

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA INJEÇÃO DE LÁTEX E
HIDROXIAPATITA EM PREGAS VOCAIS - ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CÃES**

DANIEL SALGADO KÜPPER

**Ribeirão Preto
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA INJEÇÃO DE LÁTEX E
HIDROXIAPATITA EM PREGAS VOCAIS - ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CÃES**

Aluno: *Daniel Salgado Küpper*

Orientador: *Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Medicina, Área de Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-vestibular.

Ribeirão Preto

2006

Küpper, Daniel Salgado

Análise histológica da injeção de látex e hidroxiapatita em pregas vocais – Estudo experimental em cães

Ribeirão Preto, 2006.
55p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. – Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Oliveira, José Antonio Aparecido de

1.Hidroxiapatita; 2.Látex; 3.Insuficiência glótica; 4.Pregas vocais; 5.Injeção.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Raul e Heloisa, agradeço pela minha formação pessoal e por ensinarem os verdadeiros valores da vida.

À minha irmã Raquel, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Antônio Aparecido de Oliveira, Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – FMRP-USP, pelos ensinamentos e pelas oportunidades acadêmicas e de pesquisa.

Aos Professores Wilma T. Anselmo Lima, Maria Cristina Lancia Cury Feres, José Fernando Colafêmina, Miguel Ângelo Hippólito e Myriam de Lima Isaac, pelos ensinamentos e constantes estímulos para evolução de meu conhecimento.

Aos médicos assistentes Fabiana Valera, Eduardo Tanaka Massuda, Ricardo C. Demarco, Carlos Alberto Rodrigues, Rodrigo Lacerda Nogueira e Marcelo Leite pela amizade, apoio e formação acadêmica.

À Maria Rossato, pela amizade e pelo seu incansável trabalho. Sendo pessoa fundamental na produção de trabalhos científicos no Departamento.

Às Professoras Dra Maria Célia Jamur e Dra. Constance Oliver, pela contribuição inestimável ao andamento deste trabalho, a minha gratidão eterna.

Aos amigos Ralph Silveira Dibbern, Camila Giacomo Carneiro, Rodolfo Pacagnella e Luciano Couto, pela amizade e pelos incentivos nos momentos difíceis.

Ao pessoal da secretaria, Rita, Amélia e Rogério e em especial para a Cecília, que muito me ajudou na elaboração desta Dissertação.

À Vani Maria Alves Correia, técnica do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, pelo o seu trabalho, pela amizade e pelas palavras de incentivo.

Aos médicos residentes da Divisão de Otorrinolaringologia do HCFMRP-USP, pela amizade.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVO..... | 8 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 9 |
| 4. RESULTADOS | 16 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 30 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 39 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |

ANEXO

LISTA DE ABREVIATURAS

CHA- Cimento de Hidroxiapatita

HA- Hidroxiapatita

IG- Insuficiência Glótica

MO- Missouri

USA- United States of America

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Cervicotomia à esquerda e dissecação até identificação de nervo laríngeo recorrente (seta preta) | 11 |
| Figura 2- Laringossuspensão para visualização de pregas vocais | 12 |
| Figura 3- Laringe removida do animal para posterior fixação | 14 |
| Figura 4- Prege vocal de cão injetada somente com solução salina a 0,9%. Ausência de resposta inflamatória e tecido muscular e estruturas da prege vocal sem alterações | 19 |
| Figura 5- Fotomicrografia da prege vocal canina 24 horas após a injeção de látex. A- Partículas de Látex (setas verdes) ao longo das fibras musculares e submucosa, levando a intenso infiltrado inflamatório (setas pretas). (Aumento de 40X) B- Detalhe da miólise provocada pelo látex (setas vermelhas) e o intenso infiltrado inflamatório entre as miofibrilas (setas pretas). (Aumento 400X) | 20 |
| Figura 6- Prege vocal canina observada 24 horas após injeção de látex. Aspecto das miofibrilas em miólise, contendo restos de estruturas miofibrilares (setas vermelhas), circundada por células inflamatórias (setas pretas). (Aumento 400X)..... | 21 |
| Figura 7 A- Fotomicrografia de prege vocal 14 dias após a injeção de látex. Ainda se observa intenso infiltrado inflamatório (setas pretas).(Aumento 40x). B- Detalhe das miofibrilas em diferentes estágios de desintegração, observa-se células inflamatórias ao redor das fibras musculares (setas vermelhas). (Aumento 400X) | 22 |
| Figura 8- Fotomicrografia da laringe 6 meses após injeção de látex. Ausência de sinais de partículas do látex. O processo inflamatório na região é discreto. Observa-se atrofia muscular (setas pretas), secundário à paralisia realizada. (Aumento de 400X) | 23 |
| Figura 9- Fotomicrografia da prege vocal canina injetada com hidroxiapatita.Observa-se que a substância se restringe ao tecido muscular, sem que se disseminasse para os demais tecidos. (Aumento 20X) | 24 |
| Figura 10- Prege vocal após 24 horas, injetada com hidroxiapatita. A- Detalhe do intenso infiltrado inflamatório no interior do implante (setas pretas). (Aumento 400X) B- Margem do local injetado com a substância, mostrando a separação entre a hidroxiapatita e o tecido muscular (seta vermelha). Detalhe de algumas miofibrilas alteradas (setas pretas). (Aumento 400X)..... | 25 |
| Figura 11- Prege vocal canina após 14 dias da injeção de hidroxiapatita. O implante mantém o seu local de injeção sem disseminação para os tecidos subjacentes (seta vermelha). (Aumento de 20X) | 26 |

Figura 12- Prega vocal de cão após 14 dias da injeção de hidroxiapatita após 14 dias. **A-** Detalhe do processo inflamatório (seta pretas). (Aumento 400x) **B-** Detalhe do limite entre tecido muscular e implante (setas vermelhas). (Aumento 200X) 27

Figura 13- Prega vocal após 6 meses da injeção de hidroxiapatita. Observa-se a permanência do implante, sem disseminação da hidroxiapatita pelos tecidos cervicais (seta vermelha). Ausência de resposta inflamatória importante. Formação de cápsula fibrosa (setas pretas). (Aumento 20X) 28

Figura 14- Prega vocal após 6 meses da injeção de hidroxiapatita. **A-** Detalhe do implante em relação ao tecido muscular. Notar a nítida separação entre ambos (seta vermelha) (Aumento 40X). **B-** Detalhe da transição entre a hidroxiapatita e tecido muscular, presença de célula gigante (seta vermelha). (Aumento de 400 X) 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Divisão dos grupos, segundo a substância injetada e o tempo de sacrificio..... 10

Tabela 2- Resultados e complicações observados com os animais 18

RESUMO

INTRODUÇÃO: Insuficiência glótica pode ser definida como a perda de coaptação adequada entre as pregas vocais. Disfonia e aspiração de líquidos e sólidos são os sintomas mais comuns. As principais causas são: paralisia, paresia, atrofia e cicatriz de prega vocal. Existem dois tipos de cirurgia para correção de insuficiência glótica: tireoplastia e injeção de substâncias. Esta última técnica tem-se mostrado mais fácil de executar, com menor custo e menor taxa de morbidade. Porém, a substância ideal para realizar o procedimento ainda não existe. Vários materiais foram tentados ao longo do último século como: parafina, cartilagem, Teflon®, colágeno, gordura, fâscia muscular e ácido hialurônico. Todavia, dificuldades foram encontradas com essas substâncias, ora havendo absorção, ora ocorrendo formação de granulomas de corpo estranho. A hidroxiapatita é o principal componente de ossos e dentes, e já vem sendo utilizada na área da saúde, para reparação de defeitos ósseos ou odontológicos, com boa aceitação. Não tendo sido observado toxicidade, reação de corpo estranho ou absorção. O látex é a substância natural da árvore *Hevea brasiliensis* e tem mostrado boa biocompatibilidade com tecido animal em vários experimentos já realizados, como: timpanoplastias, reparação de esôfagos em cães, próteses vasculares e encapsulamento de ilhotas de Langerhans submetidas a transplante. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo é avaliar histologicamente as conseqüências da injeção de hidroxiapatita e látex em pregas vocais caninas, previamente paralisadas, avaliando a resposta inflamatória obtida, migração tecidual e viabilidade do implante. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Dezoito cachorros foram divididos em seis grupos de três animais cada: Grupo 1A: injeção de látex e sacrifício em 24 horas. Grupo 1B: Injeção de látex e sacrifício em 14 dias. Grupo 1C:

Injeção de látex e sacrifício em 180 dias. Grupo 2A: Injeção de Hidroxiapatita e sacrifício em 24 horas. Grupo 2B: Injeção de Hidroxiapatita e sacrifício em 14 dias. Grupo 2C: Injeção de hidroxiapatita e sacrifício em 180 dias. O pó de cimento de HÁ foi dissolvido em solução salina e injetado. O látex foi obtido diretamente da árvore *Hevea brasiliensis*, filtrado, esterilizado e então injetado na prega vocal paralisada. O local da injeção foi o mesmo para as duas substâncias, no 1/3 posterior da prega vocal, diretamente no músculo tireoaritenoideo, lateralmente ao processo vocal.

RESULTADOS: A injeção de látex ocasionou intenso infiltrado inflamatório em 24 horas e em 14 dias e foi observada disseminação da substância ao longo das fibras musculares e tecidos cervicais. Em 6 meses a inflamação declinou, porém não havia sinais do látex injetado, que foi reabsorvido. A hidroxiapatita levou à inflamação intensa em 24 horas que declinou para grau moderado em 14 dias e discreta em 6 meses. Não houve sinais de reabsorção importante do enxerto e sua posição de injeção foi mantida, não induzindo reação de corpo estranho ou disseminação tecidual.

CONCLUSÃO: O látex não preenche os critérios para substância a ser injetada, devido à disseminação tecidual. A hidroxiapatita manteve o sítio de injeção, não migrou pelos tecidos cervicais e mostrou boa viabilidade, sem reação de corpo estranho, o que a candidata à substância ideal.

Palavras Chave: látex, hidroxiapatita, insuficiência glótica, pregas vocais, injeção.

SUMMARY

INTRODUCTION: Glottal insufficiency can be defined as the loss of adequate coaptation between vocal folds. Dysphonia and fluid and solid aspiration are the most common symptoms. The main causes are paralysis, paresis, atrophy and vocal fold scars. There are two types of surgery for the correction of glottic insufficiency: thyroplasty and the injection of substances. The latter technique has proved to be easier to execute, of lower cost and to have a lower morbidity rate. However, the ideal substance for this procedure is not yet available. Several materials have been tested for possible use during the last century, such as paraffin, cartilage, Teflon®, collagen, fat, muscle fascia, and hyaluronic acid. However, difficulties were encountered with these materials, such as the occurrence of absorption or the formation of foreign body granulomas. Hydroxyapatite is the main component of bone and teeth and has been used in the clinically to repair bone or dental defects, with good acceptance. No toxicity, foreign body reaction or absorption have been observed. Latex is a natural substance of the tree *Hevea brasiliensis* which has shown good biocompatibility with animal tissues in various experiments such as tympanoplasty, esophageal repair in dogs, vascular prostheses and encapsulation of Langerhans islets used for transplantation.

OBJECTIVE: The objective of the present study is to evaluate histologically the consequences of injection of hydroxyapatite and latex in previously paralyzed vocal cords of dogs and to evaluate the inflammatory response obtained, tissue migration, and implant viability. **MATERIALS AND METHODS:** Eighteen dogs were divided into six groups of three animals each: Group 1A, injection of latex and sacrifice after 24 hours; Group 1B, injection of latex and sacrifice after 14 days; Group 1C, injection of

latex and sacrifice after 180 days. Group 2A, injection of hydroxyapatite and sacrifice after 24 hours; Group 2B, injection of hydroxyapatite and sacrifice after 14 days; Group 2C, injection of hydroxyapatite and sacrifice after 180 days. The hydroxyapatite cement powder was dissolved in saline solution and injected. The latex was obtained directly from the tree *Hevea brasiliensis*, filtered, sterilized and then injected into the paralyzed vocal fold. The site of injection was the same for the two substances, i.e., the posterior 1/3 of the vocal fold, directly into the thyroarytenoid muscle laterally to the vocal process. **RESULTS:** The injection of latex caused an intense inflammatory infiltrate within 24 hours and after 14 days, with dissemination of the substance along the muscle fibers and cervical tissues. The inflammation diminished within 6 months but there was no sign of the injected latex, which had been reabsorbed. Hydroxyapatite caused intense inflammation within 24 hours, which diminished to a moderate degree within 14 days and to a mild degree within 6 months, showing viability of the graft and maintenance of its position at the site of injection, without inducing a foreign body reaction or tissue migration. **CONCLUSION:** Latex does not satisfy the criteria for a substance to be injected, whereas hydroxyapatite remained at the site of injection, did not migrate through the cervical tissues and showed good viability with no foreign body reaction, thus being a candidate for the ideal substance.

Key words: latex, hydroxyapatite, glottal insufficiency, vocal folds, injection

INTRODUÇÃO

A paralisia de prega vocal é uma doença relativamente comum, com prevalência e incidência ainda não bem estabelecidas. As suas principais causas são: idiopática, cirurgias cervicais ou torácicas, e traumas, através de arma branca ou de fogo. A sintomatologia do paciente com paralisia unilateral de prega vocal irá depender da posição em que a mesma se estabeleceu, sendo que pacientes com paralisia em posição mediana praticamente não apresentam sintomas, enquanto aqueles com paralisia em posição lateral apresentam disфонia importante associado à aspiração de líquidos ou sólidos devido à perda da função esfíncteriana da laringe (BRASIL et al., 2002).

A perda de coaptação adequada entre as pregas vocais é denominada Insuficiência Glótica (IG) (HERTEGARD et al., 2004), e quanto mais acentuada a abertura entre as mesmas, mais intensa serão as queixas do paciente (BRASIL et al., 2002). Além da paralisia de corda vocal, doenças que acometem a mucosa da prega vocal, como cicatriz, também podem levar a IG com sintomas variados (BELAFSKY & POSTMA, 2004; HERTEGARD, 2004).

O tratamento da IG ainda é um desafio para os otorrinolaringologistas, onde primeiro tenta-se a readaptação da função laríngea através de fonoterapia, e quando esta falha, o tratamento cirúrgico está indicado (DULGUEROV et al., 1999). O propósito dos procedimentos cirúrgicos vigentes é de medializar a prega vocal paralisada, com a intenção de restabelecer as funções esfíncterianas e fonatórias da laringe. (McCULLOCH et al., 2002) Atualmente existem duas técnicas principais para atingir tal objetivo: cirurgias do arcabouço laríngeo e injeção de substâncias (KNOW & BUCKMIRE, 2004).

