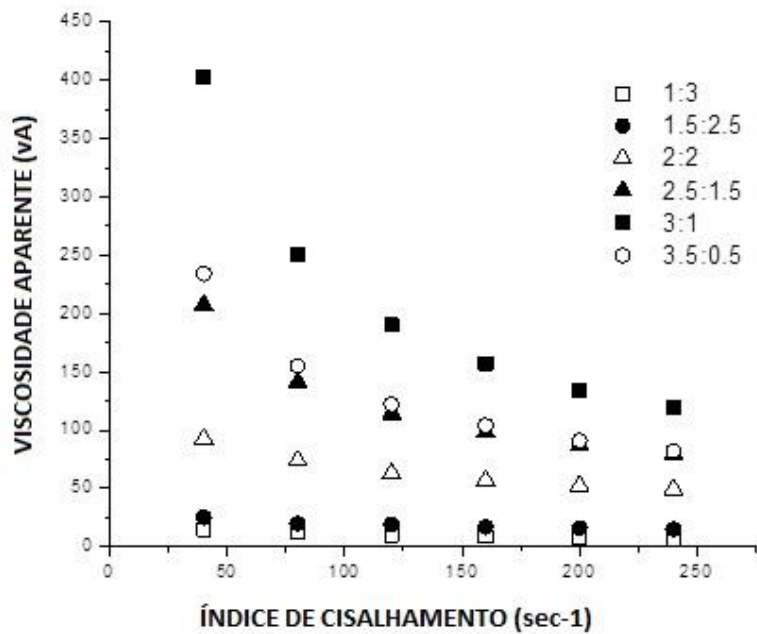


Figura 11: Influência da taxa de CO₂: solução de albumina sobre a viscosidade aparente das espumas.

À medida que o índice de cisalhamento foi aumentado, a viscosidade aparente de todas as amostras da espuma diminuiu o que caracterizou um comportamento do tipo não Newtoniano.

Do mesmo modo como a estabilidade, a viscosidade aparente das espumas aumentou com o aumento na razão de solução CO₂:albumina, conforme mostrado na

Figura 12.

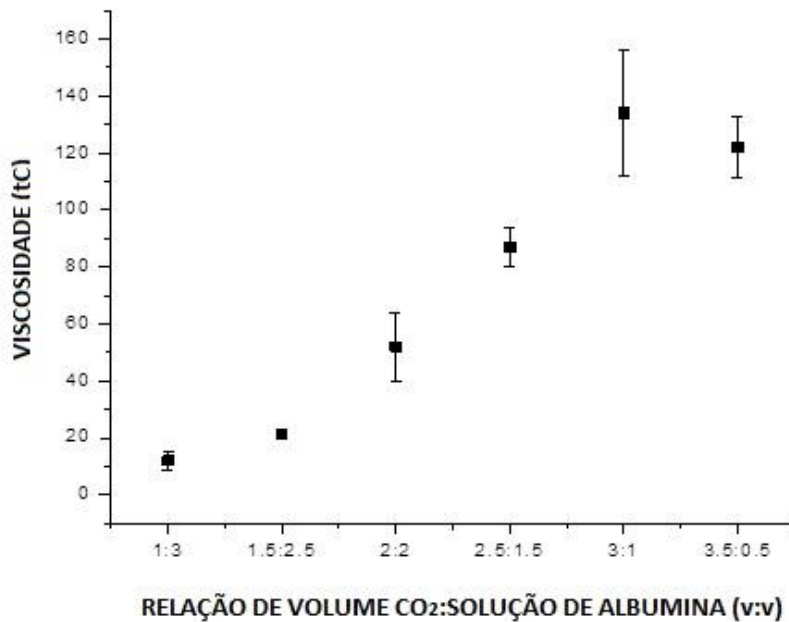


Figura 12: Influência da relação CO₂:solução de albumina em relação a viscosidade (determinada com uma tensão de cisalhamento de 120 seg⁻¹) das espumas. n = 3; margem de erro: desvio-padrão.

Contudo, razões de solução CO₂:albumina acima de 3:1 não promoveram espumas com maior viscosidade. Assim, a solução com relação 3:1 foi utilizada para incorporar a estreptoquinase e preparar a espuma trombolítica.

A densidade da espuma foi de 0,2475 tendo sido obtida dividindo-se o peso de 4 mL de espuma (0,99g) pelo peso de 4 mL de água (4g).

Para verificar a influência da estreptoquinase na viscosidade das espumas trombolíticas preparamos uma espuma com as mesmas proporções de CO₂ e albumina (3:1) acrescida de 100.000 U de estreptoquinase por mL de espuma. Esta concentração de estreptoquinase foi a mesma utilizada no estudo *in vitro*. Como demonstrado na **Figura 13**, a incorporação da estreptoquinase teve um efeito muito pequeno na viscosidade da espuma, a qual apresentou leve decréscimo com a adição deste fármaco.

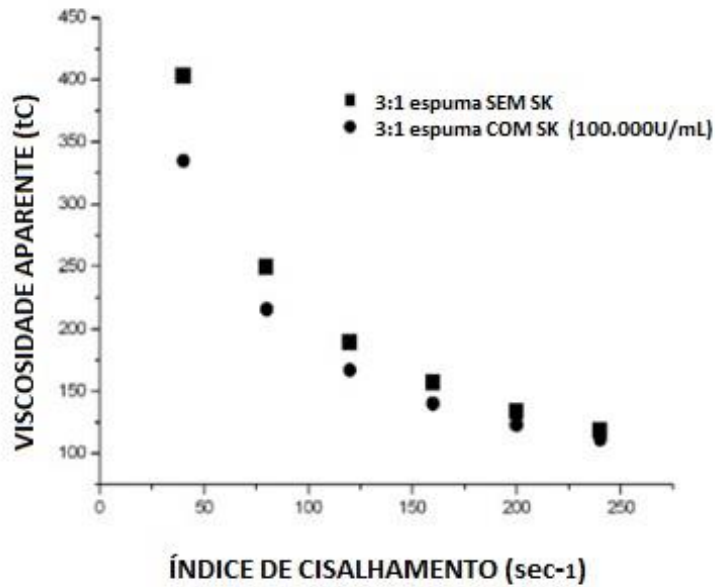


Figura 13: Determinação das viscosidades das espumas com e sem adição de estreptoquinase (SK). Método de cisalhamento. n = 3.

O estudo da atividade trombolítica *in vitro* revelou que a utilização do controle com estreptoquinase em solução salina promoveu $32,07 \pm 3,41\%$ da dissolução do coágulo após 30 minutos de experimento, a espuma trombolítica obteve $44,78 \pm 9,97\%$ de dissolução do mesmo e a espuma sem fibrinolítico apenas $19,2 \pm 7,19$ em período semelhante (**Figura 14**).

