

Nanoskin: uso para reposição de volume na cavidade anoftálmica

Use of Nanoskin for volume replacement of the eye socket

Natalia Mussi¹, Maria Julia de Barros Orsolini¹, Claudia Helena Pellizon², Carla Adriene da Silva³, Silvana Artioli Schellini⁴, Gabriel Molina de Olyveira⁵, Pierre Basmaji⁵

RESUMO

Objetivo: Avaliar a biocompatibilidade da Nanoskin para reposição de volume em cavidades enucleadas ou evisceradas de coelhos. **Métodos:** Estudo experimental, utilizando implantes de Nanoskin (Innovatecs®, São Carlos, Brasil), celulose bacteriana produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum* tendo como substrato o chá-verde. Implantes de 10mm de diâmetro/5mm de espessura foram colocados em cavidades enucleadas (G1) ou evisceradas (G2) de 21 coelhos, avaliados clinicamente todos os dias, sacrificados aos 7, 30 e 90 dias após a cirurgia. O material foi removido e preparado para exame de microscopia óptica. **Resultados:** Sinais flogísticos discretos no pós-operatório imediato, não tendo sido evidenciados sinais infecciosos ou extrusão de nenhum implante. Houve aparente redução do volume ao longo do período experimental. Histologicamente ambos os grupos foram muito semelhantes, apresentando aos 7 dias células inflamatórias (predominantemente monócitos e neutrófilos), rede de fibrina e hemácias. A Nanoskin apresentava-se como pequenas esferas, de cor rósea, com pequenos espaços entre elas, permeados por escassas células inflamatórias. As células inflamatórias se modificaram ao longo de período experimental, sendo possível observar aos 30 dias células gigantes multinucleadas e fibroblastos maduros permeando o implante. Aos 90 dias, a estrutura do implante apresentava-se desorganizada, amorfa, com restos necróticos e com áreas ovoides, revestidas por fina membrana rósea, que pareciam se agrupar, vazias ou preenchidas por material acelular, róseo ou acinzentado. **Conclusão:** A Nanoskin provocou reação inflamatória que levou à reabsorção e redução do volume do implante. Novas formulações devem ser estudadas a fim de ter um produto que seja permanente para reparo da cavidade anoftálmica.

Descritores: Anoftalmia/terapia; Materiais biocompatíveis; Celulose/metabolismo; Próteses e implantes; Enucleação ocular; Evisceração do olho; Coelhos

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of Nanoskin for replacing volume in enucleated or eviscerated anophthalmic sockets of rabbits. **Methods:** An experimental study was carried out using enucleated or eviscerated rabbits, which received Nanoskin implants (Innovatecs®, São Carlos, Brazil), a cellulose produced by a bacteria (*Acetobacter xylinum*) using green tea as substrate. Implants of 10mm diameter/5mm of thickness were used placed in enucleated (G1) or eviscerated (G2) anophthalmic sockets of 21 rabbits. They were clinically examined daily, sacrificed at 7, 30 and 90 days after surgery and the material was removed and prepared for histological examination. **Results:** There were discrete signs of inflammation in the immediate postoperative period, with no evidence of infection or extrusion in any animal. However apparent reduction of volume during the trial period occurred. Histologically both groups were similar, with inflammatory cells (mainly monocytes and neutrophils), fibrin and hemaceas at 7 days postoperatively. The Nanoskin was presented as small pink spheres, with small gaps between them and permeated by few inflammatory cells. These cells have changed over the study, at 30 days multinucleated giant cells and mature fibroblasts that permeate the implant were observed. At 90 days, the structure of the implant was disorganized, amorphous, with necrotic debris and ovoid areas covered with thin pink membrane that seemed to cluster, empty or filled with no cellular pink or gray material. **Conclusion:** Nanoskin caused an inflammatory reaction leading to reabsorption and reduction of implant volume. New formulations should be studied in order to have a permanent product to repair the anophthalmic socket.

Keywords: Anophthalmos/therapy; Biocompatible materials; Cellulose/metabolism; Prostheses and implants; Eye enucleation; Eye evisceration; Rabbits

¹Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

⁴Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

⁵ INNOVATECS Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Biotecnológicos, São Carlos, SP, Brasil.

Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil. Programa: PIBIC FAPESP

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Recebido para publicação em 19/01/2016 - Aceito para publicação em 03/04/2016

INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento de implantes integrados a partir dos anos 80 do século passado, o cenário das reconstruções de cavidade anoftálmica está se alterando e atualmente o campo para avaliação de propostas de biomateriais para uso em cavidade anoftálmica encontra-se aberto.