Das cirurgias do primeiro grupo, a tireoplastia é a mais difundida e, inicialmente, foi proposta por Isshiki em 1974 ganhando grande popularidade devido à alta efetividade e segurança. Porém, apesar de apresentar bons resultados (SPECTOR et al., 2001; BILLANTE et al., 2002), se faz necessário um grande conhecimento técnico do procedimento. E por se tratar de um procedimento invasivo na região cervical, é necessário que seja realizado em ambiente hospitalar, com duração de cerca de 3 horas, e posterior internação, o que acarreta em aumento de custos.(ISSHIKI, 2000). Apesar de ser considerada atualmente como a cirurgia “gold-standart” para a correção da IG (KNOW & BUCKMIRE, 2004), não é isenta de complicações. Destas, as mais comuns são: hematoma, infecção, cicatriz não estética, e as mais temidas: extrusão do implante, insuficiência respiratória aguda e fistula laringo-cutânea (COTTER et al.1995; ABRAHAM et al., 2001; LACCOURREYE & HANS, 2003).

A técnica através da injeção de substâncias tem-se mostrado extremamente rápida e de fácil execução, expondo o paciente a menor taxa de infecções, visto não serem necessários incisões e manipulação da região cervical (RIHKANEN, 1998; REIJONEN et al., 2001; KNOW & BUCKMIRE, 2004). O procedimento é realizado em cerca de 15 minutos, através da cavidade oral ou percutânea (ANDERSON & MIRZA, 2001; TRASK et al., 2005), podendo ser executado com anestesia geral ou local (CHU & CHANG, 1997).

Esta técnica foi introduzida por Brunings em 1911 para a correção de paralisia de pregas vocais, quando a primeira substância utilizada foi a parafina. Infelizmente os resultados não foram bons, tendo sido normalmente observado nos pacientes submetidos a este procedimento: reação de corpo estranho, extrusão do implante, inflamação e migração da parafina para outras estruturas cervicais.

Durante décadas a injeção ficou abandonada até que Arnold em 1955 propôs o uso de cartilagem e pó de osso, com bons resultados imediatos, que, porém, desapareciam rapidamente, devido à reabsorção do enxerto. A dificuldade de colheita e preparação do material foram outros problemas encontrados pelo autor, o que o encorajou a procurar um substituto sintético.

Assim em 1962, (ARNOLD, 1962) o Teflon® foi introduzido. Durante três décadas foi a substância mais utilizada para injeção nas pregas vocais e parecia ser o produto ideal, até os efeitos colaterais aparecerem. Apesar da medialização ser efetiva e permanente, não se observava uma melhora importante na qualidade vocal em alguns pacientes, provavelmente, devido a sua composição rígida, que provocava alterações no sistema vibratório da prega vocal (WATTERSON, 1990). Porém, a situação mais temida do seu uso se refere às complicações que podem ocorrer, em cerca de 2 a 8 % dos casos, que são: obstrução aguda das vias aéreas superiores, inflamação crônica, migração para tecidos regionais e a mais temida de todas: a formação de granuloma de corpo estranho (LEWY, 1983; ELLIS et al., 1987; SOLOMONS & LIVESEY 1990; WENIG et al.1990; DOUSARY, 1997). Além de provocar a reação granulomatosa o teflon se infiltra nos tecidos que o circundam dificultando a sua remoção. Mesmo quando se consegue removê-lo, a fibrose resultante leva à alterações irreversíveis na vibração da prega vocal. (VARVARES et al., 1995). Desde o início da década de 90 o teflon foi, praticamente, abandonado como opção de injeção.

Outra substância utilizada é o colágeno, que é uma substância que existe na estrutura da prega vocal, não induzindo a formação de granuloma de corpo estranho. O primeiro colágeno a ser utilizado foi o de origem bovina (FORD, 1984; FORD et al., 1992), que teve o seu uso limitado devido a reações imunológicas, reabsorção e risco de aquisição da doença de Creutzfeld-Jacob. Resultados promissores têm sido reportados

com o uso de colágeno humano autólogo e heterólogo, este último obtido de pele de cadáveres, mostrando ser fácil de manipular e injetar. Além de bem tolerado e apresentando boa resposta vibratória da corda vocal. A qualidade vocal apresenta grande melhora (FORD et al., 1995; REMACLE et al., 1999; PEARL et al., 2002), porém o resultado a longo prazo se mostra ineficaz, com altas taxas de reabsorção, além de custo operacional muito alto.(COUREY, 2001, KARPENKO, 2003).

Em 1991, Mikaelian testou a injeção de gordura autóloga, que apresentou grandes vantagens, tais como: baixa antigenicidade, fácil obtenção, baixo custo, injeção sem dificuldades. Um trabalho mostra que a gordura é a substância cuja viscosidade melhor se assemelha ao do sistema vibratório da prega vocal (CHAN & TITZE, 1998). Porém, a longo prazo, os resultados mostram que ela apresenta reabsorção em grau variável, onde a taxa de sucesso diminui sensivelmente, cerca de 6 meses a 1 ano após a cirurgia (SHINDO et al., 1996; McCULLOCH et al., 2002; GLATZ et al., 2003; LACCOURREYE et al., 2003).

Recentemente, Rihkanen (1998) introduziu o uso de fâscia autóloga, que pode ser utilizada na forma de injeção na paraglote ou implantada, na lâmina própria ou músculo tireoaritenóideo. A fâscia apresenta algumas das características positivas da gordura, como a de ser facilmente obtida e ter baixo custo. Uma vantagem adicional é a de ser um tecido com abundância de colágeno e com baixa taxa de metabolismo. Estes fatores podem ajudar a prolongar a vida do enxerto, sem alterar as propriedades vibratórias da prega vocal. Porém apesar de resultados iniciais ótimos (REIJONEN, 2002), a fâscia apresenta sinais de reabsorção do enxerto, e os resultados obtidos no pós-operatório imediato, aparentemente não se sustentam ao longo do tempo.(RODGERS et al., 2000).

O ácido hialurônico é um componente natural da matriz extra-celular, presente também na prega vocal (BUTLER et al., 2001). Trabalhos mostram que não é uma substância espécie-específico, ou seja, não causa reação imune humoral ou celular quando inserida em diferentes espécies (LAURENT, 1987; LAPCIK et al., 1998). Vem sendo utilizado em cirurgias estéticas, através de injeção, para correção de defeitos faciais. Existem atualmente duas formas comerciais de ácido hialurônico: Hylan B gel®, que é derivado da crista de galo, e o Restylane®, proveniente de engenharia microbiológica. (MANNA et al., 1999)

O ácido hialurônico foi usado pela primeira vez na laringe em 2002 por Hertegard et al., que obteve bons resultados iniciais na correção da insuficiência glótica. Esta substância apresenta ainda propriedades visco-elásticas muito próximas às da prega vocal, portanto não interfere na sua capacidade vibratória (BORZACCHIELO et al., 2005).

Porém, esta substância parece padecer do mesmo fim dos implantes biológicos, apresentando reabsorção ao longo do tempo, e necessitando novas intervenções cirúrgicas para se alcançar o sucesso inicial (HERTEGARD et al., 2004). Existe ainda relato de um caso de reação granulomatosa, quando Restylane® foi utilizado nos lábios (FERNANDEZ-ACENERO et al., 2003). Este fato merece muita atenção ao utilizar esta substância na laringe.

Muitos autores são de opinião que a substância ideal para a injeção deve ser biocompatível, inabsorvível, não reativa, não volátil, não carcinogênica, facilmente injetada, de baixo custo, de fácil aquisição e que mantenha seu volume e posição após a injeção, sem se disseminar para os tecidos circundantes.(KARPENKO et al., 2003; KNOW & BUCKMIRE, 2004; CHHETRI et al., 2004; HERTEGARD et al., 2004). Atualmente, não há uma substância que preencha todos esses critérios.

A hidroxiapatita (HA) é o principal componente de ossos e dentes, e é formada, essencialmente, por uma interligação de moléculas de fosfato de cálcio $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. No pH fisiológico é de consistência dura e pouco solúvel. Desde a década de 70 é possível a sua obtenção para fins clínicos, sendo utilizada para reconstrução de ossos e dentes com ótima biocompatibilidade (KENT et al., 1986; PIECUCH et al., 1983; HOLMES, 1979), sem reabsorção, sem induzir formação de granulomas de corpo estranho ou reações tóxicas (VAN BLITTERSWIJK, 1990). Estes achados são esperados, visto que este material é formado basicamente de íons de cálcio e fosfatos, componentes naturalmente encontrados no corpo humano.

Dois tipos de HA são disponíveis para fins terapêuticos: cerâmica e não-cerâmica (cimento). A primeira é obtida através da fusão de cristais de fosfato de cálcio a 600 a 700 °C, cujo resultado é um material duro, resistente, não maleável (CONSTANTINO et al., 1991) que é usado em otorrinolaringologia como implante laríngeo em tireoplastias, ou então como implante ossicular nas timpanoplastias com reconstruções de cadeia (RONDINI-GILLI et al., 2003; REMACLE et al., 2001). Porém, a aplicabilidade deste material é restrita devido à dificuldade de precisão para esculpir o implante no molde desejado para se adequar ao defeito existente.

Já o cimento de HA (CHA) é obtido através da cristalização em vivo, sem necessidade de aquecimento. A HA é formada, na sua maior parte, por tetracálcio fosfato $\{Ca_4(PO_4)_2\}$ e dicálcio fosfato (Ca_2HPO_4): o primeiro tem propriedades básicas e o segundo ácidas. Quando estas duas substâncias são misturadas, em meio aquoso e nas condições ideais (37°C e pH entre 6,5 e 8,0) irão reagir e formar CHA, conforme a reação $[Ca_4(PO_4)_2 + CaHPO_4 \rightarrow CA_5(PO_4)_3OH]$. Cerca de 15 a 30 minutos após, a reação se completa e o material, antes maleável, se torna resistente. Na prática médica pode-se misturar o pó à solução salina, água ou sangue, e a pasta originada, pode ser

moldada em qualquer forma ou injetada. E uma vez em contato com o pH fisiológico e com a temperatura do tecido, endurecerá, porém com uma resistência inferior à da HA cerâmica, mas ainda resistente o suficiente para a reconstrução de ossos não submetidos a stress ou então de tecido mole (FUKASE et al., 1990; CONSTANTINO et al., 1991).

O CHA tem sido utilizado na última década em larga escala para corrigir defeitos ósseos maxilo-faciais, obliteração de cavidade mastóidea e seio frontal, preenchimento de cavidade periodontal, cirurgias ortopédicas e para medialização de prega vocal (RUPPRECHT et al., 2001; VERRET et al., 2005; CHRISTODOULOU et al., 2005; SHARMA, 2005). Belafsky (2004) e Rosen (2004), quase simultaneamente, utilizaram a HA na região laríngea para correção de IG, com bons resultados iniciais.

Já o látex é um material obtido da seringueira (*Hevea brasiliensis*), extraído na forma líquida e que ao entrar em contato com oxigênio, em pH ácido ou neutro, sofre um processo de coagulação até formar borracha (THOMAZINI, 1997). O látex tem sido utilizado em vários procedimentos como: timpanoplastias (OLIVEIRA et al., 1999), substituição de pericárdio em cães (SADER et al., 2000), próteses vasculares (FREITAS, 2001), e reparação de esôfagos (MRUÉ 1996, 2001), mostrando excelente biocompatibilidade, não induzindo reação de corpo estranho. Recentemente, um estudo utilizou-se da biomembrana de látex para revestir ilhotas pancreáticas, utilizadas em transplante. Este estudo mostrou boa biocompatibilidade, sem ocorrer formação de granuloma e mostrando propriedades angiogênicas (MENTE, 2002). Ao entrar em contato com o oxigênio e com o pH tecidual, o látex se coagula e mantém uma estrutura elástica capaz de ajudar, ou ao menos não prejudicar, o sistema vibratório da prega vocal.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar histologicamente a interação entre a HA e o látex, com o tecido das pregas vocais caninas. Avaliando a resposta tecidual obtida, a mobilidade das substâncias na laringe e a viabilidade do enxerto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (Anexo 1).

Utilizou-se no experimento 21 cães mestiços, de ambos os sexos, com peso variando de 11 a 14,4Kg. Os animais foram capturados em cidades da região de Ribeirão Preto e mantidos e observados, por no mínimo 21 dias, nos canis do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os animais foram separados em 3 grupos. Um para a injeção de látex, outro para injeção de HA e o grupo controle (Grupos 1,2 e 3 respectivamente). Os animais do grupo 1 foram divididos em 3 sub-grupos (A,B e C) de três animais cada, e foram injetados com látex na prega vocal. Os cães do subgrupo 1A foram sacrificados em 24 horas para análise histológica da laringe. Os animais dos subgrupos 1B e 1C foram sacrificados em 14 e 180 dias, respectivamente (Tabela 1).

Os animais do grupo 2 foram divididos em 3 sub-grupos(A,B e C) de três animais cada, e foram injetados com HA na prega vocal. Os cães do subgrupo 1A foram sacrificados em 24 horas para análise histológica da laringe. Os animais dos subgrupos 1B e 1C foram sacrificados em 14 e 180 dias, respectivamente (Tabela 1).

O grupo controle (Grupo 3) era composto de 3 animais, e foi utilizado soro fisiológico 0,9% para injeção na prega vocal. Um animal foi sacrificado em 24 horas, outro em 14 dias e o terceiro em 180 dias.

Tabela 1- Disposição dos animais segundo a substância injetada e tempo de sacrifício

| | Grupo A Sacrifício em 24 horas | Grupo B Sacrifício em 14 dias | Grupo C Sacrifício em 180 dias |
|---|--|---|--|
| Grupo 1 Injeção de Latex | cães nº 1, 2 e 3 | cães nº 4, 5 e 6 | cães nº 7, 8 e 9 |
| Grupo 2 Injeção de HA | cães nº 10, 11 e 12 | cães nº 13, 14 e 15 | cães nº 16, 17 e 18 |
| Grupo 3 Controle | cão 19 | cão 20 | cão 21 |

Os cães foram submetidos a um jejum de no mínimo 6 horas antes da cirurgia e então anestesiados com Thionembutal (thiopental sódico – Abbot) na dose de 15 mg/Kg via endovenosa, entubados e mantidos sob ventilação mecânica. Em seguida foram posicionados sobre mesa cirúrgica apropriada, em decúbito dorsal horizontal, e com discreta hiperextensão cervical. Durante a cirurgia o plano anestésico foi mantido com infusão endovenosa intermitente de thiopental na dose de 25mg/ml.

Após tricotomia, foi realizada uma cervicotomia do lado esquerdo e dissecação dos tecidos cervicais até a identificação do nervo laríngeo recorrente (Figura 1). Após ter sido isolado, o nervo foi seccionado, e foi removido cerca de 3cm de sua extensão. Para eliminar qualquer chance de reinervação, os cotos foram ligados com fio de algodão 1-0.