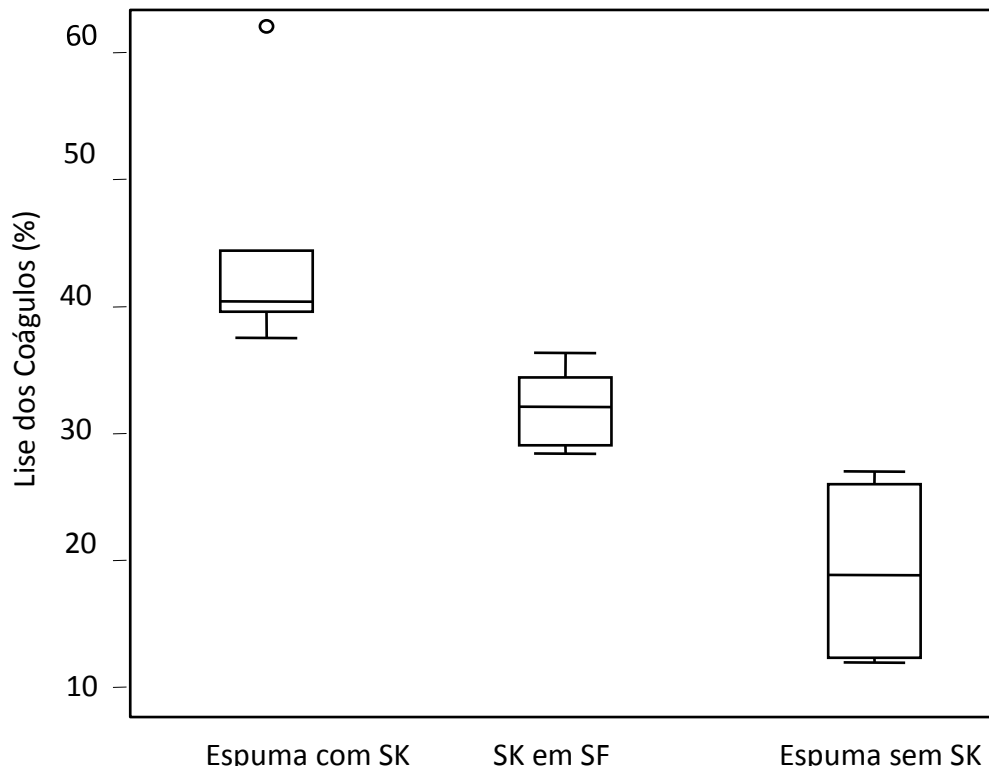


Figura 14: Gráfico *box-plot* com os dados do % de lise por grupo.

A **tabela 02** mostra descritivamente os resultados do percentual de lise encontrado, por grupo, como também o teste para investigar a existência de diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 02 - Estatísticas descritivas e teste estatístico referente ao % Lise, por grupo.

	Espuma de SK	Solução de SK	Espuma sem SK	P-valor
% lise	44,78 ± 9,97	32,07 ± 3,41	19,2 ± 7,19	0,0019

Média ± Desvio Padrão

P-valor do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis

Os resultados de comparação das três médias utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis apresentou um $p=0,0019$.

A comparação dos 3 grupos 2 a 2 com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, ajustado para comparações múltiplas, apresentou um valor de $p=0,027$ nas três comparações.

Assim, a diferença média nas atividades trombolíticas entre a solução de estreptoquinase, a espuma trombolítica e a espuma sem trombolítico são diferentes entre si e foi significativa com valor de $p=0,0019$.

3.5. Discussão.

Como apresentado no Capítulo I, os métodos de aplicação de agentes fibrinolíticos compreendem a via sistêmica e a por cateter intratrombo [33]. A administração de fibrinolíticos intratrombo é atualmente a melhor abordagem para restabelecer o fluxo sanguíneo em oclusões parciais ou totais de artérias e veias [66,81]. Dentre os agentes fibrinolíticos mais utilizados - estreptoquinase, uroquinase e o ativador recombinante tecidual do plasminogênio (rt-PA) [34,78] – a estreptoquinase foi escolhida para este trabalho. Tal escolha foi motivada por sua ampla utilização no Brasil, associada a seu baixo custo quando comparado aos outros fibrinolíticos. Além disto, sua eficácia é similar aos outros fibrinolíticos citados, havendo evidências que comprovam sua relação custo-benefício [48]. Inúmeros estudos sugerem que a utilização de estreptoquinase possui efeito terapêutico similar, e com menor incidência de complicações hemorrágicas quando comparada ao uso do rt-PA [21,18,130].

Pautados no fato conhecido há longa data que as substâncias ativas utilizadas para esclerose de varizes e microvarizes na forma de espuma têm seus efeitos potencializados quando comparados à forma líquida [106,97,105,101], o efeito

trombolítico da estreptoquinase sob a forma de espuma foi comparado à forma de utilização convencional, uma solução diluída.

Desde Hipócrates se sabe que patologias renais provocam urina “espumosa” pela presença de proteínas na urina [131,132] sendo a albumina a proteína predominante nestas situações. Assim, um novo modo de obtenção de espumas a partir de albumina humana foi iniciado.

O CO₂ foi escolhido por ser gás inerte e largamente empregado em procedimentos médicos. Deste modo as espumas puderam ser feitas a partir de elementos naturalmente presentes no plasma.

Para o preparo das espumas foi utilizado o CO₂ como fase gasosa e a albumina humana a 20% como fase líquida, por serem elementos biocompatíveis, de baixo custo e com utilização clínica de longa data [93,94,98,99]. A escolha do CO₂ levou em consideração sua bem estabelecida utilização, em grandes volumes, nas angiografias por CO₂ sem ocorrência de efeitos colaterais significativos [98,99,133], assim como o fato das espumas produzidas para escleroterapia a partir deste gás provocar menos efeitos colaterais, como escotomas cintilantes e cefaleias do que as produzidas com ar ambiente [134].

Antes de iniciar a preparação das espumas trombolíticas foi estabelecida a razão mais adequada entre a albumina e o CO₂ que resultasse em uma espuma mais estável e viscosa. Os resultados dos nossos testes mostraram que a estabilidade e a viscosidade aparente das espumas aumentavam com o aumento da razão de CO₂:solução de albumina, o que significa que ambos os parâmetros aumentam conforme a concentração da albumina diminui. De acordo com Arzhavina e Steckel (2010) [86], espumas com frações gasosas elevadas (até 75%) são mais estáveis devido ao retardamento da

drenagem gravitacional da fração líquida, aumentando o tempo de transformação de bolhas para líquido. Este retardo da drenagem da fase líquida é traduzido por espumas com maior estabilidade.