A Nanoskin é uma celulose bacteriana formada por nanofibrilas sintetizadas a partir da proliferação bacteriana, com consumo de energia, que pode advir da polimerização da glicose.¹

A película de hemicelulose Nanoskin® foi desenvolvida pela Innovatecs®, por meio de um processo biotecnológico. É composta por uma mistura de bactérias que cresce em diferentes substratos, como levedura do caldo-de-cana ou chá-verde, propiciando um meio de cultivo no qual o microrganismo biológico *Acetobacter xylinum*, uma bactéria Gram-negativa, desenvolve o produto com características biodegradável, biocompatível, atóxica e não alergênica. Sua micro-porosidade reduz a perda de água e conserva a umidade adequada, permite a oxigenação da área lesionada, e cria o ambiente ideal de granulação e reepitelização (disponível em www.bionanofuture.com).

Trata-se de um bioproduto, onde a bactéria usa a sucrose para produção de um material tipo celulose, ou seja, a bactéria possui propriedades de produzir um biopolissacaríde, resultando em finos filmes ou outras composições que podem ser usados para fins diversos.²

Apesar da boa resposta tecidual obtida com vários diferentes materiais, ainda não existe um biomaterial brasileiro que tenha chegado ao mercado para a reposição de volume na cavidade anoftálmica e a Nanoskin poderia ser uma proposta para tal. Desta forma, o presente estudo foi desenvolvido no sentido de avaliar a biocompatibilidade de esferas de Nanoskin implantadas em cavidades orbitárias evisceradas ou enucleadas de coelhos.

MÉTODOS

Estudo experimental e aleatorizado, no qual foram utilizados 21 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, de ambos os sexos, com idade entre 3 e 6 meses. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), localizado no Campus de Botucatu (SP). O protocolo do estudo foi aprovado para execução pelo Comitê de Ética desta instituição. A esterilização do material foi do tipo Raio Gama - 7,3K Gy, segundo a International Standard ISO 11737-2:2009(E) e U.S PHARMA COPEIA/NATIONAL FORMULARY-USP 34/NF 29,2011.

Grupos e momentos experimentais: os coelhos foram divididos por sorteio em dois grupos, compostos por 21 animais que foram anestesiados e, em seguida, tiveram os olhos eviscerados (Grupo 1) ou enucleados (Grupo 2), com reposição do volume perdido usando implantes compostos de Nanoskin (Innovatecs®, São Carlos, Brasil) de 10mm de diâmetro/5mm de espessura, esterilizadas pelo próprio fabricante e fornecidas sem custo para o experimento. Depois de realizado o procedimento cirúrgico, novamente houve aleatorização como meio de decisão para composição dos momentos experimentais: momento 1 (M1) quando 7 animais do G1 e do G2 permaneceram 7 dias com os implantes na cavidade anoftálmica; momento 2 (M2) contendo 7 animais do G1 e do G2 que permaneceram 30 dias com os implantes na cavidade anoftálmica e momento 3 (M3), quando 7 animais do G1 e do G2 permaneceram 90 dias com os implantes na cavidade anoftálmica.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, sob condições de assepsia e antisepsia, conforme descrito a seguir: anestesia geral utilizando-se Tiletamina associada ao Zolazepam (Zoletil®50, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 50mg/kg, injetada na veia auricular; posicionamento do coelho em decúbito lateral esquerdo, com o olho direito voltado para cima; assepsia e antisepsia do olho direito com Polivinilpirrolidona-iodo (Prosigma - Farmácia de manipulação Prosigma Ltda ME, Cambui, MG, Brasil), colocação de campo oftálmico e blefarostato; aplicação peribulbar e subconjuntival de 1,0 ml de cloridrato de lidocaína com epinefrina (Xylocaína® com Epinefrina 1:200.000 AstraZeneca Inc. - Mississauga - Canadá) para complementação da analgesia; abertura córneo-escleral com bisturi lâmina 15; evisceração (G1) ou enucleação (G2) do conteúdo do olho direito e colocação dos implantes de Nanoskin; fechamento da incisão com pontos contínuos de fio 6-0 inabsorvível trançado (Mersilene, Ethicon Incorporation-Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de produtos para saúde Ltda, São Paulo, SP); instilação de 0,1 ml de solução oftálmica Ciprofloxacina 3% (Alcon Laboratórios, SP, Brasil).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação e receberam água e ração *ad libitum*, sendo sacrificados aos 7, 30 e 90 dias após a cirurgia inicial, usando-se sobredose de Zolazepam (Zoletil®50, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) pela via endovenosa.

Após o sacrifício, os implantes juntamente com os tecidos adjacentes foram removidos e, em seguida, o material foi preparado para exame histológico, com emblocagem em parafina e coloração por hematoxilina-eosina, seguindo a rotina do laboratório.

A biocompatibilidade dos implantes foi estudada por meio de exame clínico diário, tomando-se como parâmetros o exame local da cavidade orbitária e dados referentes a saúde geral do animal, avaliada pela atitude na gaiola, apetite e atividade geral e exame histológico, interessando a reação inflamatória ao redor e dentro do biomaterial.