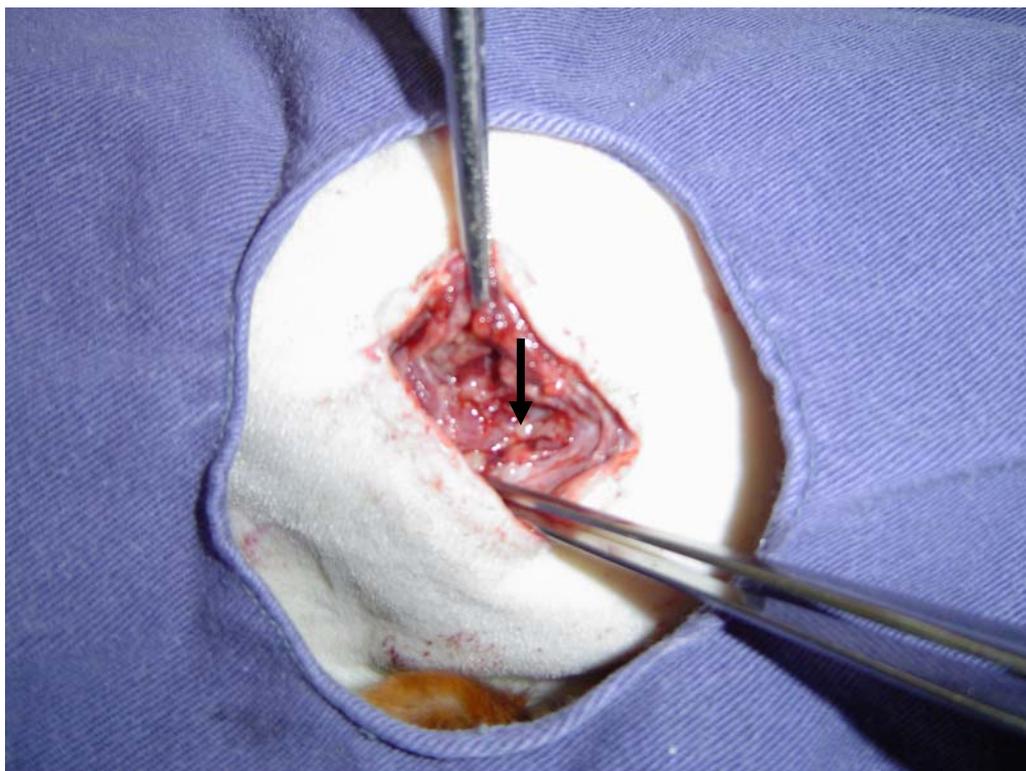


Figura 1- Cervicotomia à esquerda e dissecação até identificação de nervo laríngeo recorrente (Seta preta)

Após a secção do nervo, os animais foram extubados e superficializados no plano anestésico, até respiração espontânea, para comprovar a imobilidade da prega vocal esquerda através de laringoscopia direta. Após a confirmação da paralisia os animais tiveram o plano anestésico aprofundado e os planos musculares, submucosa e pele suturados com vicryl 4-0. Os animais do grupo controle não foram submetidos à secção do nervo laríngeo recorrente.

Os cães foram submetidos à laringoscopia direta com laringossuspensor de modo a permitir a total visualização das pregas vocais e mantidos sem tubo endotraqueal e sob respiração espontânea para facilitar o procedimento cirúrgico (Figura 2).



Figura 2- Laringossuspensão para visualização de pregas vocais

A HA (Sigma, St. Louis, MO, USA) é disponível na forma de pó. Cerca de três gramas do produto foram misturados com 10ml de solução salina a 0,9%, até obtenção de pasta homogênea. Devido à viscosidade do produto, foi utilizado injetor de Brunnings com agulha gaugio 21. O ponto de injeção foi na região muscular (músculo tireoaritenóideo), no terço posterior da prega vocal esquerda, imediatamente lateral ao processo vocal da cartilagem aritenóide (ROSEN, 2000). O volume injetado foi o suficiente até completa medialização da prega vocal paralisada, não havendo hipercorreção.

O látex foi obtido da árvore *Hevea brasiliensis* e a sua extração foi realizada mediante incisões em meia espiral efetuadas no tronco das seringueiras a cerca de 70 a 90 cm de altura. Antes de realizar as incisões, o local foi limpo, lixado e desinfetado com álcool 70% para evitar contaminação, e a presença de impurezas. Após a coleta, o látex foi submetido à centrifugação, visando diminuir a quantidade de proteínas nele presentes naturalmente, muitas delas responsáveis por reações alérgicas (ELLIS, 1990).

Após a centrifugação o látex foi filtrado em gaze de algodão e acondicionado em frasco estéril sob refrigeração entre 2 e 4^oC para retardar coagulação. Evitou-se o uso de amônia, normalmente utilizada para manter o látex na forma líquida, uma vez que esta substância pode causar necrose tecidual e toxicidade como mostrou um estudo piloto realizado. A esterilização do látex foi realizada com Raios gama. O local da injeção e o volume injetado foram realizados como descrito acima. Porém, utilizou-se de seringa comum, com agulha longa de microcirurgia de laringe, pois o látex é muito fluido e não se continha adequadamente no injetor de Brunnings.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em convalescença no laboratório de cirurgia experimental por 48 horas, sendo então encaminhados ao Biotério pra acomodação e alimentação, com exceção dos animais sacrificados em 24 horas. A alimentação consistiu de ração granulada. Foi realizada analgesia com dipirona sódica na dose de 10mg/Kg de peso como dose única durante a cirurgia. Optou-se por não manter o uso de analgésico que poderia causar diminuição da atividade inflamatória e interferir nos resultados do estudo.

Antes do sacrifício e após indução anestésica com respiração espontânea, os animais foram submetidos à laringoscopia direta para avaliar se a medialização alcançada na cirurgia se mantinha ou se havia falha na coaptação glótica. A eutanásia ocorreu de forma não dolorosa com injeção maciça de cloreto de potássio, após indução

anestésica com Thionembutal. Os cães dos grupos 1A e 2A foram sacrificados em 24 horas após a cirurgia. Os animais dos grupos 1B e 2B foram sacrificados em 14 dias e os dos grupos 1C e 2C em 180 dias, após a cirurgia.

Após o sacrifício, foi realizada laringectomia total, e as pregas vocais e tecidos circundantes dissecados, separados e fixados em formol a 10% em solução salina por 12 horas (Figura 3). A seguir, as peças foram lavadas em água e desidratadas em uma série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.



Figura 3- Laringe removida do animal para posterior fixação

A prega vocal foi seccionada no plano coronal, sobre o local de injeção e em fragmentos de 2mm anterior e posteriormente ao ponto inicial foram obtidos. Para cada fragmento oito cortes, de 6 μ m de espessura, em micrótomo Leica Jung RM 2065 foram

colhidos e posicionados em lâminas de vidro, hidratados e corados com Hematoxilina e Eosina e montados com lamínulas.

Os cortes foram observados em microscópio Olympus BX-50 e as imagens foram adquiridas com câmera Nikon DXM 1200. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Migração: Observou-se se a substância injetada permanecia no local de injeção, ou apresentava disseminação pelos tecidos laríngeos ou entre as fibras musculares;
- Inflamação: Avaliação qualitativa do processo inflamatório, baseado na celularidade ao redor do sítio de injeção. Classificando-a em leve, moderada ou intenso;
- Formação de Granuloma: Avaliação quanto à presença de granulomas, células gigantes ou reação de corpo estranho;
- Viabilidade do enxerto: Avaliação do grau de absorção do implante e da sua manutenção ao longo do tempo.

RESULTADOS

Dos 18 animais utilizados no estudo, dois vieram a falecer antes do tempo previsto, por circunstâncias não relacionadas à cirurgia (cães números 6 e 17). Na época do estudo, o Biotério encontrava-se em reforma, obrigando o uso das gaiolas com vários animais. A convivência próxima entre os cães, motivou luta entre os mesmos. Os dois animais que morreram foram vítimas de briga, onde um teve morte instantânea devido à laceração cervical, e o outro por infecção em pata traseira, apesar de ter recebido tratamento adequado. Os 16 cães restantes concluíram o protocolo experimental e foram sacrificados no tempo proposto.

Após a cirurgia houve boa recuperação dos animais, com retorno à alimentação em menos de 12 horas e com leve dificuldade de deglutição no primeiro dia. Não foram observado sinais de aspiração, estridor ou insuficiência respiratória ao longo de todo o estudo.

O latido voltou ao normal cerca de 10 dias após o procedimento, e manteve-se de boa qualidade, exceto nos animais números 7, 8 e 9. Esses animais, após cerca de um mês, começaram a apresentar latido de menor volume, que piorou progressivamente. Após três meses, em média, houve estabilização da qualidade vocal, num latido pouco intenso e soproso.

Os cães de número 5 e 15 apresentaram edema cervical discreto, por provável hematoma no local da incisão, sem repercussões importantes. Houve total resolução do quadro em seis dias.

Avaliação do fechamento glótico

Todos os animais dos grupos 1A e 2A apresentavam medialização mantida da prega vocal paralisada após 24 horas da injeção. Os cães do grupo 2B também apresentavam fechamento completo da glote após 14 dias.

Já no grupo 1B somente um dos animais apresentava fechamento glótico adequado (cão número 4), enquanto que o outro animal do grupo (cão número 5), apresentava fenda glótica discreta, evidenciando falha na medialização.

Todos os animais do grupo 1C apresentavam incompetência glótica, com a prega vocal esquerda em posição paramediana, sem qualquer sinal da correção realizada, sugerindo reabsorção do injetado.

Os animais do grupo 2C apresentavam medialização mantida, onde somente o cão número 18 apresentava discreto sinal de insuficiência glótica, sugerindo reabsorção discreta do implante (Tabela 2).

Tabela 2- Evolução clínica dos animais submetidos à cirurgia.

| Nº | QUALIDADE VOCAL | AVALIAÇÃO GLÓTICA | COMPLICAÇÕES |
|-----------|--|--|---------------------|
| 1 | Latido pouco rouco e de pouco volume | Medialização Total | |
| 2 | Latido rouquidão intensa | Medialização Total | |
| 3 | Latido pouco rouca e de pouco volume | Medialização Total | |
| 4 | Latido normal | Medialização Total | |
| 5 | Latido normal | Prega Vocal Discretamente Lateralizada | Hematoma Cervical |
| 6 | Não completou estudo | | |
| 7 | Latido muito rouco, baixo volume e com sopro intensa | Prega Vocal Lateralizada | |
| 8 | Latido muito rouco, baixo volume e com sopro intensa | Prega Vocal Lateralizada | |
| 9 | Latido muito rouco, baixo volume e com sopro intensa | Prega Vocal Lateralizada | |
| 10 | Latido leve aspereza e rouquidão | Medialização Total | |
| 11 | Latido com moderada rouquidão | Medialização Total | |
| 12 | Latido rouquidão leve e baixo volume | Medialização Total | |
| 13 | Latido normal | Medialização Total | |
| 14 | Latido com leve rouquidão | Medialização Total | |
| 15 | Latido normal | Medialização Total | Hematoma Cervical |
| 16 | Latido normal | Medialização Total | |
| 17 | Não completou estudo | | |
| 18 | Latido leve sopro | Discreta Lateralização | |

Nos animais controles, não foi observado nenhuma alteração histológica (Figura 4).

LÁTEX

À macroscopia, nos animais do grupo 1A, pode-se observar intensa hiperemia e edema de toda hemilaringe à esquerda, desde a prega vestibular, até os primeiros anéis traqueais. Não havia sinais de necrose.

Histologicamente a injeção provocou intenso infiltrado inflamatório difuso, por todos os tecidos laríngeos, desde submucosa até os tecidos musculares, especialmente ao redor das partículas de látex. No infiltrado pode-se observar a presença de histiócitos, plamócitos e neutrófilos. A injeção ocorreu no músculo tireoaritenoideo, porém não houve manutenção da substância em sua posição. Pode-se observar a disseminação do látex por entre as fibras musculares, atingindo até cartilagem (Figura 5A).

O látex provocou intensa miólise, ou seja, destruição das miofibrilas, podendo ser observado apenas o sarcolema remanescente das fibras (Figuras 5B e 6). Os vacúolos que aparecem no interior das fibras musculares, se assemelham às partículas do látex, mas a análise microscópica das fibras confirmou se tratar das miofibrilas danificadas.

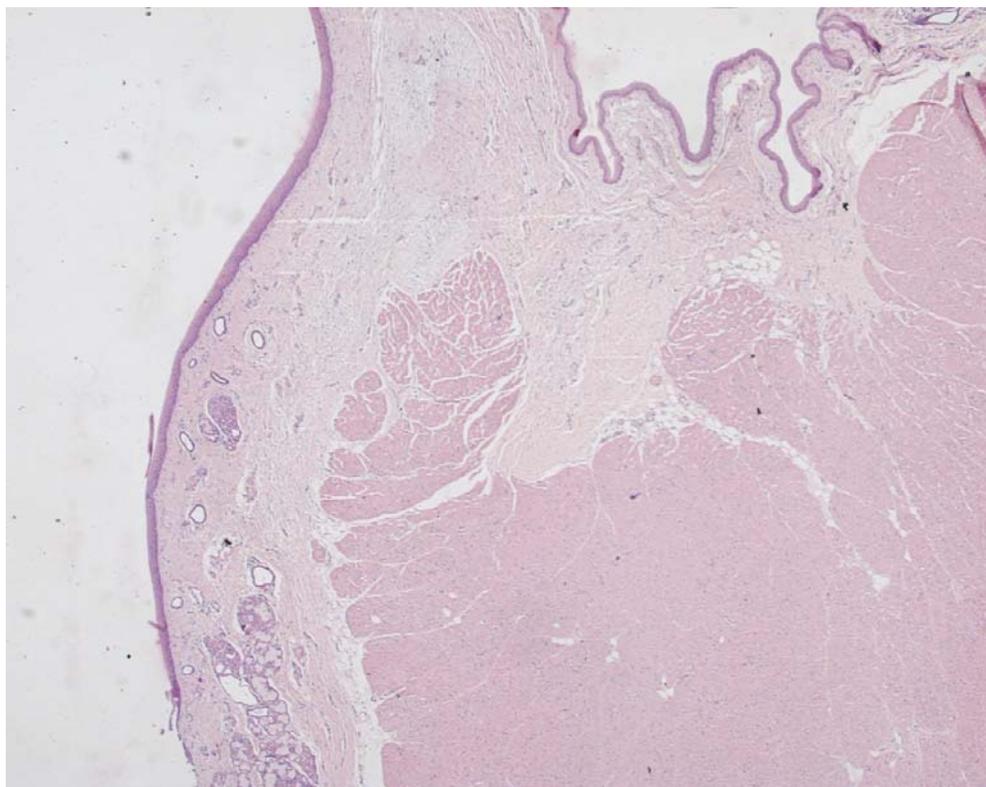


Figura 4- Prega vocal de cão injetada somente com solução salina a 0,9%. Ausência de resposta inflamatória e tecido muscular e estruturas da prega vocal sem alterações