Nosso estudo evidenciou que as soluções de CO₂:albumina humana numa razão de 3:1 produziram a espuma mais viscosa e estável. Utilizamos albumina humana a 20%, representando uma concentração bem acima das referidas por outros autores, os quais utilizaram concentrações variando entre 4 a 8% na confecção de espumas de albumina para usos em contrastes e na indústria alimentícia [95,93,128]. Esta alta concentração de albumina, elevou a viscosidade da fase líquida da espuma obtida. O aumento da viscosidade favorece a incorporação gasosa pela fase líquida além de formar filmes mais viscosos que retardam a drenagem desta fase [135]. Esta razão corresponde a uma fração gasosa de 0,75 (75%), sendo este o limite superior para obtenção de espumas sem compressão e deformação das bolhas. O limite inferior do percentual da fração gasosa é por volta de 0,5 (50%) [122]. Assim, à medida que a fração gasosa das espumas se afastava da faixa 0,5-0,75, a viscosidade diminuía, resultando em espumas menos estáveis, o que confirmou os dados sugeridos pela literatura (**Figuras 10, 11 e 12**). Deste modo, a razão 3:1 (0,75) foi à escolhida para incorporar a estreptoquinase e preparar a espuma trombolítica.

Para o estudo da atividade trombolítica da espuma, foi utilizado um modelo *in vitro* com coágulos mantidos a 37°C. Sendo a estreptoquinase uma substância com atividade enzimática, teve-se o cuidado em manter os coágulos em temperatura semelhante a corporal.

Foram utilizados coágulos obtidos a partir do sangue humano. Tal escolha foi embasada no relato de outros autores que sugerem ser o sistema fibrinolítico muito

variável nas diferentes espécies animais, provocando resultados pouco confiáveis e não transponíveis aos obtidos no sistema fibrinolítico humano [136]. O sangue do mesmo doador foi utilizado em todos os experimentos.

A utilização de gluconato de cálcio a 10% na obtenção de coágulos a partir do sangue citratado implica em aumento do tempo necessário à lise do mesmo quando comparado aos coágulos formados espontaneamente a partir do sangue não citratado conforme descrito há longa data [19,137,138]. Contudo, como este efeito ocorreu em todas as formulações testadas, inferimos que o mesmo não influenciou nos resultados obtidos.

A dose de estreptoquinase utilizada neste estudo foi de 100.00 U/mL, administrada intracoágulo por uma única injeção nas três formas de apresentação testadas (espuma com estreptoquinase, espuma sem estreptoquinase e diluição convencional da estreptoquinase). Para manutenção dos parâmetros de velocidade, pressão e volume de infusão, foi utilizado o sistema de aplicação por pistola, o Fountain Infusion Systems[®] que disparava um mL da solução.

Como a estreptoquinase é um fibrinolítico de ação indireta, ou seja, atua transformando o plasminogênio (presente no plasma) em plasmina, fez-se necessário acrescentar-se 5 mL de sangue em cada um dos tubos de ensaio para fornecer o substrato para sua ação.

O efeito trombolítico foi determinado 30 minutos após a aplicação do fibrinolítico. Este tempo foi determinado levando-se em consideração que a meia-vida da estreptoquinase na forma de complexo ativo Sk-plasminogênio é de 18-30min [21,139]. Somente uma dose de estreptoquinase era aplicada, a fim de garantir que o efeito fibrinolítico era devido à estreptoquinase contida no coágulo e no seu entorno, ao

invés de resultar de um efeito cumulativo devido a mais de uma dosagem infundida. Tendo-se realizado uma única aplicação, supôs-se que os resultados obtidos na dissolução do coágulo estariam vinculados ao veículo de aplicação, que teria permitido maior tempo de contrato do fibrinolítico com o coágulo.

Os resultados demonstraram que embora a dose de estreptoquinase utilizada (100.00 UI) fosse muito menor que a habitualmente empregada de modo convencional por via sistêmica em *bolus* para tratamento do enfarte do miocárdio (1.500.000 UI) [140], obteve-se $44,78 \pm 9,97\%$ de dissolução do coágulo com a injeção de uma única dose de 100.00 UI de estreptoquinase na forma de espuma trombolítica, versus $32,07 \pm 3,41\%$ na forma líquida, o que é estatisticamente significativo.

Observou-se também uma pequena diminuição no peso dos coágulos quando da aplicação da espuma sem fibrinolítico $19,2 \pm 7,19\%$. Atribui-se, tal efeito, a retração e fibrinólise natural do coágulo durante o tempo que transcorreu o experimento [1,6].

Ficou claro nos experimentos, que a espuma trombolítica demonstrou ser mais eficiente na lise do coágulo do que a forma convencional. Considerando que a concentração da estreptoquinase, o volume administrado, a pressão de infusão e a duração do experimento foram exatamente as mesmas para ambos os grupos, concluiu-se que a diferença entre o efeito trombolítico entre os grupos foi causada pelo veículo utilizado, a espuma trombolítica. Assim, deduziu-se que a espuma preparada pela mistura de CO₂ e albumina humana a 20% numa razão de volume de 3:1 parece ser promissora como veículo de transporte e aplicação de estreptoquinase intratrombo além de promover aumento do efeito fibrinolítico.

CAPÍTULO IV

Considerações finais.

Nesta tese partiu-se da premissa que espumas são mais eficientes na obtenção de efeitos esclerosantes no sistema venoso do que as apresentações líquidas. Com esta premissa e com o objetivo de melhorar o efeito fibrinolítico através do aumento do tempo de permanência do mesmo no local da trombose, - fato que poderia ocasionar uma melhora significativa na sua eficácia, - transportou-se este conceito para uma terapia diametralmente oposta, a fibrinólise. Levantou-se a hipótese que se o fibrinolítico fosse associado a uma espuma, poder-se-ia, através do aumento da viscosidade e da área de contato do fibrinolítico com o trombo ter-se uma substancial redução da sua dose. Produziu-se assim, uma associação inédita ao criar-se uma espuma fibrinolítica pela associação de albumina humana, CO₂ e estreptoquinase. Por fim, demonstrou-se que esta espuma fibrinolítica é mais potente que o fármaco utilizado na diluição em solução salina.

As fases da espuma foram compostas por CO₂ e albumina humana a 20%. A combinação destes componentes para a confecção da mesma se mostrou adequada para o fim proposto nos estudos de estabilidade e viscosidade.

O estudo de estabilidade demonstrou que a desintegração da espuma obtida com a concentração de 3 partes de gás carbônico para uma parte de albumina (3:1) atingiu 72,5% do seu volume inicial em 30 minutos conforme demonstrado na **figura 06**. A meia vida da estreptoquinase quando na forma de complexo ativo Sk-plasminogênio é de 18-30 min. Como a espuma mantinha 72,5% do volume inicial após 30 minutos em

repouso, ela mostrou ter duração adequada à proposta do projeto permitindo que a estreptoquinase agregada à espuma permanecesse no local por período maior a sua meia vida.