RESULTADOS

Avaliação clínica: durante o acompanhamento clínico, todos os animais permaneceram saudáveis, alimentando-se normalmente. Dois animais foram a óbito durante o intra-operatório devido ao efeito dos anestésicos. Para os três animais que apresentaram comportamento que denotava dor, foi necessária a administração de analgésicos no pós-operatório, durante os 3 primeiros dias.

Todos os coelhos apresentaram sinais flogísticos na cavidade orbitária, principalmente nos primeiros dias após a cirurgia, com a presença de secreção amarelada acolada aos pelos da região afetada, porém nenhum deles desenvolveu sinais infecciosos, deiscência de sutura ou extrusão do implante.

Durante o período de observação dos animais houve aparente redução do volume da cavidade orbitária, denotando redução do volume do implante.

Avaliação histológica (Figura 1)

GIMI: identificação da capa escleral, células inflamatórias (geralmente neutrófilos), hemácias e uma rede frouxa de fibrina entre a esclera e o implante. O material do implante foi identificado como refringente, composto por formações circulares, redondas ou alongadas, de coloração rósea, disposto na área cen-

tral da esclera. Células inflamatórias em todos dos coelhos avaliados e muitos restos necróticos ao redor do implante.

G1M2: exuberância de células inflamatórias, em especial polimorfonucleares, mononucleares, macrófagos e células gigantes multinucleadas formando granulomas. Neovasos contendo hemácias. Fibroblastos se organizando no interior da esclera que albergava a Nanoskin. Áreas circulares ou ovoides vazias no interior da esclera. Células necróticas e calcificação, em todas as lâminas analisadas.

G1M3: as áreas vazias aumentaram de tamanho provavelmente por confluência de outras menores. Nanoskin como grânulos arredondados e refringentes em alguns animais e ausente em outros (possivelmente por perda do material durante a extração ou por absorção do mesmo). Material róseo ou acinzentado amorfo no interior das cavidades vazias. Células gigantes, macrófagos e reação granulomatosa envolvendo partes da Nanoskin. Células necróticas e com calcificação em todas as lâminas analisadas. Não houve formação de fibrose.

G2M1: houve dificuldade de identificar o implante de Nanoskin nas cavidades enucleadas. A reação inflamatória que ocorreu nos animais eviscerados foi idêntica a que ocorreu nos enucleados, inclusive com a reação mais exuberante concentrada ao redor da Nanoskin.

G2M2: todas as características observadas, inclusive com formação de granulomas contendo células gigantes nas regiões onde se observava a Nanoskin ocorreram de forma semelhante ao que ocorreu em G1M2.

G2M3: exuberante reação inflamatória ao redor do implante que não foi evidenciado em todos os animais, assim como ocorreu em G1M3.

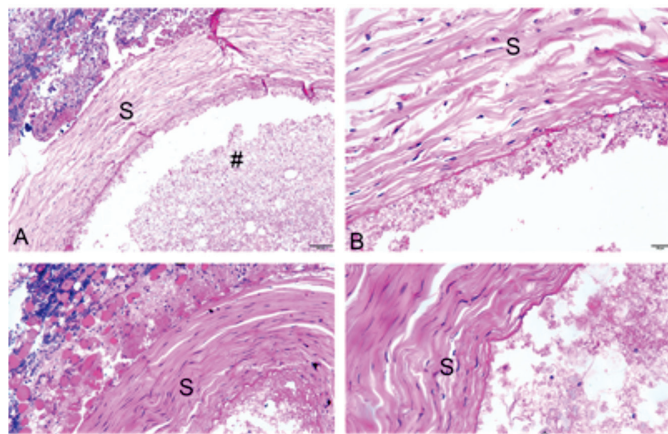


Figure 1: A, B - G1M1: frouxa rede de fibrina (#) entre partes do implante, identificado como material róseo, disposto na área central da esclera (S). Células inflamatórias da fase aguda permeando o implante; C,D- G1M2: células inflamatórias em contato com a Nanoskin. Áreas circulares ou ovoides, róseas ou acinzentadas no interior da esclera (S)(*); E,F: G1M3: grandes áreas vazias no interior das cavidades vazias (@). Células gigantes, macrófagos e reação granulomatosa (g) envolvendo partes da Nanoskin.

DISCUSSÃO

Um longo desafio tecnológico já foi percorrido até se chegar ao método de produção da Nanoskin, material que resulta de processo de síntese e, portanto, não se esgota, como seria o caso de outros materiais, como a hidroxiapatita natural.³

O forte apelo inicial dos implantes integrados,³ foi a mola propulsora para que novos materiais fossem estudados,^{4,6} abrindo um grande leque de pesquisas que buscam o biomaterial ideal. Observou-se no presente estudo que a Nanoskin é um biomaterial que pode ser bem tolerado pela cavidade orbitária, não tendo provocado nenhum caso óbito ou que demonstrasse ter sido a saúde geral do animal afetada, apesar de serem necessários exames bioquímicos e histologia dos órgãos alvo para confirmação deste ponto.