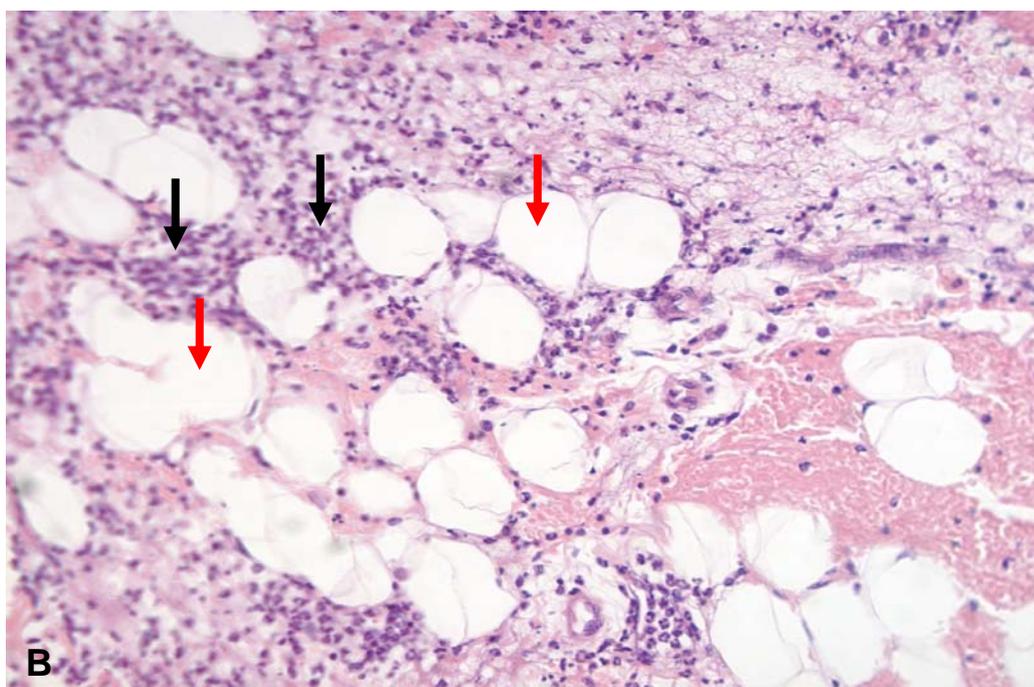
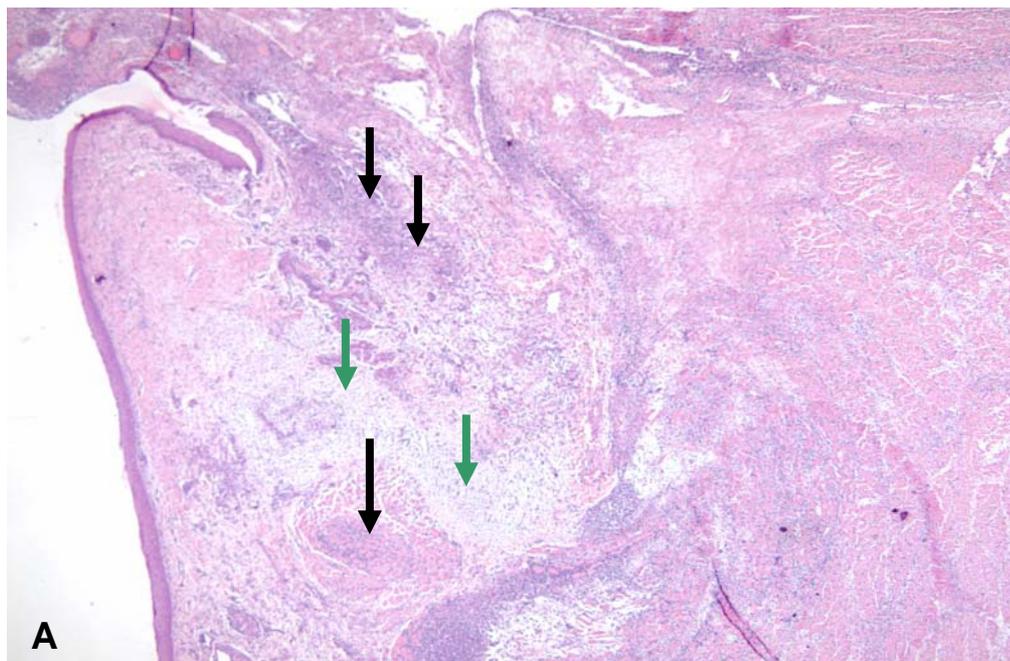


Figura 5- Fotomicrografia da prega vocal canina 24 horas após a injeção de látex. **A-** Partículas de Látex (setas verdes) ao longo das fibras musculares e submucosa, levando a intenso infiltrado inflamatório (setas pretas). (Aumento de 40X) **B-** Detalhe da miólise provocada pelo látex (setas vermelhas) e o intenso infiltrado inflamatório entre as miofibrilas (setas pretas).(Aumento 400X)

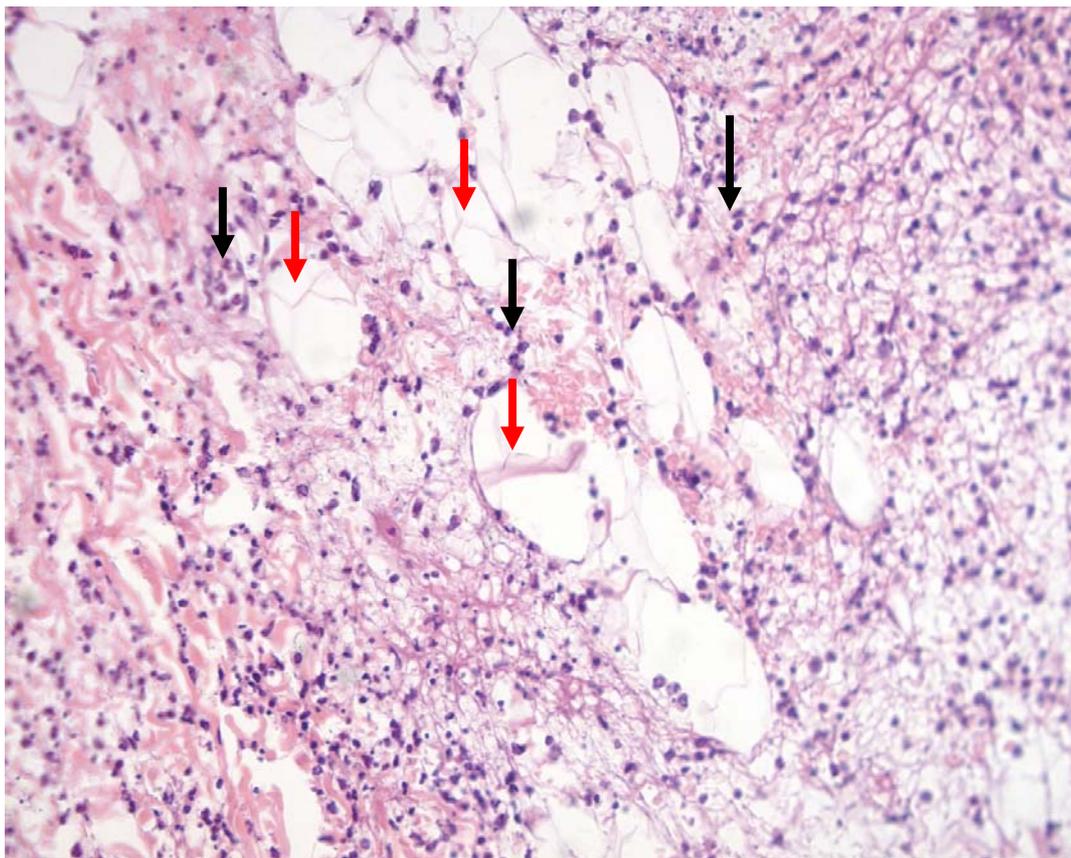


Figura 6- Prega vocal canina observada 24 horas após injeção de látex. Aspecto das miofibrilas em miólise, contendo restos de estruturas miofibrilares (setas vermelhas), circundada por células inflamatórias (setas pretas). (Aumento 400X)

Após 14 dias da injeção de látex, os animais do grupo 1B, apresentavam processo inflamatório importante, porém menos intenso daquele observado nas primeiras 24 horas (Figura 7A). A destruição das miofibrilas se torna mais evidente, e se pode observar vários estágios da miólise. Algumas miofibrilas ainda possuem uma estrutura miofibrilar, em outras observa-se retração do sarcoplasma e um desarranjo parcial da sua arquitetura, até culminar em destruição total (Figura 7B).

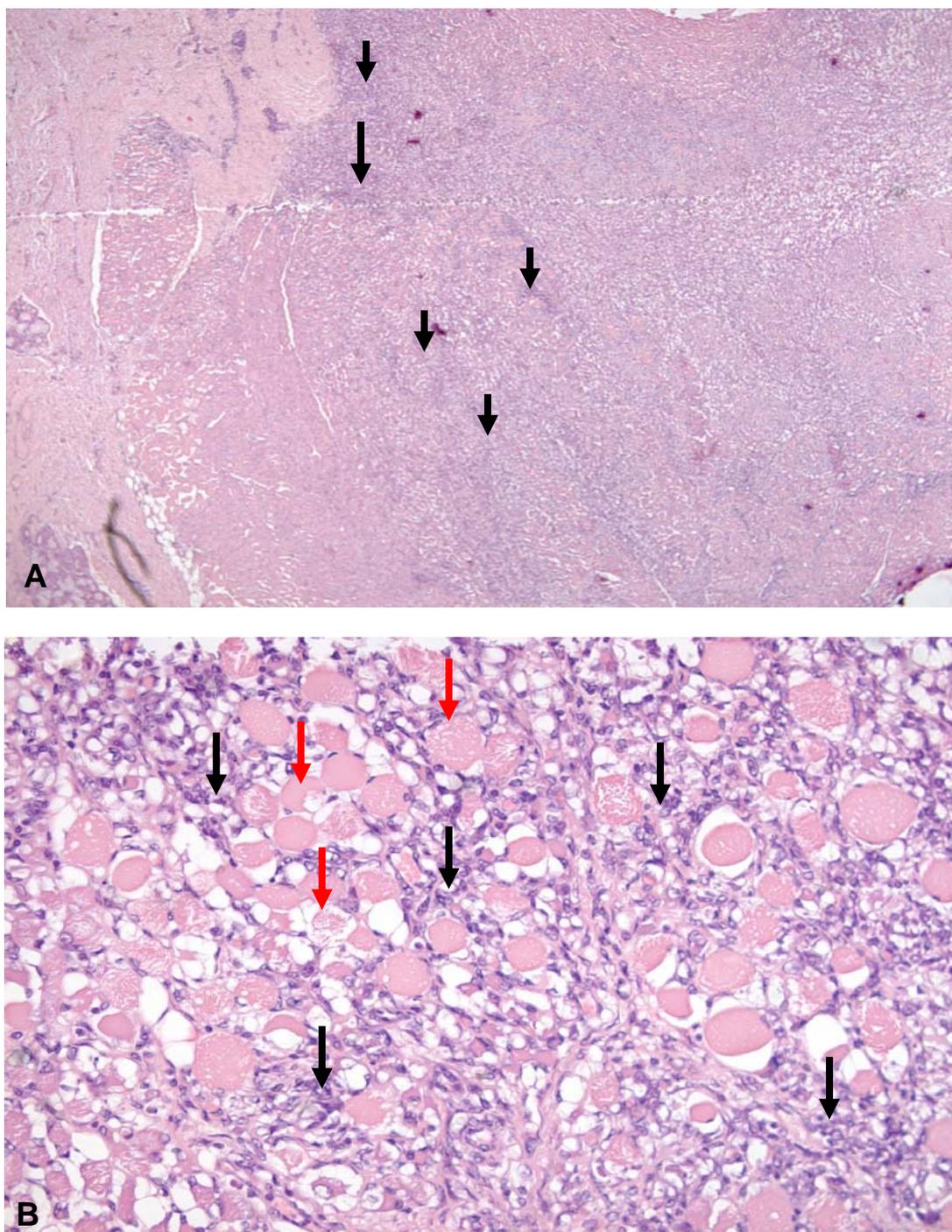


Figura 7- A- Fotomicrografia de prega vocal 14 dias após a injeção de látex. Ainda se observa intenso infiltrado inflamatório (setas pretas). (Aumento 40x). **B-** Detalhe das miofibrilas em diferentes estágios de desintegração, observa-se células inflamatórias ao redor das fibras musculares (setas vermelhas). (Aumento 400X)

Nos animais do grupo 1C, não foram observados sinais da presença do látex injetado na laringe. A inflamação no local era discreta, e foram observados sinais de atrofia da prega vocal (Figura 8).

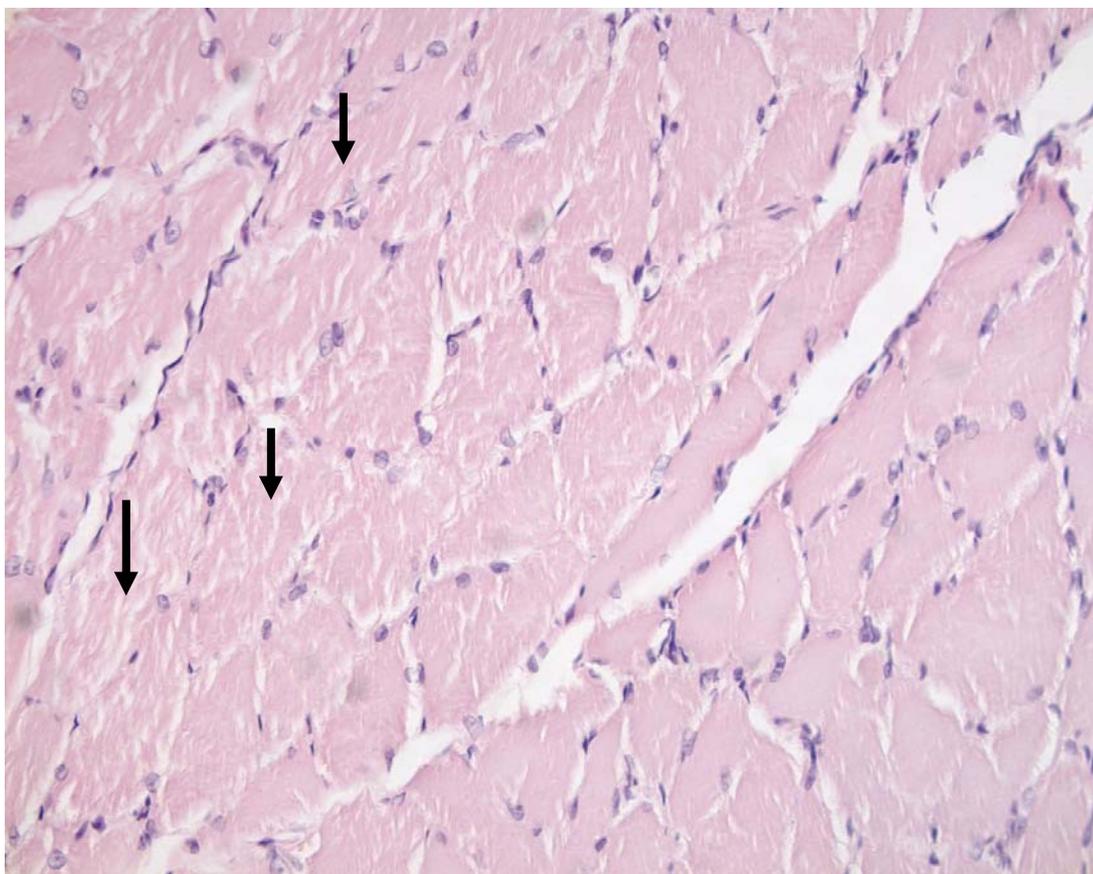


Figura 8- Fotomicrografia da laringe 6 meses após injeção de látex. Ausência de sinais de partículas do látex. O processo inflamatório na região é discreto. Observa-se atrofia muscular (setas pretas), secundário à paralisia realizada. (Aumento de 400X)

HIDROXIAPATITA

Nos animais do grupo 2A, macroscopicamente, as laringes mostravam hiperemia moderada no lado esquerdo, sem sinais de necrose ou disseminação tecidual.