Adotou-se a viscosidade da proporção (3:1) por ser a maior obtida com a mistura das fases conforme as demonstrações gráficas das **figuras 10, 11 e 12**. Tal viscosidade se mostrou adequada aos objetivos de reter a espuma fibrinolítica no interior e ao redor do coágulo durante o tempo que duraram os experimentos, ou seja, trinta minutos cada. Tal observação foi possível pela visualização da espuma residual dentro dos coágulos após a retirada deles dos tubos de ensaio. A agregação da estreptoquinase na dose de 100.000 UI/mL não provocou alterações significativas na obtenção da espuma proposta, assim como nas suas propriedades de estabilidade e viscosidade, conforme demonstrado ao longo deste estudo.

A obtenção dos coágulos através da adição de gluconato de cálcio a 10%, mantendo-se em tubos de ensaio em banho a 37°C, se mostrou factível, assim como os processos de lavagem, secagem e pesagem antes e após o término de cada experimento.

O modelo *in vitro* proposto também se mostrou adequado, mantendo os coágulos e o sangue ao seu entorno aquecidos a 37°C.

Nele foi possível criar e repetir, situações experimentais semelhantes em todos os testes realizados.

A confecção de espumas pelo método proposto por Tessari se mostrou simples e de fácil aplicação prática. Contudo, na concepção final do dispositivo do qual a patente foi solicitada, sugeriu-se um sistema que mantivesse o gás carbônico e o fármaco liofilizado hermeticamente isolados da albumina, somente havendo a possibilidade de ruptura do isolamento ao se proceder a mistura das fases. Esta proposta técnica visa

evitar possível contaminação com o ar ambiente no sistema pela sua aspiração inadvertida. Este cuidado também garante que a proporção proposta entre as fases seja mantida inalterada.

A solução de SK aplicada em *pulse spray* com a diluição em solução salina isotônica mostrou capacidade fibrinolítica com redução de $32,07 \pm 3,41\%$ no peso dos coágulos, enquanto a espuma de SK aplicada da mesma forma, (*pulse spray*) apresentou redução média de $44,78 \pm 9,97\%$.

Assim, a espuma com SK demonstrou capacidade fibrinolítica com redução do peso dos coágulos maior que a solução convencional aplicada da mesma forma e nas mesmas condições experimentais conforme demonstrado na **figura 13**.

Este resultado estatisticamente significativo poderá abrir espaço para reduções nas doses fibrinolíticas atualmente empregadas. Com seus efeitos potencializados pelas suas maiores disponibilidades junto aos trombos, suas doses poderão sofrer reduções.

Com a redução das doses totais utilizadas devido à potencialização do efeito trombolítico obtido pela agregação à espuma espera-se que seja diminuído o principal efeito colateral na sua utilização, ou seja, as complicações hemorrágicas. Assim, poder-se-á ter ampliação do campo de indicações dos fibrinolíticos para casos nos quais seriam contraindicados se fossem utilizadas as doses convencionais preconizadas. Entre as novas possibilidades de utilização poderão estar os casos de trombozes arteriais e venosas em pacientes recém-operados, no pós-parto imediato, em politraumatizados, e até mesmo em patologias neurológicas recentes como o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI).

Os resultados *in vitro* encorajam a prosseguir as pesquisas *in vivo* em cobaias no laboratório. Novos experimentos deverão ser realizados, como a utilização de espuma fibrinolítica intratrombo no tratamento do infarto agudo do miocárdio, do acidente vascular cerebral isquêmico, e de outras trombozes arteriais e venosas.

A utilização por injeção endovenosa periférica e central da espuma fibrinolítica para tratar embolia pulmonar maciça também deverá ser testada uma vez que o fluxo sanguíneo venoso levaria naturalmente a espuma trombolítica para o local de ação, ou seja, sobre o(s) êmbolo(s) pulmonar.

Sugere-se também que outros campos possam ser pesquisados quanto à utilização de fármacos veiculados a espumas de albumina e CO₂.

Espumas carreadoras de antibióticos poderão ser utilizadas por injeção venosa periférica para tratar infecções pulmonares. Injeções intra-articulares poderão ser utilizadas para tratamentos de artrites sépticas. Injeções intracavitárias em espaços pleurais e peritoneais poderão auxiliar no tratamento de peritonites e pleurites.

A utilização como carreadoras de anti-inflamatórios para injeções intra-articulares, ou como espuma antitumoral para aplicação intracavitária ou intratumoral deve ser cogitada.

Espumas com antivirais, e antifúngicos agregados poderão ser empregadas em cavidades e mucosas.

Espumas com substâncias esclerosantes poderão ser empregadas em injeções intracistos após seus esvaziamentos, com objetivo de esclerosar a parede secretante e evitar recidivas.

Radioisótopos poderão ser agregados a espumas e utilizados para fins diagnósticos e terapêuticos.

A possibilidade de utilização como contraste para angiografia digital por injeção arterial, e flebografias por injeções intravenosas também deverá ser investigada por estudos *in vivo*.

A gama de utilizações para as espumas carreadoras de fármacos é extensa. Seus usos dependerão dos resultados positivos ou não para cada uma das múltiplas possibilidades vislumbradas de seu emprego.

Como relatado no capítulo II, vários autores propuseram inovações e refinamentos técnicos com vistas a melhorar o efeito dos trombolíticos com objetivo diminuir suas complicações hemorrágicas.

As inovações focaram melhorias na aplicação dos fibrinolíticos, evoluindo da injeção intravenosa periférica em altas doses para a intratrombo por cateter e em doses menores. Nesta abordagem a melhor sucedida e a mais utilizada é a aplicação de fibrinolíticos intratrombo pela técnica de *pulse spray* [58,83,57,81].

Muitos cateteres e equipamentos foram desenvolvidos para aprisionamento, fragmentação e aspiração de trombos. Merecem destaque por serem eficientes e mais utilizados na prática médica o cateter de Trellis[®], o AngioJet[®], Aspirex[®] e o Hidrolyser[®] [80,72,73,74,63]. Contudo, nenhuma destas técnicas cogita ou sugere a utilização de espuma trombolítica, embora a mesma tenha grande potencial para ser utilizada simultaneamente, potencializando o efeito da remoção mecânica de trombos.

Interessantes são as abordagens que visam potencializar o efeito trombolítico através da combinação de espumas utilizadas para contrastes em ultrassonografia

cardíaca, fibrinolíticos sistêmicos e aparelhos de ultrassom como fonte de energia para promover a ruptura das microbolhas auxiliando na fragmentação do trombo e penetração do fibrinolítico [76,77]. Esta técnica apresenta limitações relativas ao alcance do ultrassom, sendo muito prejudicada pela presença de estruturas ósseas como o crânio e por gases presentes no abdômen e tórax. Como implica na utilização de sofisticados equipamentos de ultrassom de custos elevados, este é um fator limitante a sua utilização [112].