Outro ponto importante foi a não observação de sinais clínicos de que a Nanoskin fosse intolerável pelos tecidos orbitários. Os períodos de observação de 7, 30 e 90 dias permitiram a observação de fatores precoces e tardios da cicatrização ao exame clínico. Precocemente poder-se-ia ter evolução para deiscência da conjuntiva e/ou esclera, muito associada com problemas técnicos na cirurgia⁷ e que não ocorreram. Tardiamente também não houveram extrusões dos implantes, tanto no G1, como no G2.

O exame histológico mostrou nas cavidades evisceradas e também nas enucleadas, pouca reação inflamatória nos momentos iniciais, com aparecimento de células gigantes e processos de fagocitose nos momentos mais tardios. Este fato, associado a observação das áreas róseas supostamente formadas a partir da liquefação do biomaterial levam a suspeição de absorção do material implantado. Este processo levará invariavelmente a redução gradual do volume do implante, fenômeno indesejado quando se trabalha com a reposição de volume na cavidade orbitária⁸ e já observado com alguns tipos de hidroxiapatita sintética.^{4,9}

Além dos fenômenos biológicos decorrentes da implantação dos biomateriais propostos para uso em cavidades anoftálmicas, há que se considerar a estabilidade e a facilidade dos métodos no processo de produção, a disponibilidade dos materiais a serem usados na manufatura e o preço final do produto. Esferas de quitosana implantadas em cavidades evisceradas de coelhos provocam reação tecidual baseada em fenômenos regenerativos e com pouca inflamação, além de não afetar sistemicamente os animais.¹⁰ Entretanto, estes implantes são de manufatura difícil, o que coloca a quitosana como uma proposta a não ser utilizada.¹⁰

Os implantes de Nanoskin possuem produção simples e pouco dispendiosa. No entanto, na formulação atual não é aconselhado para a reposição de volume na cavidade anoftálmica, já que houve reabsorção do material e redução do volume implantado. Novos testes serão realizados de maneira a modificar a formulação das esferas de Nanoskin com o propósito do mesmo ser um material não absorvível. O emprego somente poderá ser feito para o fim proposto quando houver segurança de manutenção da estabilidade, sem que haja a formação de granulomas contendo as células gigantes.

CONCLUSÃO

A Nanoskin é um biomaterial que pode ter aplicação para reparação de volume na cavidade anoftálmica. Porém, modificações no processo de manufatura se fazem necessários, a fim de manter a estabilidade do produto. Novas pesquisas devem ser providenciadas neste sentido.

REFERÊNCIAS

- Gois P. Biosíntese de celulose obtida de *Gluconacetobacter intermedius* isolado de Kombucha [tese]. Recife: Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO; 2011.

2. Kongruang S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008; 148(3-4):245-56.
3. Perry AC. Integrated orbital implants. *Adv Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 1990; 8: 75-81.
4. Jordan DR, Mawn LA, Brownstein S, McEachren TM, Gilberg SM, Hill V, et al. The bioceramic orbital implant: a new generation of porous implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2000;16(5):347-55.
5. Xavier AP, Schellini SA, Aragon FF, Padovani CR, Taga EM. Short term evaluation of non-absorbable microgranular hydroxyapatite infiltration in the *Guinea-Pig* subepidermal abdominal region. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(1):69-73.
6. Karesh JW. Biomaterials in ophthalmic plastic and reconstructive surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 1998; 9(5): 66-74.
7. Schellini SA, Padovani CR, Hoyama E, Rossa R, Ferreira VL. Complicações com uso de esferas não integráveis e integráveis na reconstrução da cavidade anoftálmica. *Arq Bras Oftalmol*. 2000;63(3):175-83.
8. Schellini SA, Hoyama E, Marques MEA, Rossa R, Padovani CR. Comparison of synthetic hydroxyapatite and porous polyethylene implants in eviscerated rabbit eyes. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2003;19(2):136-9.
9. Ranzani JJ, Rahal SC, Schellini SA, Marques ME, Taga EM. Repair of the anophthalmic cavity of rats with synthetic hydroxyapatite. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(10):1181-6.
10. Brito MM. Análise da biocompatibilidade da esfera de quitosana porosa em cavidade eviscerada de coelho. Estudo comparativo com polietileno poroso [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2008.

Autor correspondente:

Natália Mussi

Rua Antônio Amando de Barros número 241, apt 14 - bloco 3

CEP: 18601260

e-mail: natalia_mussi@yahoo.com.br, cel: (14)981455481