A histologia da prega vocal injetada com hidroxiapatita, mostrava resposta inflamatória intensa nas primeiras 24 horas (Figura 9), através de infiltrado inflamatório

formado principalmente por neutrófilos, plasmócitos e linfócitos (Figura 10A). Não foram observados sinais de disseminação da hidroxiapatita através das fibras musculares ou tecidos cervicais. A injeção dessa substância provocou destruição discreta das miofibrilas que se encontravam ao redor da substância injetada, mas que não se estendia a planos mais profundos (Figura 10B).

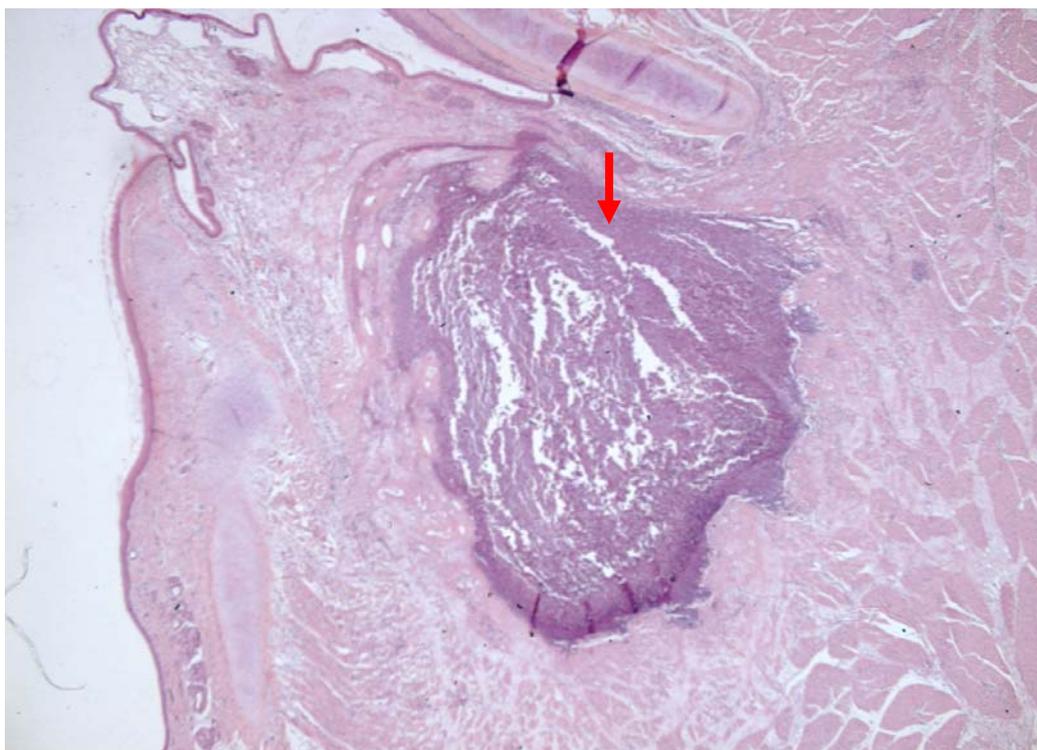


Figura 9- Fotomicrografia da prega vocal canina injetada com hidroxiapatita. Observa-se que a substância se restringe ao tecido muscular, sem que se disseminasse para os demais tecidos. (Aumento 20X)

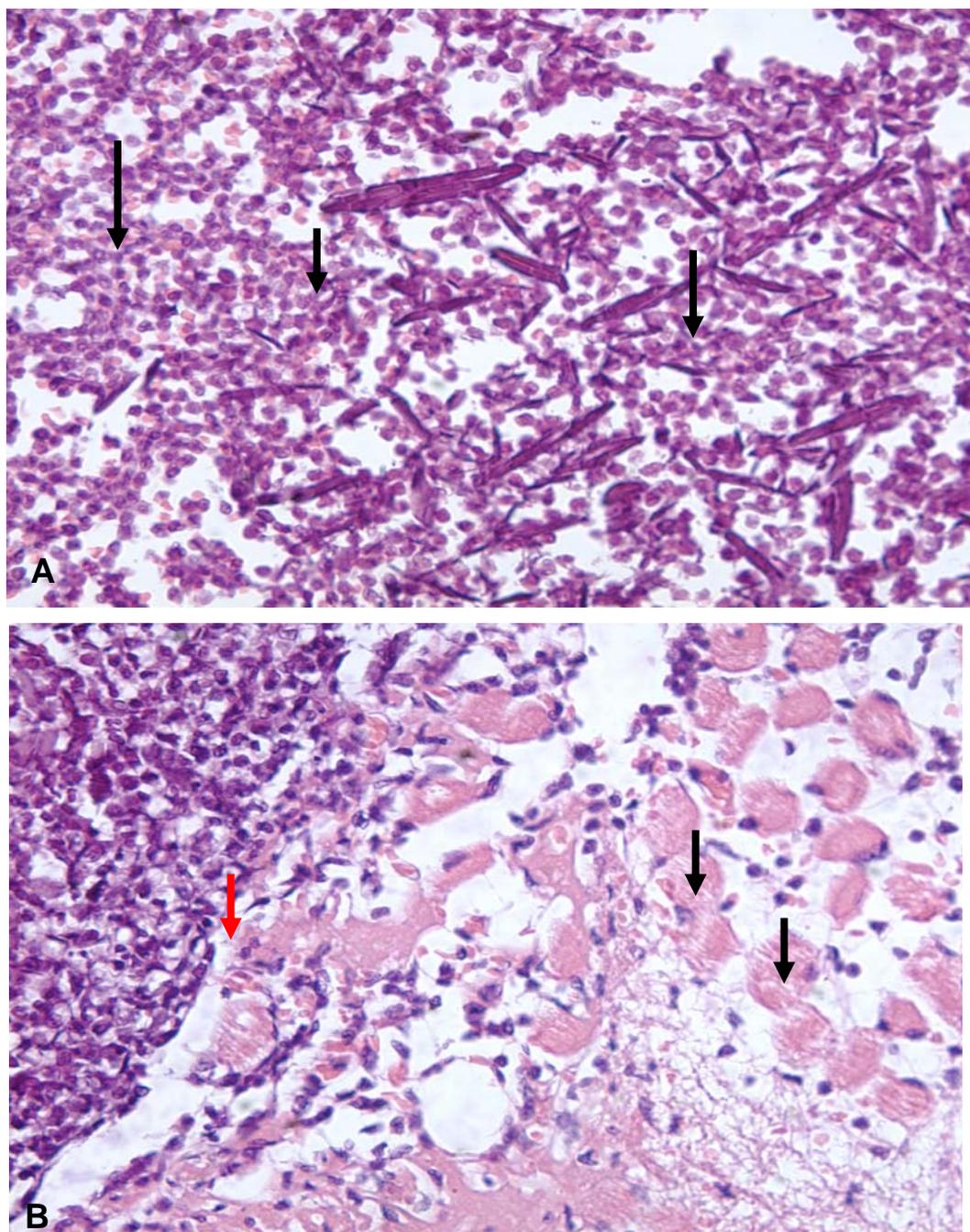


Figura 10- Prega vocal após 24 horas, injetada com hidroxiapatita. **A-** Detalhe do intenso infiltrado inflamatório no interior do implante (setas pretas). (Aumento 400X) **B-** Margem do local injetado com a substância, mostrando a separação entre a hidroxiapatita e o tecido muscular (seta vermelha). Detalhe de algumas miofibrilas alteradas (setas pretas). (Aumento 400X)

Após 14 dias da injeção de hidroxiapatita, o infiltrado inflamatório apresentou discreta diminuição de intensidade, mas ainda pode ser considerado importante. O padrão celular era o mesmo observado em 24 horas, com predomínio de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Observou-se a permanência da substância entre as fibras musculares, não havendo migração para outros tecidos cervicais (Figura 11). Foi possível observar uma margem mais nítida separando a hidroxiapatita dos tecidos musculares.

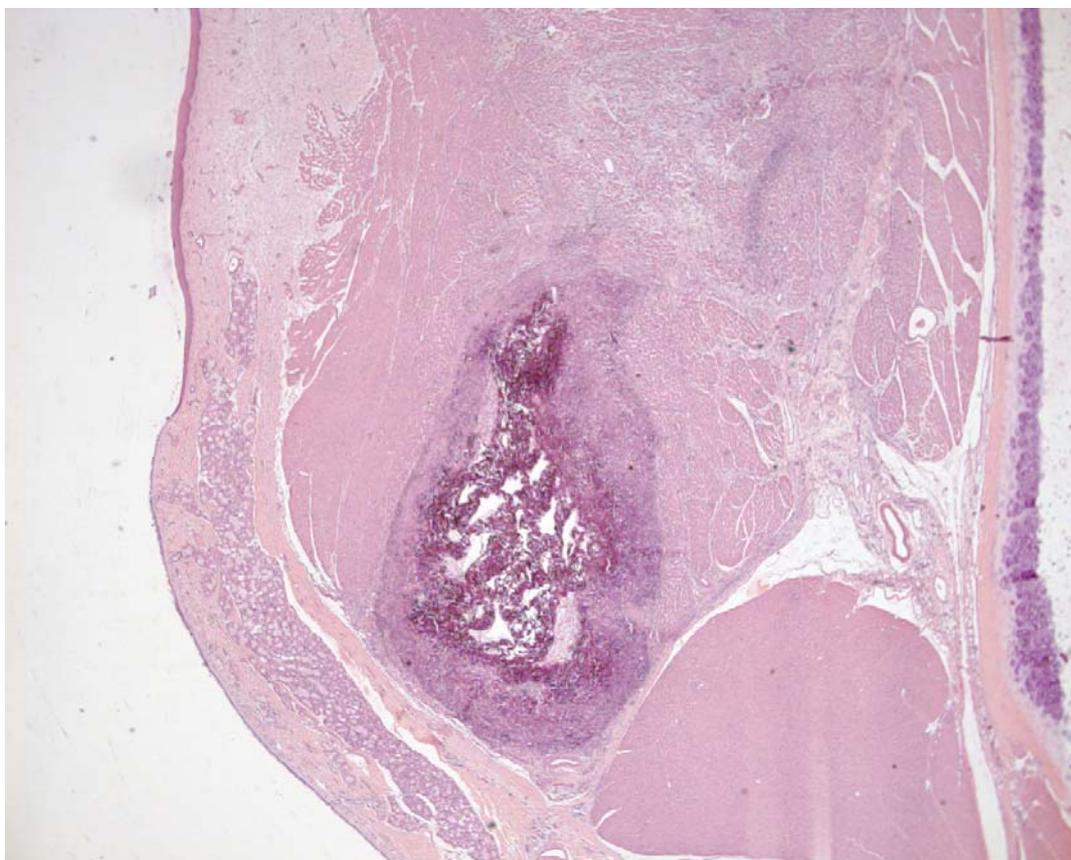


Figura 11- Prega vocal canina após 14 dias da injeção de hidroxiapatita. O implante mantém o seu local de injeção sem disseminação para os tecidos subjacentes (seta vermelha). (Aumento de 20X)

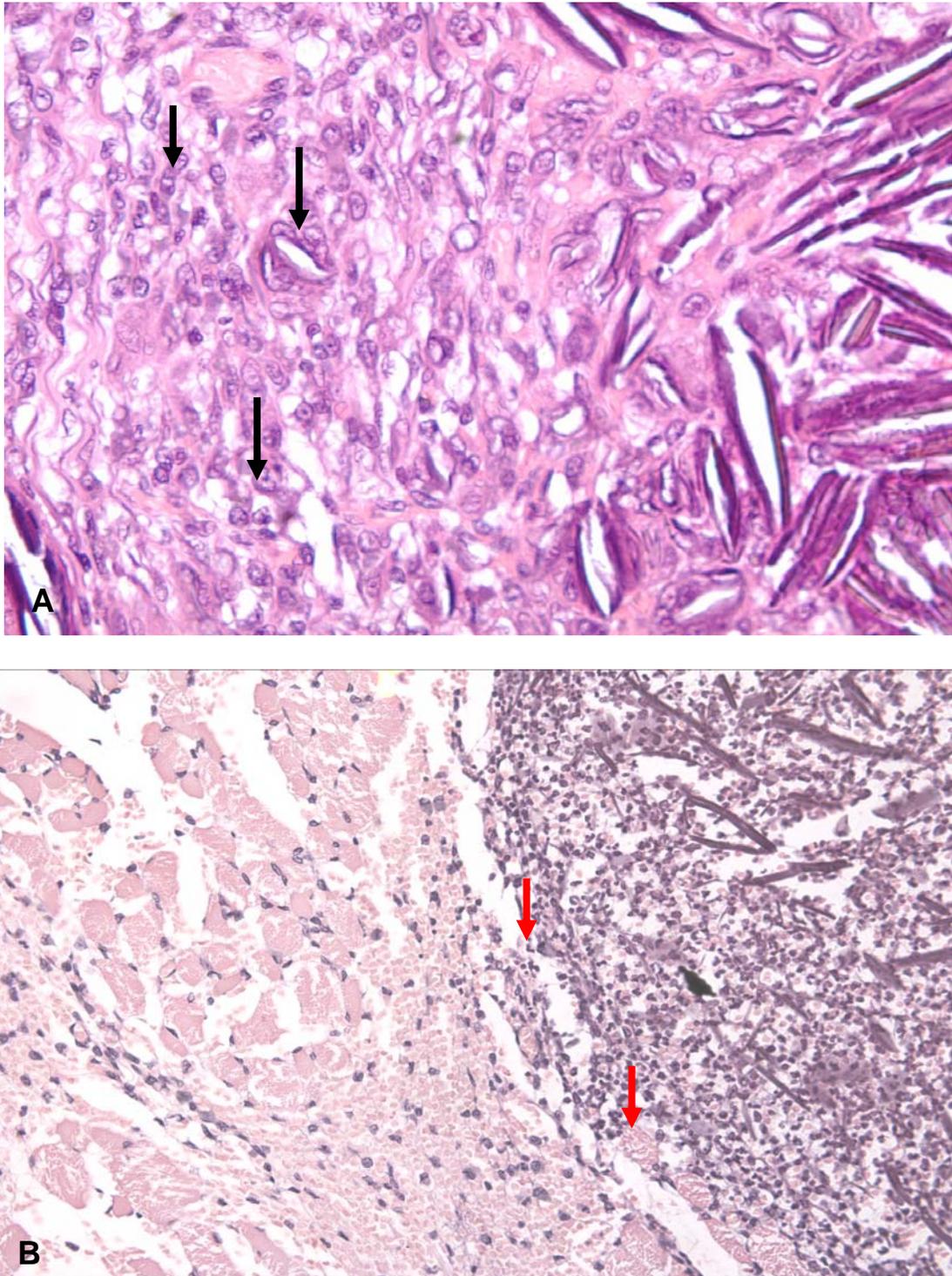


Figura 12- Prega vocal de cão após 14 dias da injeção de hidroxiapatita após 14 dias. **A-** Detalhe do processo inflamatório (seta pretas). (Aumento 400x) **B-** Detalhe do limite entre tecido muscular e implante (setas vermelhas). (Aumento 200X)

Após seis meses os animais do grupo 2C apresentavam, macroscopicamente, laringes sem sinais de inflamação importante, necrose ou granulomas.