Autores chineses sugeriram uma proposta fibrinolítica interessante e complexa. Nela empregaram uma técnica sofisticada combinando microbolhas de contraste ecográfico conjugadas à uroquinase e a uma determinada sequência de aminoácidos promovendo a ligação deste conjunto a receptores da parede plaquetária em estado ativado. Conseguiram demonstrar ser possível injetar a uroquinase preparada desta forma, por via sistêmica, e ser detectada no local da trombose por eles induzida [113]. Contudo, a técnica proposta é sofisticada e de alto custo, não tendo semelhança com a proposta nesta tese.

Nenhuma das técnicas relatadas na bibliografia consultada refere algo semelhante ao uso de uma espuma fibrinolítica como a sugerida nesta tese. Conclui-se, desta forma, que esta proposta terapêutica apresenta uma abordagem inédita neste campo.

Assim, a possibilidade de se estar diante de uma nova formulação de veiculação medicamentosa, que possibilite a utilização de fármacos para outras patologias e por outras vias deve ser fortemente considerada!

BIBLIOGRAFIA

1. MAKSIMENKO, A. V. Macromolecular Ensembles of External and Internal Fibrinolysis: Ways to Enchange the Thrombolytic Effect (A Review). **Pharm Chem J**, 36 (7), 2002. 348-355.
2. ALEXANDROV, A. et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, 351, 2004. 2170-2178.
3. MCCARTHY, J. R. et al. Multifunctional nanoagent for thrombus-targeted fibrinolytic therapy. **Nanomedicine**, 7(7), 2012. 1017-1028.
4. D'AMICO, E. A. Fisiologia Plaquetária. In: FHA, M. **Doenças Vasculares Periféricas**. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 218-220.
5. WEISEL, J. W.; NAGASWAMI, C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: Clot structure and assembly are kinetically controlled. **Biophys J**, 63(1), 1992. 11-128.
6. FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, 34, 2001. 229-237.
7. LOURENÇO, D. M. Fisiologia do Sistema Fibrinolítico. In: FHA, M. **Doenças Vasculares Periféricas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 213-217.
8. WHO. (**Organização Mundial da Saúde**), 2008. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/view.main.10015>>. Acesso em: 08 Junho 2012.
9. SCHELLHASS, A. et al. The diagnosis and treatment of acute pulmonary embolism. **Deutscher Arzte Verlag**, v. 107, n. 34-35, p. 589-595, 2010.
10. WATSON, T.; SHANTSLA, E.; LIP, G. Mechanisms of thrombogenesis in arterial fibrillation: Virchow's triade revisited. **Lancet**, v. 373, p. 155-166, 2009.
11. ABBADE, R. et al. Thrombosis and acute coronary syndrome. **Thrombosis research**, p. 235-240., 2012;129(3).
12. GUYATT, G. et al. Executive summary: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. **Chest**, 141, 2012. 75-475.
13. CAPODANNO, D.; CALVI, V.; TAMBURINO, C. Effect size of ticagrelor over clopidogrel in the platelet inhibition and patient outcomes (PLATO) trial: From statistics to clinical judgment. **J Cardiovasc Med**, 13(2), 2012. 162-163.

14. GOOSHAH, G. et al. Avicenna's view on the prevention of thrombosis. **Int J Cardiol**, 09, 2012. 150-151.
15. ANWARUDDIN, S.; ASKARI, A.; TOPOL, E. Redefining risk in acute coronary syndromes using molecular medicine. **JACC**, v. 49 (3), p. 279-289, 2007.
16. KYRLE, P.; ROSENDAAL, F.; EICHINGER, S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. **Lancet**, v. 376, p. 2032–2039, 2010.
17. PERLER, B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs. **J Endovasc Ther**, v. 12(2), p. 224–32, 2005.
18. KHAN, I.; GOWDA, R. Clinical perspectives and therapeutics of thrombolysis. **Int J Cardiol**, v. 91(2-3), p. 115–27, 2003.
19. SHERRY, S. et al. Studies on enhanced fibrinolytic activity in man. **Clin Sci**, 1959. 810-.
20. MARDER, V. J. et al. Comparison of plasmin with recombinant tissue-type plasminogen activator in lysis of cerebral thromboemboli retrieved from patients with acute ischemic stroke. **Stroke**, 42(8), 2011. 2222-2228.
21. BANERJEE, A.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. **Biotechnology Advances**, v. 22(4), p. 287–307, 2004.
22. MARDER, V. J.; NOVOKHATNY, V. Direct fibrinolytic agents: Biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential. **J Thromb Haemost**, 8(3), 2010. 433-444.
23. HAN, S. M. et al. Efficacy and safety of alfineprase in patients with acute peripheral arterial occlusion. **J Vasc Surg**, 51(3), 2010. 600-609.
24. TILLET, W.; GARNER, R. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. **J Exp Med**, 58(4), 1933. 485-502.
25. CHRISTENSEN, L. R.; MACLEOD, C. M. A proteolytic enzyme of serum: Characterization, activation, and reaction with inhibitors. **J Gen Physiol**, 28(6), 1945. 559-583.
26. MOULTON, J.; MOORE, P.; MENCINI, R. Treatment of loculated pleural effusions with transcatheter intracavitary urokinase. **Am J Roentg**, 153(5), 1989. 941-945.
27. COLLEN, D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski

- memorial lecture. **Thromb Haemost**, 43(2), 1980. 77-89.
28. SHERRY, S.; TILLET, W. S.; READ, C. T. The use of streptokinase-streptodornase in the treatment of hemothorax. **J Thorac Surg**, 20(3), 1950. 393-417.
 29. FLETCHER, A. P. et al. The treatment of patients suffering from early myocardial infarction with massive and prolonged streptokinase therapy. **Trans Assoc Am Physicians**, 71, 1958. 287-296.
 30. LEE, H. S. et al. Hypersensitivity reactions to streptokinase in patients with high pre-treatment antistreptokinase antibody and neutralisation titres. **European Heart Journal**, 14(12), 1993. 1640-1643.
 31. WUN, T. C.; SCHLEUNING, W. D.; REICH, E. Isolation and characterization of urokinase from human plasma. **J Biol Chem**, 257(6), 1982. 3276-3283.
 32. ZOON, K. C. **Important Drug Warning**: Safety Information Regarding Use of Abbokinase (Urokinase). United States Food and Drug Administration Med Watch. Disponivel em: <>. Acesso em: 22 Janeiro 2013.
 33. PERLER, B. Thrombolytic therapies: The current state of affairs. **J Endovasc Ther**, 12(2), 2005. 224-232.
 34. RISIUS, B. et al. Thrombolytic therapy with recombinant human tissue-type plasminogen activator: A comparison of two doses. **Radiology**, 164(2), 1987. 465-468.
 35. MARDER, V. J.; SHERRY, S. Thrombolytic therapy: Current status. **N Engl J Med**, 318(23), 1988. 1512-1520.
 36. GARDELL, S. et al. Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. **J Biol Chem**, 264(30), 1989. 17947-17952.
 37. PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Appl Microbiol Biotechnol**, 69(2), 2005. 126-132.
 38. MARDER, V. J. Pre-clinical studies of plasmin: Superior benefit-to-risk ratio of plasmin compared to tissue plasminogen activator. **Thromb Res**, 122 Suppl 3, 2008. S9-S15.
 39. AMBRUS, J. L. et al. Clinical and experimental studies on fibrinolytic enzymes. **Ann N Y Acad Sci**, 68(1), 1957. 97-137.

40. MARDER, V. J. Historical perspective and future direction of thrombolysis research: The re-discovery of plasmin. **J Thromb Haemost**, 9 Suppl 1, 2011. 364-373.
41. HUNT, J. A. et al. Simplified recombinant plasmin: Production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin. **Thromb Haemost**, 100(3), 2008. 413-419.
42. HAIRE, W. D. Heparin plus alteplase compared with heparin alone in patients with submassive pulmonary embolism. **Curr Hematol Rep**, 2(5), 2003. 405-406.
43. VARSANO, S.; SMORZIK, Y. Thrombolytic therapy for acute life-threatening pulmonary thromboembolism in a pregnant woman. **Isr Med Assoc J**, 10(10), 2008. 740-741.
44. INVESTIGATORS, G. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. **N Engl J Med**, 329(10), 1993. 673-682.
45. KWIATKOWSKI, T. G. et al. Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. national institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study group. **N Engl J Med**, 340(23), 1999. 1781-1787.
46. OHMAN, E. M. et al. Intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction. **Chest**, 119(1 Suppl), 2001. 253S-277S.
47. DUNDAR, Y. et al. Comparative efficacy of thrombolytics in acute myocardial infarction: A systematic review. **QJM**, 96(2), 2003. 103-113.
48. OURIEL, K.; KAUL, A. F.; LEONARD, M. C. Clinical and economic outcomes in thrombolytic treatment of peripheral arterial occlusive disease and deep venous thrombosis. **J Vasc Surg**, 40(5), 2004. 971-977.
49. SIABLIS, D. et al. AngioJet rheolytic thrombectomy versus local intrapulmonary thrombolysis in massive pulmonary embolism: A retrospective data analysis. **J Endovasc Ther**, 12(2), 2005. 206-214.
50. CYNAMON, J. et al. Case Report Hemodialysis Graft Declotting : Description of the " Lyse and Wait " Technique. **JVIR**, v. 8, p. 825–9, 1997.
51. MULLER-HULSBECK, S.; KALINOWSKI, M.; HELLER, M. Rheolytic hydrodynamic thrombectomy for percutaneous treatment of acutely occluded infra-aortic native

- arteries and bypass grafts: Midterm follow-up results. **Invest Radiol**, 35(2), 2000. 131-140.
52. WOTJOWYCZ, M. Local Thrombolytic Infusion. In: WOTJOWYCZ, M. **Handbook of Interventional Radiology and Angiography**. St. Louis, Missouri: Mosby, 1995. p. 212-228.
53. KUNADIAN, V.; GIBSON, C. M. Thrombolytics and myocardial infarction. **Cardiovasc Ther**, n. DOI: 10.1111/j.1755-5922.2010.00239.x, 2010.
54. HACKE, W. et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). second european-australasian acute stroke study investigators. **Lancet**, 352(9136), 1998. 1245-1251.
55. HESS, H. et al. Peripheral arterial occlusions: Local low-dose thrombolytic therapy with recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA). **Eur J Vasc Endovasc Surg**, 12(1), 1996. 97-104.
56. SEMBA, C. P. et al. Thrombolytic therapy with use of alteplase (rt-PA) in peripheral arterial occlusive disease: Review of the clinical literature. the advisory panel. **J Vasc Interv Radiol**, 11(2 Pt 1), 2000. 149-161.
57. BOOKSTEIN, J. J. et al. Pulsed-spray pharmacomechanical thrombolysis: Preliminary clinical results. **Am J Roentgenol**, 152(5), 1989. 1097-1100.
58. ALLIE, D. E. et al. Novel simultaneous combination chemical thrombolysis/rheolytic thrombectomy therapy for acute critical limb ischemia: The power-pulse spray technique. **Catheter Cardiovasc Interv**, 63(4), 2004. 512-522.
59. SHAMMAS, N. W. et al. Dethrombosis of the lower extremity arteries using the power-pulse spray technique in patients with recent onset thrombotic occlusions: Results of the DETHROMBOSIS registry. **J Endovasc Ther**, 15(5), 2008. 570-579.
60. KATZEN B, B. A. V. Low dose streptokinase in the treatment of arterial occlusions. **AJR**, v. 136(6), p. 1171-8, 1981.
61. RITCHIE, J. L. et al. Mechanical thrombolysis: A new rotational catheter approach for acute thrombi. **Circulation**, 73(5), 1986. 1006-1012.
62. SCHMITZ-RODE, T.; GUNTHER, R. W.; MULLER-LEISSE, C. US-assisted aspiration thrombectomy: In vitro investigations. **Radiology**, 178(3), 1991. 677-679.