A histologia mostrava permanência do implante na prega vocal, presença de processo inflamatório discreto, com raras células gigantes ao redor da HA de um dos animais (cão número 18). O animal número 16 não apresentava células gigantes, e não se observava a presença de células inflamatórias agudas. Observou-se, em ambos os animais, a formação de cápsula fibrosa isolando o implante do tecido muscular. Não houve sinais de reação de corpo estranho ou granulomas.(Figura 13)

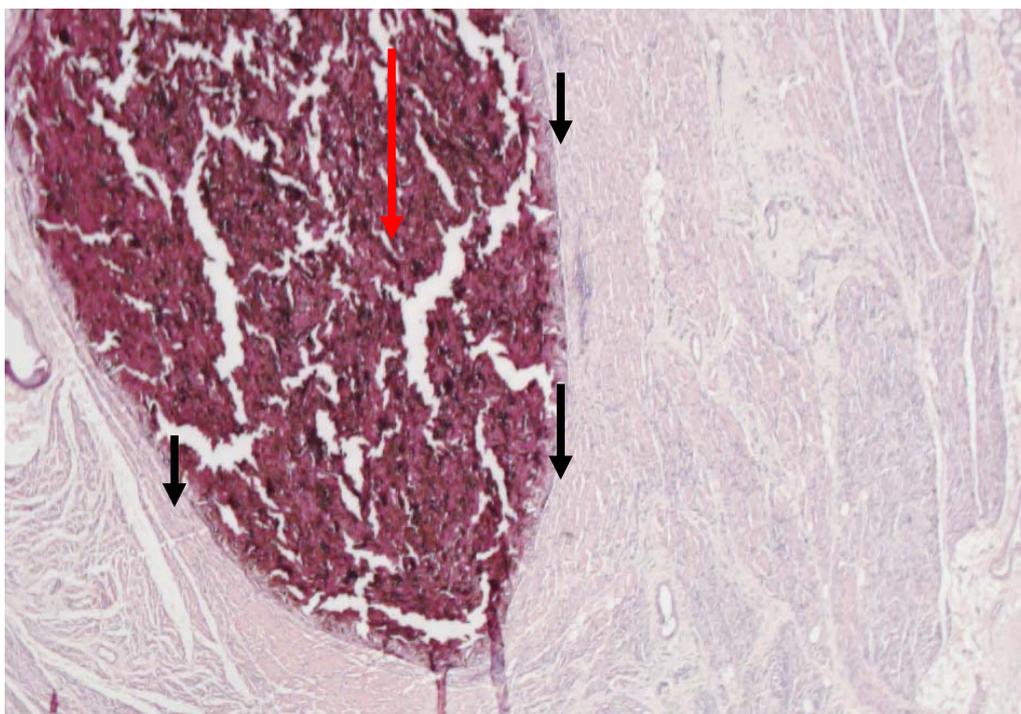


Figura 13- Prega vocal após 6 meses da injeção de hidroxiapatita. Observa-se a permanência do implante, sem disseminação da hidroxiapatita pelos tecidos cervicais (seta vermelha). Ausência de resposta inflamatória importante. Formação de cápsula fibrosa (setas pretas).(Aumento 20X)

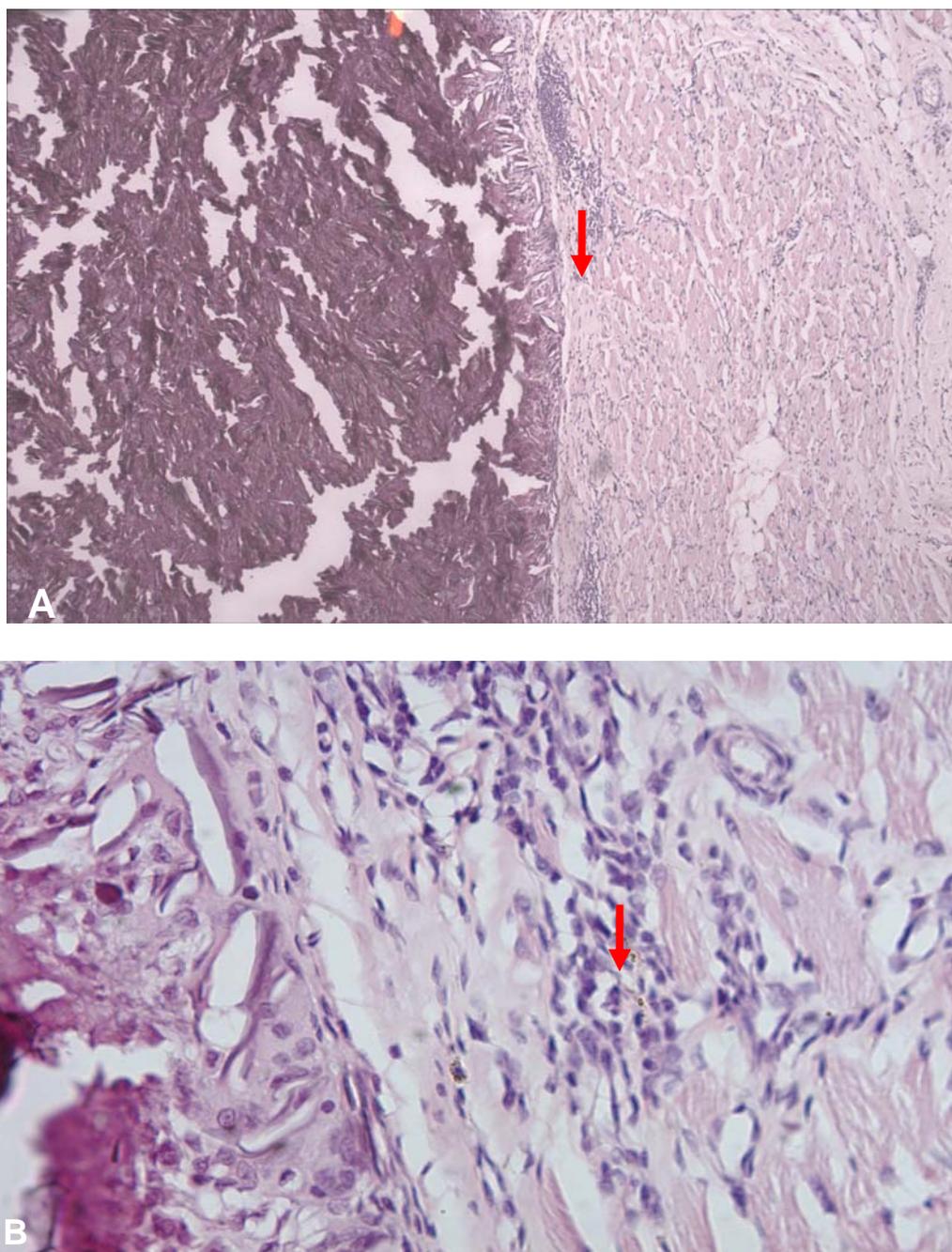


Figura 14- Prega vocal após 6 meses da injeção de hidroxiapatita. **A-** Detalhe do implante em relação ao tecido muscular. Notar a nítida separação entre ambos (seta vermelha) (Aumento 40X). **B-** Detalhe da transição entre a hidroxiapatita e tecido muscular, presença de célula gigante (seta vermelha). (Aumento de 400 X)

DISCUSSÃO

O cachorro tem sido utilizado em pesquisas de implantes laríngeos devido a sua anatomia semelhante à laringe humana, além de tolerar bem a cirurgia e permitir sobrevida suficiente para avaliações a longo prazo.

Não existe um período ideal de observação para o uso de implantes, visto que há relatos de granulomas induzidos por Teflon anos após a sua injeção (POHRIS & KLEINSASSER, 1987). Porém vários trabalhos realizados *post-mortem* em pacientes que haviam recebido injeção de Teflon, mostraram que em todos os casos ocorria algum grau de formação de reação de corpo estranho, com grande número de células gigantes, independentemente do tempo decorrido da cirurgia (HARRIS & HAWK, 1969; STONE et al., 1970; SCHMIDT et al., 1980).

Dedo & Carlsoo (1982) avaliaram o implante de Teflon removido de pacientes que não apresentaram melhora da voz após a cirurgia. O período entre a injeção e a análise variou de quatro semanas a 16 anos e observou-se que em um mês havia intenso infiltrado inflamatório com histiócitos e linfócitos. Logo após o terceiro mês, em todos os pacientes, viu-se que as micropartículas de Teflon ficavam isoladas e circundadas por tecido denso de colágeno e grande número de células gigantes, sugerindo que a reação ocorre inicialmente quando a substância não é biocompatível.

É opinião de alguns autores que um material, quando não apresenta biocompatibilidade, pode induzir reação de corpo estranho precoce (HILL, 1991). O período de observação de 24 horas e 14 dias, foi utilizado para avaliar a resposta inflamatória inicial às substâncias implantadas. O período de seis meses usado neste

experimento teve o intuito de observar o comportamento biológico do implante, possível formação de granulomas e também a sua viabilidade.

O látex já vem sendo utilizado em vários experimentos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo mostrando a sua compatibilidade com tecido animal. Em 2001, Mruè utilizou a biomembrana para a correção de defeitos esofágicos parciais e totais em cães. Este estudo demonstrou que o látex apresenta alta capacidade para induzir angiogênese, permitindo maior adesão celular e reparação tecidual mais rápida.

Freitas (2001), realizou estudo substituindo artéria femoral de cães por uma prótese confeccionada com a biomembrana de látex. Ele observou neoformação endotelial na íntima da prótese, com grande compatibilidade com o tecido vascular. Não ocorreu formação de tecido de granulação, extrusão do implante ou trombose.

Sader, em 2001, realizou experimento onde o pericárdio de cães era removido e parcialmente substituído pela biomembrana de látex. Os resultados histológicos mostraram ausência de reação granulomatosa e regeneração pericárdica, com manutenção da membrana em sua posição original.

Mente em 2002 utilizou a biomembrana para encapsulamento de ilhotas de pâncreas que seriam submetidas a transplante. Apesar de serem implantadas no pâncreas de cães, não houve formação de granuloma de células gigantes, rejeição ou sinais de deterioração do látex. Observou-se formação de cápsula fibrosa, com grande número de vasos, permitindo a viabilidade do enxerto inserido no interior do implante de látex.

Em estudo piloto realizado previamente ao presente experimento, o látex na sua forma líquida, foi injetado no subcutâneo de ratos para avaliar se ocorreria a sua disseminação pelos tecidos. Após a injeção, observou-se que a polimerização ocorria em alguns minutos e ele mantinha a sua posição. Porém, no presente estudo, o látex não

manteve a sua posição de injeção, ocorrendo migração da substância através das fibras musculares e tecidos circundantes do pescoço.

A migração pode ter ocorrido devido ao tamanho das partículas do látex. Se elas forem muito pequenas, podem ter passado facilmente através das fibras musculares. No estudo piloto mencionado, a disseminação não ocorreu, pois a injeção ocorreu sobre a fáscia que recobre a musculatura dorsal do rato. Provavelmente, a fáscia muscular foi a responsável pela manutenção da substância na sua posição, não permitindo a sua passagem para tecidos mais profundos.

Após seis meses de observação, os animais que tiveram o látex como substância injetada, apresentaram piora no padrão da voz, com latido baixo, de pouco volume. A laringoscopia direta mostrou que a medialização alcançada com a cirurgia não se mantinha, e os animais apresentavam prega vocal atrofiada. A histologia confirmou o achado clínico, mostrando a total absorção do implante e atrofia muscular.

Apesar de vários estudos realizados com o látex terem demonstrado a sua efetividade, em todos eles foi utilizada a biomembrana já em sua forma sólida, polimerizada (in vitro) através de aquecimento prévio, o que pode ter-lhe conferido maior resistência à absorção. Provavelmente, através da injeção na forma líquida, com o processo de polimerização ocorrendo in vivo, o látex não consiga alcançar a resistência e as propriedades observadas com a forma sólida.

A antigenicidade relacionada ao látex poderia ser um problema para seu uso em humanos. Holmes (1994) associou a alergia com a necessidade de pré-sensibilização e Slater et al. (1996) postulou que a alergia ao látex viria das proteínas presentes no composto, aos aditivos usados na fabricação e ao talco usado para finalizar o produto. Ownby (1996) realizou estudo populacional, em doadores de sangue, e encontrou reações a anticorpos contra o látex em 6,4 % dos pacientes analisados.

Não foi observada nenhuma reação alérgica, seja imediata ou tardia, nos animais utilizados neste experimento. Nos estudos prévios, onde o látex foi utilizado, não há menção a qualquer tipo de reação alérgica.

Freitas (2001) postulou que o látex normalmente utilizado para a confecção da biomembrana passa por vários processos de modificação em seu processo de fabricação, como: centrifugação para isolar proteínas de maior peso molecular, utilização apenas de aditivos essenciais ao composto, vulcanização a baixas temperaturas e ausência de talco. Estas medidas poderiam diminuir a antigenicidade do látex ao hospedeiro.

Porém, estudos recentes realizados com látex natural da árvore *Hevea brasiliensis*, adicionado somente de amônia e sem talco, mostram prevalência de reação tardia (Hipersensibilidade do tipo IV), com prick-test, de 1,2 a 1,9% . Estes mesmos estudos mostram ainda uma possível sensibilização e indução de reação de hipersensibilidade do tipo I nestes pacientes. (GUILLET et al., 2005; SOMMER et al., 2002). Mostrando que, mesmo com todo o processo de preparo, ainda existe um risco pequeno de desenvolvimento de reações alérgicas, que deve ser levado em conta no seu uso em humanos.

A substância ideal para a injeção deve ser biocompatível, inabsorvível, não reativa, não volátil, não carcinogênica, facilmente injetável, de baixo custo, fácil aquisição e que mantenha seu volume e posição após a injeção, sem disseminação para tecidos circundantes.(KARPENKO et al, 2003; KNOW & BUCKMIRE, 2004; CHHETRI et al., 2004).