63. RIGATELLI, G. et al. Combined percutaneous aspiration thrombectomy and rheolytic thrombectomy in massive subacute vena cava thrombosis with IVC filter occlusion. **J Endovasc Ther**, 13(3), 2006. 373-376.
64. TRUONG, T. H. et al. Mechanical thrombectomy of ilio caval thrombosis using a protective expandable sheath. **Cardiovasc Intervent Radiol**, 27(3), 2004. 254-258.
65. RAMAIAH, V. et al. Trellis thrombectomy system for the treatment of iliofemoral deep venous thrombosis. **J Endovasc Ther**, 10(3), 2003. 585-589.
66. TURMEL-RODRIGUES, L. et al. Manual catheter-directed aspiration and other thrombectomy techniques for declotting native fistulas for hemodialysis. **J Vasc Interv Radiol**, 12(12), 2001. 1365-1371.
67. XU, G. et al. Aspiration thrombectomy of acute complete carotid bulb occlusion. **J Vasc Interv Radiol**, 16(4), 2005. 539-542.
68. ZHAO, H. et al. Comparison of diver CE and ZEEK manual aspiration catheters for thrombectomy in ST-segment elevation myocardial infarction. **Chin Med J (Engl)**, 122(6), 2009. 648-654.
69. FARRET, A. N. **Instrumento de resgate de trombos, corpos estranhos e fio guia via percutânea**. PI0000433 2 Revista No 1971, 28 Novembro 2000.
70. GOBIN, Y. et al. MERCI 1: A phase 1 study of mechanical embolus removal in cerebral ischemia. **Stroke**, 35(12), 2004. 2848-2854.
71. TENSER, M.; AMAR, A.; MACK, W. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke using the MERCI retriever and penumbra aspiration systems. **World Neurosurg**, 76(6 Suppl), 2011. S16-23.
72. DRASLER, W. et al. Rheolytic catheter for percutaneous removal of thrombus. **Radiology**, 182(1), 1992. 263-267.
73. WAGNER, H. et al. Rapid thrombectomy with a hydrodynamic catheter: Results from a prospective, multicenter trial. **Radiology**, 205(3), 1997. 675-681.
74. HUBBARD, J. et al. Rheolytic thrombectomy with or without adjunctive indwelling pharmacolysis in patients presenting with acute pulmonary embolism presenting with right heart strain and/or pulseless electrical activity. **Thrombosis**, 2, 2011. 464-410.
75. UFLACKER, R.; STRANGE, C.; VUJIC, I. Massive pulmonary embolism: Preliminary results of treatment with the amplatz thrombectomy device. **J Vasc Interv Radiol**,

- 7(4), 1996. 519-528.
76. WISSGOTT, C. et al. Treatment of critical limb ischemia using ultrasound-enhanced thrombolysis (PARES trial): Final results. **J Endovasc Ther**, 14(4), 2007. 438-443.
77. DOOMERNIK, D. et al. Advancements in catheter-directed ultrasound-accelerated thrombolysis. **J Endovasc Ther**, 18(3), 2011. 418-434.
78. PLATE, G. et al. Thrombolysis for Acute Lower Limb Ischaemia - A prospective, randomised, multicentre study comparing two strategies. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, 31, 2006. 651-660.
79. MATTLE, H. P. Intravenous or intra-arterial thrombolysis? It's time to find the right approach for the right patient. **Stroke**, v. 38(7), p. 2038-40, 2007.
80. DELOMEZ, M. et al. Mechanical thrombectomy in patients with deep venous thrombosis, 24, 2001. 42-8.
81. BOOKSTEIN, J.; VALJI, K. Pulsed versus Conventional Thrombolytic Infusion Techniques. **Radiology**, 193, 1994. 318-20.
82. SHAMMAS, N. et al. Dethrombosis of lower extremity thrombus by local delivery of thrombolysis using ClearWay transcatheter balloon irrigation: a feasibility study. **Cardiovascular revascularization medicin**, v. 12, p. 350-4, 2011.
83. BARTH, K. et al. Hydrodynamic Thrombectomy System versus Pulse-Spray Thrombolysis for Thrombosed Hemodialysis Grafts: A Multicenter Prospective Randomized Comparison. **Radiology**, 217, 2000. 678-84.
84. GREENBERG, R.; OURIEL, K.; SRIVASTAVA, S. Mechanical versus chemical thrombolysis: an in vitro differentiation of thrombolytic mechanisms. **JVIR**, 11, 2000. 199-205.
85. COOLEY, B. et al. Incomplete resolution of deep vein thrombosis under reduced flow conditions. **Thrombosis research**, 131(1), 2013. 55-58.
86. ARZHAVITINA, A.; STECKEL, H. Foams for pharmaceutical and cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, 2010. 394: 1-17.
87. ARMSTRONG, W. F. et al. Assessment of myocardial perfusion abnormalities with contrast-enhanced two-dimensional echocardiography. **Circulation**, 66, 1982. 166-173.

88. SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annu. Rev. Mater. Sci**, 29, 1999. 295-326.
89. BLEEKER, H. J.; SHUNG, K. K.; BARNHART, J. L. Ultrasonic characterization of Albunex, a new contrast agent. **J. Acoust Soc Am**, 1990. 1792-1797.
90. LINDNER, J. R. et al. Enhancement of Left Ventricular Cavity Opacification by Harmonic Imaging After Venous Injection of Albunex. **Am J Cardiol**, 79, 1997. 1657–1662.
91. KLIBANOV, A. L. et al. Destruction of Contrast Agent Microbubbles in the Ultrasound Field: The Fate of the Microbubble Shell and the Importance of the Bubble Gas Content. **Acad Radiol**, 9(suppl 1), 2002. S41–S45.
92. KELLER, M. W. et al. Myocardial Contrast Echocardiography Without Significant Hemodynamic Effects or Reactive Hyperemia: A Major Advantage in the Imaging of Regional Myocardial Perfusion. **JACC**, 12(4), October 1988. 1039-1047.
93. KELLER, M. et al. The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography. **Thrombosis research**, 65, 1989. 458-467.
94. SCHNEIDER, M. Characteristics of SonoVue. **Echocardiography**, 16(7), 1999. 743-746.
95. KAUL, S. Myocardial contrast echocardiography, a 25-year retrospective. **Circulation**, 118, 2008. 291-308.
96. KOIZUMI, J. et al. Carbon Dioxide (CO₂) vs Iodinated Contrast Digital Subtraction Angiography during Balloon-occluded Retrograde Transvenous Obliteration (BRTO) Using Foam Sclerosant for Gastric Varices. **J Vasc Interv Radiol**, 23, 2012. 1453–1459.
97. KOIZUMI, J.; HASHIMOTO, T.; MYOJIN, K. C-arm CT-guided Foam Sclerotherapy for the Treatment of Gastric Varices. **J Vasc Interv Radiol**, 21(10), 2010. 1583–1587.
98. CARIDI JG, S. S. H. I. CO₂ Digital Subtraction Angiography for Renal Artery Angioplasty in High-Risk Patients. **AJR**, v. 173, p. 1551–6, 1999.
99. HEYE, S.; MALEUX, G.; MARCHAL, G. Upper-Extremity Venography : CO₂ versus Iodinated Contrast Material. **Radiology**, 241(1), 2006. 291–7.
100. BEESE, R. C.; BEES, N. R.; BELLI, A. M. Renal angiography using carbon dioxide. **B J**