O látex na sua forma líquida apresentou disseminação através das fibras musculares, não mantendo sua posição de injeção, além de apresentar reabsorção total em menos de seis meses. Estas observações descaracterizam-no como uma opção para a injeção na laringe.

Alguns autores têm utilizado substâncias implantadas no músculo tireoaritenóideo, como alternativa para medialização. Nesses procedimentos, é realizada uma incisão lateral à prega vocal, e a substância, que pode ser gordura ou fáscia, é implantada em bloco no interior da prega vocal (TSUNODA et al, 1999; TSUNODA et al., 2001; TUCKER, 2001). O intuito dessa técnica é não macerar o enxerto, para que não haja destruição de sua arquitetura celular, o que poderia aumentar a sua longevidade (NISHIYAMA et al., 2006). Uma alternativa, para experimentos futuros, seria utilizar a biomembrana de látex, já na sua forma sólida, para implante no tecido muscular.

A HA tem-se mostrado bastante segura quanto a sua biocompatibilidade e atoxicidade, principalmente em estudos envolvendo regeneração óssea e de dentes, observando-se que o implante gera a formação de fibrose semelhante à observada em feridas cirúrgicas, sem a ocorrência de granulomas. Na laringe já vem sendo utilizada em implantes para cirurgias de tireoplastia, com bons resultados, e nenhuma reação nos pacientes que o receberam (CUMMINGS et al., 1993).

Flint et al. (1997) realizaram estudo histológico em coelhos, mostrando a reação tecidual da laringe ao implante de HA. Neste estudo foi utilizado HA cerâmica porosa, e observou-se boa aceitação do implante após um ano, com formação de cápsula fibrosa ao seu redor e até neoformação óssea, sem a ocorrência de granuloma.

Stein et al. (2000) fizeram uso de cimento de HA para medialização de pregas vocais em cães, e observaram que a substância mantinha o seu sítio de injeção e não migrava para tecidos circundantes na laringe, nem havia disseminação linfática. O processo inflamatório observado foi considerado moderado inicialmente, e após seis meses havia sinais de inflamação crônica leve, com formação de cápsula fibrosa e ausência de granuloma. O material injetado apresentava um aspecto cristalino e em algumas áreas havia metaplasia óssea.

Chhetri et al. (2004) em estudo histológico em cães, observaram que a HA, também mantinha seu local de injeção, não se disseminando pelos tecidos laríngeos. Houve reabsorção discreta do implante, e neste estudo observou-se a formação de poucas células gigantes, sem evidência de formação de granuloma.

Belafsky & Postma (2004) realizaram análise histológica em uma paciente que havia tido HA injetada na laringe e que faleceu três meses após, devido a carcinoma metastático. O tecido revelava partículas de HA, com inflamação mínima, e alguns macrófagos as cercando, sem formação de reação de corpo estranho.

O resultado do presente estudo é semelhante ao encontrado na literatura para injeções na região laríngea. A HA manteve o seu sítio inicial de injeção, produzindo inflamação intensa do hospedeiro nas primeiras horas e que gradativamente ao longo do tempo foi declinando, até que em seis meses, não se observava resposta inflamatória importante, nem reação granulomatosa, ocorrendo somente formação de raras células gigantes em um dos animais, assim como observado por Chhetri et al. (2004). A presença de raras células gigantes ao redor de implantes e enxertos, já vem sendo observado por alguns autores, com diversos materiais. Hill et al. (1991), observaram a presença de formação de células gigantes ao redor do enxerto de gordura injetada na laringe de cães, responsabilizando a presença desta atividade inflamatória, na sua reabsorção.

Já Staskowski et al (1998) observaram a presença de raras células gigantes ao redor do colágeno injetado em pregas vocais caninas. Reijonen et al (2001), avaliaram laringe de cães após a injeção de fásia, e à histologia, foi observado a presença de raras células gigantes. Ambos os autores responsabilizaram a contaminação do enxerto com corpos estranhos, pela formação dessas células gigantes. No primeiro trabalho, postulou-se que pêlos oriundos da derme do animal, utilizada para a confecção do auto-

colágeno, poderiam ter provocado tal resposta inflamatória. Já o segundo trabalho responsabiliza partículas de plástico, das placas usadas para cortar a fáscia, como a causadora da reação de corpo estranho. Talvez a presença de raras células gigantes, observadas no presente estudo em um dos animais, pode ter ocorrido devido à contaminação do material utilizado, já que o processo inflamatório é bem localizado.

O implante se encontrava acelular e tinha aspecto cristalino semelhante ao observado por Stein (STEIN et al., 2000). Não houve reabsorção do implante, já que os cães mantinham a correta medialização da prega vocal paralisada e o estudo histológico mostrou a permanência da HA na prega vocal após seis meses.

Cimento de HA porosa, quando em contato com tecido ósseo, serve como um anteparo e com o passar do tempo permite o crescimento de osso novo no seu interior, enquanto vai sendo reabsorvida (BOYDE et al., 1999, BUCHOLZ et al., 1987, CHIROFF et al., 1975, VOOR et al., 2004). Porém, muito se discute sobre a capacidade da HA em induzir a formação de osso em tecidos moles. Os resultados ainda são bastante controversos, uma vez que há trabalhos que demonstram que o uso de HA porosa permitiu a neoformação óssea em alguns animais, tais como cão, cabra e macacos, enquanto que, em ratos não foi observada nenhuma formação de osso (KLEIN et al., 1994, RIPAMONTI et al., 1999). Para Gosain (2005), a neoformação óssea depende da espécie e do tipo de HA utilizada, visto que os animais que tiveram HA não-porosa implantada em tecido mole, não apresentaram sinais de crescimento ósseo.

Não foi observado neste estudo qualquer sinal de neoformação ou metaplasia óssea. A transformação de HA, inserida em tecido muscular, em osso apresenta dois aspectos importantes. Por um lado, a substituição dos cristais por tecido vivo, permitiria maior chance de viabilidade do implante, não permitindo reabsorção ou inflamação, já que o mesmo daria lugar a tecido do próprio hospedeiro.

Porém se o implante se tornar duro demais, ou se injetado muito superficial, poderia atrapalhar o sistema vibratório da prega vocal. Uma das características que desabilitaram o uso do Teflon® na prega vocal foi que, em alguns casos, provocava rigidez importante, não permitindo sua vibração adequada. Isto levava a voz rouca e áspera, com insatisfação do paciente, apesar de correta medialização observada à videolaringoscopia. O uso exclusivo da injeção em camadas profundas, como o músculo Tireoaritenoideo, pode minimizar ou afastar este risco (STEIN ET AL, 2000; CANTARELLA et al., 2005). Todavia, o uso em camadas superficiais, como lâmina própria, pode não ser indicado.

Rosen (2004) publicou trabalho mostrando a sua experiência com injeção de HA em laringe de humanos para correção de insuficiência glótica. Apesar da amostra ser pequena (5 pessoas), os resultados foram favoráveis. Além de todos os pacientes apresentarem melhora subjetiva, quatro apresentaram melhora objetiva nos parâmetros aerodinâmicos.

Mais importante, é que todos os pacientes apresentaram melhora dos parâmetros à estroboscopia, sem sinais de rigidez ou migração do material. Um dos pacientes apresentou pequena reabsorção e novo procedimento foi realizado.

Lee et al., (2004) utilizaram HA para correção de insuficiência glótica em pacientes submetidos a laringectomia parcial com aritenoidectomia. Apesar da amostra ser pequena (somente quatro pacientes), houve bons resultados e não sendo necessária nova cirurgia. O implante não mostrou sinais de reabsorção, até onze meses após o procedimento.

Belafsky & Postma (2004) relataram injeção de HA em 23 pacientes, com melhora em 22. Observou-se reabsorção do implante em dois casos, sendo necessária nova injeção para alcançar os resultados iniciais. Os autores desse trabalho, assim como

Rosen, concluíram que devido à reabsorção observada, a hipercorreção está indicada, sendo necessário injetar cerca de 10 a 15% do volume para correta medialização da prega vocal e estabilização do implante.

Esta hipercorreção talvez tenha sido necessária devido ao tipo de HA usada nestes pacientes. Enquanto que no presente estudo utilizou-se HA em pó que posteriormente seria submetida à solução salina para a formação de pasta, basicamente formada de cristais de cálcio e fosfato. Os estudos de Rosen (2004) e Belafsty & Postma (2004) usaram uma nova preparação, já pronta para injeção, da empresa BioForm®, denominado Radiance FN®. Este implante consiste em microesferas de HA, com cerca de 38 a 63 µm de tamanho, inseridas numa base de gel aquoso que corresponde a 45% da massa. Este produto já vem dentro da seringa, pronta para injeção (HUBBARD, 2003; TZIKAS, 2004). Este tipo de material permite o manuseio mais fácil da HA, porém, pode ser responsabilizada pela maior absorção observada, já que boa parte do injetado consiste em meio aquoso que poderá ser absorvido.

A HA é biocompatível, não é tóxica, não é volátil, mantém seu volume e posição de injeção, é facilmente injetável e com custo acessível. Estes requisitos a candidatam a ser considerada uma possível substância ideal. Para confirmar a melhora dos pacientes, sem causar alterações a longo prazo, novos estudos prospectivos e por longo período deverão ser realizados, para confirmar a efetividade desse material na laringe.

CONCLUSÃO

- 1- O látex não se manteve no sítio de injeção, apresentou resposta inflamatória intensa, foi reabsorvido e se disseminou pelos tecidos cervicais, o que o desabilita a ser considerado uma opção de substância para injeção na laringe.
- 2- A HA manteve-se no sítio de injeção, não se disseminou pelos tecidos cervicais, não mostrou sinais de reabsorção importante, além de mostrar resposta inflamatória importante inicial, que declinou ao longo do tempo, sem induzir reação de corpo estranho. Estas características a candidatam a ser considerada a substância ideal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M.T.; GONEN, M.; KRAUS, D.H. Complications of type I thyroplasty and arytenoid adduction. *Laryngoscope*, v.111: p.1322-1329, 2001.

ANDERSON, T.D.; MIRZA, N. Immediate percutaneous medialization for acute vocal fold immobility with aspiration. *Laryngoscope*, v.111: p.1318-1321, 2001.

ARNOLD, G.E. Vocal fold rehabilitation of paralytic dysphonia, IX: technique of intracordal injection. *Arch Otolaryngol*, v.85: p.358-368, 1962.

ARNOLD, G.E. Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia: cartilage injection into a paralysed vocal cord. *Arch Otolaryngol*, v.62: p.1-17, 1955.

BELAFSKY, P.C.; POSTMA, G.N. Vocal fold augmentation with calcium hydroxyapatite. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.131: p.351-354, 2004.

BILLANTE, C.R.; CLARY, J.; SULLIVAN, C.; NETTERVILLE, J.L. Voice outcome following thyroplasty in patients with longstanding vocal fold immobility. *Auris Nasus Larynx*, v.29(4): p.341-345, 2002.

BORZACCHIELLO, A.; MAYOL, O.; GARSKOG, A.; DAHLVIST, A.; AMBROSIO, L. Evaluation of injection augmentation treatment of hyaluronic acid based materials on rabbit vocal folds viscoelasticity. *J Mater Sci Mater Med*, v. 16(6): p. 553-557, 2005.

BOYDE, A.; CORSI, A.; QUARTO, R.; CANCEDDA, R.; BIANCO, P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*, v.6: p. 579-589, 1999.

BRASIL, O.O.C.; BIASE, N.; BEHLAU, M.; MELO, E.C.M. Paralisias Laríngeas. In: *Tratado de Otorrinolaringologia*, v.4. São Paulo: Roca, 2002. p. 477-493.

BRUNINGS, J. Uber eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslahmung. *Verhandl Ver Dtsch Laryngol*, v.18: p. 93-151, 1911.

BUCHOLZ, R.W.; CARLTON, A.; HOLMES, R.E. Hydroxyapatite and calcium phosphate bone graft substitute. *Orthop Clin North Am*, v.18: p.323-330, 1987.

BUTLER, J.E.; HAMMOND, T.H.; GRAY, S.D. Gender related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope*, v.111: p.907-911, 2001.

CANTARELLA, G.; MAZZOLA, R.F.; DOMENICHINI, E.; ARNONE, F.; MARASCHI, B. Vocal fold augmentation by autologous fat injection with lipostructure procedure. *Otolaryngol head Neck Surgery*, v. 132: p. 239-243, 2005.

CHAN, RW; TITZE, IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope*, v.108(5): p.725-731, 1998.

CHHETRI, D.K.; JAHAN-PARWAR, B.; HART, S.D.; BHUTA, S.M. ; BERKE, G.S. Injection laryngoplasty with calcium hydroxyapatite gel implant in an vivo canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.113: p.259-264, 2004.

CHIROFF, R.; WHITE, E.; WEBER, J. Tissue ingrowth of Replamineform implants. *J Biomed Mater Res*, v. 6: p.29-34, 1975.

CHRISTODOULOU, A.; PLOUMIS, A.; TERZIDIS, I.; POURNARAS, I. Vertebral body reconstruction with injectable hydroxyapatite cement for the management of unstable thoracolumbar burst fractures: a preliminary report. *Acta Orthop Bel*, v. 71(5): p.597-603, 2005.

CHU, P.Y.; CHANG, S.Y. Transoral teflon injection under flexible laryngovideostroboscopy for unilateral vocal fols paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.106: p.783-786, 1997.

CONSTANTINO, P.D.; FRIEDMAN, C.D.; JONES, K.; CHOW, L.C.; PELZER, H.J.; SISSON, G.A. Hydroxyapatite cement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v.117: p.379-384, 1991.

COTTER, C.S.; AVIDANO, M.A.; CRARY, M.A.; CASSINI, N.J.; GORHAM, M.M. Laryngeal complications after type I thyroplasty. *Otololaryngol Head Neck Surgery*, v.113(6): p.671-673, 1995.

COUREY, M.S. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope*, v.111: p.747-758, 2001.

CUMMINGS, C.W., PURCELL, L.L., FLINT, P.W. Hydroxylapatite laryngeal implants for medialization. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.102: p.843-851, 1993.

DAMROSE, E.J.; BERKE, G.S. Advances in the management of glottic insufficiency. *Curr Opin gol Head Neck Surgery*, v.11: p. 480-484, 2003.

DEDO, H.H.; CARLSOO, B. Histologic evaluation of teflon granulomas of human vocal cords. A light and eletron microscopy study. *Acta Otolaryngol*, v. 93(5-6): p.475-484, 1982.

DOUSARY, S. Vocal process granuloma. *Ear Nose Throat J*, v. 76(6): p.382-386, 1997.

DUKE, S.G.; SALMON, J.; BLALOCK, D.; POSTMA, G.N. Fascia augmentation of the vocal fold: Graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope*, v.111: p.759-764, 2001.

DULGUEROV, P.; SCHWEIZER, V.; CAUMEL, I.; ESTEVE, F. Medialization larybgoplasty. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.120: p.275-280, 1999.