- of Radiol**, 73, 2000. 3-6.
101. WOLLMANN, J. C. The history of sclerosing foams. **Dermatol Surg**, v. 30(2), p. 694–703, 2004.
 102. WOLLMANN, J. C. Sclerosant foams Stabilities, physical properties and rheological behavior. **Phlebologie**, 39, 2010. 208–217.
 103. HAUER, H. **Syringe set**. DE 34 17 182 C2, 19 Januar 1989.
 104. GARRIDO, J. C.; GARRIDO-OLMEDO, J. C. **Injectable Microfoam Containing a Sclerosing Agent**. US RE38,919 E, 23 Feb 1995.
 105. TESSARI, L.; CAVEZZI, A.; FRULLINI, A. Preliminary Experience with a New Sclerosing Foam in the Treatment of Varicose Veins, 2001. 27:58-60 ISSN:1076-0512/01/\$15.00/0.
 106. FRULLINI A, C. A. Sclerosing foam in the treatment of varicose veins and telangiectases: history and analysis of safety and complications. **Dermatol Surg**, v. 28(1), p. 11–5, 2002.
 107. PETERSON, J.; GOLDMAN, M. An Investigation into the Influence of Various Gases and Concentrations of Sclerosants on Foam Stability, 2011. 37:12–18.
 108. RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biol. Pharm. Bull**, 29(9), 2006. 1790-1798.
 109. XIE, F. et al. Coronary and Microvascular Thrombolysis with Guided Diagnostic Ultrasound and Microbubbles in Acute ST Segment Elevation Myocardial Infarction. **J Am Soc Ech**, 24(12), Dec 2011. 1400-1408.
 110. LIN, P. H. et al. Comparison of Percutaneous Ultrasound-Accelerated Thrombolysis versus Catheter-Directed Thrombolysis in Patients with Acute Massive Pulmonary Embolism. **Vascular**, 17, Suppl 3, 2009. S137–S147.
 111. ENGELHARDT, T. C. et al. Catheter-directed ultrasound-accelerated thrombolysis for the treatment of acute pulmonary embolism. **Thrombosis Research**, 128, 2011. 149–154.
 112. KAUL, S. Sonothrombolysis : A Universally Applicable and Better Way to Treat Acute Myocardial Infarction and Stroke? Who Is Going to Fund the Research? **Circulation**, 119, 2009. 1358-1360.

113. MU, Y.; LI, L.; AYOUFU, G. Experimental study of preparation of targeted microbubble contrast agents carrying urokinase and RGDS. **Ultrasonics**, 49, 2009. 676-681.
114. UNGER, E. C. et al. Local Drug and Gene Delivery Through Microbubbles. **Progr Cardiovasc Dis**, 44 (1), (July/August) 2001. 45-54.
115. LUNDGREN, C. E.; BERGOE, G. W.; TYSSEBOTN, I. The theory and application of intravascular microbubbles as an ultra-effective means of transporting oxygen and other gases. **UHM**, 31(1), 2004. 105-106.
116. FEINSTEIN, S. B. The powerful microbubble: from bench to bedside, from intravascular indicator to therapeutic delivery system, and beyond. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** , 287, 2004. H450–H457.
117. BREU F, G. S. European Consensus Meeting on Foam Sclerotherapy. **Dermatol Surg**, v. 30, p. 709–17, 2004.
118. FARRET, A. N.; AZEVEDO, E. P.; RAFFIN, F. N. **Preparação medicinal sob a forma de espuma para a liberação prolongada de medicamentos e sistema para obtenção da preparação medicinal**. PCT/BR2013/000038, 04 fevereiro 2013.
119. WEAIRE, D. A Fresh Start for Foam Physics. **Science**, 340, 2013. 693-694.
120. WILSON, A. J. Cryo-Microscopical Methods for the Investigation of Foam Structure. In: WILSON, A. J. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. London: Springer-Verlag, 1989. p. 69-88.
121. DURIAN, D. J. Fast, nonevolutionary dynamics in foams. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 1997. 615-621.
122. WALSTRA, P. Principles of Foam Formation and Stability. In: WILSON, A. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. London: Springer-Verlag, 1989. p. 1-15.
123. SIMONE, A. E.; GIBSON, L. J. Effects of solid distribution on the stiffness and strength of metallic foams. **Acta mater**, 46, 6, 1998. 2139-2150.
124. CHUANUWATANAKU, C. et al. Producing Large Complex-Shaped Ceramic Particle Stabilized Foams. **J. Am. Ceram. Soc**, 96 [5], 2013. 1407-1413.
125. WEAIRE, D.; COX, S. J.; BRAKKE, K. Liquid Foams. In: COLOMBO, P. **Cellular Ceramics**. Weinheim: Wiley, 2005.

126. PLATEAU, J. **Statique Expérimentale et Théorique des Liquides**. Paris: Gauthier-Villars, 1873.
127. CLARK, D. C. et al. The Formation and Stabilisation of Protein Foams. In: WILSON, A. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. London: Springer-Verlag, 1989. p. 55-68.
128. RAMOS-CLAMONT, M. G.; VÁZQUES-MORENO, L. Foaming Properties of Porcine Serum and Porcine Serum Albumin., 5(2) 2006. 105-111 ISSN 1135-8122.
129. MLEKO, S. et al. Rheological properties of foams generated from egg albumin after pH treatment. **LWT** , 40, 2007. 908–914.
130. SHERRY S, M. V. Streptokinase and Recombinant Tissue Plasminogen Activator (rt-PA) Are Equally Effective in Treating Acute Myocardial Infarction. **Ann Intern Med**, v. 114, p. 417–23, 1991.
131. DISKIN, C. J. et al. Surface tension, proteinuria, and the urine bubbles of Hippocrates. **THE LANCET**, 355, March 2000. 901-902.
132. DIAMANTIS, A.; MAGIORKINIS, E.; ANDROUTSOS, G. Proteinuria: From Ancient Observation to 19th Century Scientific Study. **THE JOURNAL OF UROLOGY**, 180, December 2008. 2330-2332.
133. KYUNG, J. C.; LIN, E. C. Carbon Dioxide Angiography. **Medscape Reference**, 20 Apr 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/423121-o>>. Acesso em: 29 setembro 2012.
134. MORRISON , N. et al. Comparisons of side effects using air and carbon dioxide foam for endovenous chemical ablation. **J Vasc Surg**, 47, 2008. 830-836.
135. MADDEN, J. K. Ice Cream. In: WILSON, A. J. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. London: Springer-Verlag, 1989. p. 85-96.
136. AMBRUS, J. L. et al. Clinical pharmacology of various types of fibrinolytic enzyme preparations. **Am J Cardiol**, 1960. 462-475.
137. FEARNLEY, G. R. A concept of natural fibrinolysis. **Lancet**, 6, May 1961. 992-994.
138. FEARNLEY, G. R. Spontaneous Fibrinolysis. **Am J Cardiol**, August 1960. 371-377.
139. DAVIES, C. W.; LOK, S.; DAVIES, R. J. The systemic fibrinolytic activity of intrapleural streptokinase. **Am J Respir Crit Care Med**, 157, 1998. 328-330.

140. HOFFMEISTER, H. M. et al. Thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: comparison of procoagulant effects of streptokinase and alteplase regimens with focus on the kallikrein system and plasmin. **Circulation**, 98, 1998. 2527-2533.