ELLIS, J.C.; McCAFFREY, T.V.; DeSANTO, L.W.; REIMAN, H.V. Migration of Teflon after vocal cord injection. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v. 96: p.63-66, 1987.

FERNANDES-ACENERO, M.J.; ZAMORA, E.; BORBUJO, J. Granulomatous foreign body reaction against hyaluronic acid: a report of a case after pil augmentation. *Dermatol Surg*, v. 29: p.1225-1226, 2003.

FLINT, P.W.; CORIO, R.L.; CUMMINGS, C.W. Comparasion of soft tissue response in rabbits following laryngeal implantation with hydroxylapatite, silicone rubber and teflon. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.106: p.399-407, 1997.

FORD, C.N.; BLESS, D.M.; LOFTUS, J.M. Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: A study of 119 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.101: p.237-247, 1992.

FORD, C.N.; MARTIN, D.W.; WARNER, T.F. Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. *Laryngoscope*, v. 94: p.513-518, 1984.

FORD, C.N.; STASKOWSKI, P.A.; BLESS, D.M. Autologous collagen vocal fold injection: A preliminary clinical study, v. 105: p.944-948, 1995.

FREITAS, M.A.S. Avaliação da prótese de látex natural como remendo em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães. Ribeirão Preto, 2001, 89p. Tese de Doutorado em Cirurgia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FUKASE, Y.; TAGAKI, S., EANES, E.D; CHOW, L.C.; BROWN W.E. Setting reaction and compressive strength of calcium phosphate cement. *J Dent Res*, v. 69(12):, p.1852-1856, 1990.

GLATZ, F.R.; KALKANIS, J.; NEUMEISTER, M.; SUCHY, H.; LYONS, S.; MOWLAWI, A. Volume analysis of preadipocyte injection for vocal fold medialization. *Laryngoscope*, v.113: p.1113-1117, 2003.

GOSAIN, A.K.; RIORDAN, P.A.; LIANSHENG, S.; AMARANTE, M.T.; KALANTARIAN, B.; NAGY, P.G.; WILSON, C.R.; TOTH, J.M.; McINTYRE, B.L. A 1-year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in a adult sheep model: III. Comparasion with Autogenenous bone graft for facial audmentation. *Plast Reconstr Surg*, v. 116: p.1044-1052, 2005.

HARRIS, H.E.; HAWK, W.A. Laryngeal injection of the Teflon paste. Report of a case with postmortem study of the larynx. *Arch Otolaryngol*, v. 90: p.194-197, 1969.

HERTEGARD, S.; HALLÉN, L.; LAURENT, C.; LINDSTRÖM, E.; OLOFSSON, K.; TESTAD, P.; DAHLQVIST, A. Cross-linked Hyaluran versus collagen for injection treatment of glotal insufficiency: 2-year follow-up. *Acta Otolaryngol*, v. 124: p.1208-1214, 2004.

HERTEGARD, S; LAURENT, C.; OLOFSSON, K.; LINDSTRÖM, E.; HALLÉN, L.; TESTAD, P.; DAHLQVIST, A. Cross-linked hyaluron used as augmentation substance

for treatment of glottal insufficiency: safety aspects and vocal fold function. *Laryngoscope*, v. 102: p.2211-2219, 2002.

HILL, D.P.; MEYERS, A.D.; HARRIS, J. Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.101: p.344-348, 1991.

HOLMES, R.E. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg*, v.63: p.626-633, 1979.

HUBBARD, W. Bioform implants: Durability, tissue infiltration, biocompatibility and evaluation of migration potencial. *Bioform report*, 2003.

ISSHIKI, N. Progress in laryngeal framework surgery. *Acta Otolaryngol*, v.120(2): p.120-127, 2000. Review.

ISSHIKI, N.; MORITA, H.; OKAMURA, H.; HIRAMOTO, M. Thyroplasty as a new phonosurgical technique. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, v.78: p.451-457, 1974.

KARPENKO, A.N.; DWORKIN, J.P.; MELECA, R.J.; STACHLER, R.J. Cymetra injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.112: p.927-934, 2003.

KENT, J.N.; ZIDE, M.F., KAY, J.F. Hydroxyapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognatic and reconstructive surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, v.44: p.597-605, 1986.

KLEIN, C.; GROOT, K.; CHEN, W.; YUBAO, L.; XINGDONG, Z. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. *Biomaterials*, v. 15(1): p.31-34, 1994.

KWON, T.K; BUCKMIRE, R. Injection laryngoplasty for management of unilateral vocal fold paralysis. *Curr Opin gol Head Neck Surgery*, v. 12: p. 538-542, 2000.

LACCOURREYE, O.; HANS, S. Endolaryngeal extrusion of expanded polytetrafluoroethylene implant after medialization thyroplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.112: p. 962-964, 2003.

LACCOURREYE, O.; PAPON, J.F.; KANIA, R.; CREVIER-BUCHMAN, L.; BRASNU, D.; HANS, S. Intracordal injection of autologous fat in patients with unilateral laryngeal nerve paralysis: long-term results from the patient's perspective. *Laryngoscope*, v. 113: p.541-545, 2003.

LAPCIK, L. DeSMEDT, S.; DEMESTER, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chem Rev*, v.98: p.2663-2684, 1998.

LAURENT, T. Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)*, v.442: p.4-24, 1987.

LEE, B.; WOO, P. Use of injectable hydroxyapatite in the secondary setting to restore glottic competence after partial laryngectomy with arytenoidectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.113: p.618-622, 2004.

MANNA, F.; DENTINI, M.; DESIDERI, P., DePITA, O.; MORTILLA, E.; MARAS, B. Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (hylaform from rooster combs and restylane from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v.13: p.183-192, 1999.

McCULLOCH, T.M.; ANDREWS, B.T.; HOFFMAN, H.T.; GRAHAM, S.M.; KARNELL, M.P.; MINNICK, C. Long-term follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*, v.112: p.1235-1238, 2002.

MENTE, E.D. Desenvolvimento de protótipo de dispositivo para microencapsulamento de ilhotas pancreáticas a partir de biomembranas de látex natural. Tese de Doutorado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MIKAELIAN, D.O.; LOWRY, L.D.; SATALOFF, R.T. Lipoinjection for unilateral vocal fold paralysis. *Laryngoscope*, v.101: p.465-468, 1991.

MIKUS, J.L.; KOUFMAN, J.A.; KILPATRICK, S.E. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.105: p.17-22, 1995.

MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Ribeirão Preto, 2000. 112p. Tese de Doutorado em Cirurgia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MRUÉ, F. Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães. Ribeirão Preto, 1996, 114p. Dissertação de Mestrado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

NISHIYAMA, K.; HIROSE, H.; MASAKI, T.; NAGAI, H.; HASHIMOTO, D.; USUI, D.; YAO, K.; TSUNODA, K.; OKAMOTO, M. Long-term result of the new endoscopic vocal fold medialization surgical technique for laryngeal palsy. *Laryngoscope*, v.116(2): p.231-234, 2006.

OLIVEIRA, J.A.A.; HYPPOLITO, M.A.; COUTINHO-NETTO, J. La regeneration du tympan avec l'utilisation de matériel biosynthétique nouveau. In: CONGRES FRANÇAIS D'OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE ET DE CHIRURGIE DE LA FACE ET DU COU, 106, 1999, Paris. *Annais du Congres*. Paris: 1999. p.273

OOMS, E.M.; WOLKE, J.G.C.; Van de HEUVEL, M.T.; JESCHKE, B.; JANSEN, J.A. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials*, v. 24: p. 989-1000, 2003.

PEARL, A.W.; WOO, P.; OSTROWSKI, R.; MOJICA, J.; MANDELL, D.L.; COSTANTINO, P. A preliminary report on micronized alloderm injection laryngoplasty. *Laryngoscope*, v.112: p.990-996, 2002.

PIECUCH, J.F.; FERDONKA, N.J. Results of soft-tissue surgery over implanted replateform hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*, v.41: p.801-806, 1983.

POHRIS, E.; KLEINSASSER, O. Stenosis of the larynx following teflon injection. *Arch Otorhinolaryngol*, v.244: p.44-48, 1987.

REIJONEN, P.; LEIVO, I.; NEVALAINEN, T.; RIIKANEN, H. Histology of injected autologous fascia in the paralysed canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.111: p.1068-1074, 2001.

REIJONEN, P.; LEHIKONEN-SÖDERLUND, S.; RIIKANEN, H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.111: p.523-529, 2002.

REMACLE, M.; LAWSON, G.; HEDAYAT, A.; TRUSSART, T.; JAMART, J. Medialization framework surgery for voice improvement after endoscopic cordectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, v.258(6): p.267-271, 2001.

REMACLE, M.; LAWSON, G.; KEGHIAN, J.; JAMART, J. Use of injectable autologous collagen for correcting glottic gaps: Initial results. *J Voice*, v.13(2): p.280-288, 1999.

RIHKANEN, H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope*, v.108: p.51-54, 1998.

RODGERS, B.J.; ABDUL-KARIM, F.W.; STRAUSS, M. Histological study of injected autologous fascia in the paralysed canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.110: p.2012-2015, 2000.

RONDINI-GILLI, E.; GRAYELI, A.B.; BORGES CROSSARA, P.F.; EL GAREM, H.; MOSNIER, I.; BOUCCARA, D.; STERKERS, O. Ossiculoplasty with total hydroxyapatite prostheses anatomical and functional outcomes. *Otol Neurotol*, v.24(4): p.543-547, 2003.

ROSEN, C.A. Phonosurgical vocal fold injection. *Otolaryngol Clin North Am*, v.33(5): p.1087-1096, 2000.

ROSEN, C.A.; THEKDI, A.A. Vocal fold augmentation with injectable calcium hydroxylapatite: Short-Term results. *J Voice*, v.18(3): p. 387-391, 2004.

RUPPRECHT, R.D.; HORNING, G.M.; TOWLE, H.J. A clinical evaluation of the treatment of class III furcation defects. *J Periodontol*, v.72(10): p.1443-1450, 2001.

SACCOGNA, P.W.; WERNING, J.W.; SETRAKIAN, S.; STRAUSS, M. Lipoinjection in the paralysed feline vocal fold: Study of graft survival. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.117: p.465-470, 1997.

SADER, S.L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETTO, J.; MAZZETO, S.A.; ALVES, J.R.; VANNI, J.C.; SADER, A.A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, v.15(4): p. 338-344, 2000.

SCHMIDT, P.J.; WAGENFELD, D.; BRIDGER, M.W.M.; Van NOSTRAND, A.W.P.; BRIANT, T.D.R. Teflon injection of the vocal cord: a clinical and histopathologic study. *J Otolaryngol*, v.9: p.297-302, 1980.

SHARMA, R.K. Marriage of autogenous bone and hydroxyapatite cement for reconstruction of frontal bone defect. *Plast Reconstr Surg*, v.116(5): p.1568-1569, 2005.

SHAW, G.Y.; SZEWCZYK, M.A.; SEARLE, J.; WOODROOF, J. Autologous fat injection into the vocal folds: Technical considerations and long-term follow-up. *Laryngoscope*, v.107: p.177-186, 1997.

SHINDO, M.L.; ZARETSKY, L.S.; RICE, D.H. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.105: p.602-606, 1996.

SLATER, J.E.; VEDVICK, T.; ARTHUR-SMITH, A.; TRYBUL, D.E.; KEKWICH, R.G. Identification cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem*, v.271(41): p,25394-25399, 1996.

SPECTOR, B.C.; NETTERVILLE, J.L.; BILLANTE, C.; CLARY, J.; REINISCH, L.; SMITH, T.L. Quality-of-life assessment in patients with unilateral vocal fold paralysis. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.125(3): p.176-182, 2001.

STASKOWSKI, P.A.; FORD, C.A.; INAGI, K. The histologic fate of autologous collagen injected into the canine vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.118: p. 187-190, 1998.

STEIN, J.; ELIACHAR, I.; MYLES, J.; MUNOZ-RAMIREZ, H.; STROME, M. Histopathologic study of alternative substance for vocal fold medialization. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.109(2): p.221-6, 2000.

STONE, J.W.; ARNOLD, G.E.; STEPHENS, C.B. Intracordal polytef (Teflon) injection. Histologic study of three further cases. *Arch Otolaryngol*, v.91: p.568-574, 1970.

THOMAZINI, J.A. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. *Acta Microsc*, v. 6: p. 798-799, 1997.

TRASK, D.K.; SHELLENBERGER, L.; HOFFMAN, H.T. Transnasal, endoscopy vocal fold augmentation. *Laryngoscope*, v.115: p.2262-2265.

TSUNODA, K.; BAER, T.; NIIMI, S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: Long-term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*, v.111: p.453-457, 2001.

TSUNODA, K.; TAKANOSAWA, M.; NIIMI, S. Autologous transplantation of Fascia into the vocal fold: A new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*, v.109: p.504-508, 1999.

TUCKER, H.M. Direct autogenous fat implantation for augmentation of the vocal folds. *J Voice*, v. 15(4): p.565-569, 2001.

TZIKAS, TL. Evaluation of the Radiance FN soft tissue filler for facial soft tissue augmentation. *Arch Facial Plast Surg*, v.6(4): p.234-239, 2004.

VAN BLITTERSWIJK, C.A.; GROTE, J.J. Biocompatibility of clinically applied hydroxylapatite ceramic. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.144: p.3-11, 1990.

VARVARES, M.A.; MONTGOMERY, W.W.; HILLMAN, R.E. Teflon granuloma of the larynx: Etiology, pathophysiology, and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.104: p.511-515, 1995.

VERRET, J.D.; DUCIC, Y.; OXFORD, L.; SMITH, J. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, v.133(6): p.897-899, 2005.

VOOR, M.J.; ARTS, J.J.C. ; KLEIN, S.A.; WALSCHOT, L.H.B.; VERDONSCHOT, N.; BUMA, P. Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* , v. 71B: p. 398-407, 2004.

WATTERSON, T.; McFARLANE, S.; MENICUCCI, A. Vibratory characteristics of Teflon-injected and noninjected paralysed vocal folds. *J Speech Hear Disord*, v.55: p.61-66, 1990.

WENIG, B.M.; HEFFNER, D.K.; JOHNSON, F.B. Teflonomas of the larynx and neck. *Hum Pathol*, v.21: p.617-623, 1990.

ZARETSKY, L.S.; SHINDO, M.L.; DETAR, M.; RICE, D.H. Autologous fat injection for vocal fold paralysis: Long-term histologic evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v. 104: p.1-4, 1995.

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 054/2005, sobre o projeto intitulado “*Análise histológica da injeção de látex e hidroxiapatita em pregas vocais – estudo experimental em cães*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **13 de fevereiro de 2006**.

(We certify that the protocol n° 054/2005, about “*Histopathologic study of injection of latex and hydroxyapatite in canine vocal folds (experimental study in dogs)*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **02/13/2006** meeting).

Ribeirão Preto, 16 de fevereiro de 2006.


Profa. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)