

FLÁVIA COELHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL AO IMPLANTE DE CELULOSE
BACTERIANA EM COELHOS. ESTUDOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde

SÃO PAULO

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIA COELHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL AO IMPLANTE DE CELULOSE
BACTERIANA EM COELHOS. ESTUDOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carmen Lucia Penteado
Lancellotte

SÃO PAULO

2010

DEDICATÓRIA

Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora **Carmen Lucia Penteado Lancellotti**, Professora Titular do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, minha orientadora pela dedicação, paciência e carinho em todos os âmbitos da minha vida. Pelo apoio e confiança sempre presentes.

Ao professor Doutor **Henrique Olival Costa**, Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, meu co-orientador, pela dedicação inspiradora.

Ao Professor Doutor **Leonardo da Silva**, professor assistente do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelos conselhos que sempre me levam a refletir.

Aos funcionários do ICAO **Solange, Thiago e Cida**, pelo apoio e dedicação em todos os momentos.

À **Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo** e à **Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo** a oportunidade de participar deste curso de pós-graduação.

Agradeço também a **CAPES e FAPESP** pela contribuição financeira e apoio aos nossos trabalhos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Celulose Bacteriana.....	3
1.2	Biocompatibilidade.....	6
2	ARTIGOS.....	10
2.1	Artigo Principal - Avaliação da resposta tecidual e deslocamento medial da prega vocal ao implante de celulose bacteriana em coelhos. Estudo experimental.....	11
2.2	Artigo 2 - Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos.....	37
2.3	Artigo 3 - Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por <i>Acetobacter xylinum</i> no dorso nasal de coelhos	61
3	DISCUSSÃO	78
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
5	ANEXOS	86
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

Avanços no campo de biomateriais e suas aplicações médicas como para correção de paralisias ou mesmo para preenchimento de espaços laríngeos, indicam a importância e o potencial de vários polissacarídeos de origem microbiológica no desenvolvimento de novas classes de materiais biomédicos (Czaja et al, 2006). Tais biomateriais não devem eliciar respostas inflamatórias deletérias que dificultem ainda mais defeitos a serem corrigidos. Dentre estes materiais encontra-se a celulose bacteriana (Lipp et al, 2010).

Procuramos estudar a resposta tecidual aos biomateriais, alterações anatomopatológicas do processo cicatricial da região infraglótica, glótica e dorso nasal com o implante de celulose bacteriana. Tais experimentos são descritos nos trabalhos “Avaliação da resposta tecidual e deslocamento medial da prega vocal ao implante de celulose bacteriana em coelhos. Estudo experimental”; “Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos” e “Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos”.

Do ponto de vista biológico o ideal seria que o implante se integrasse com os tecidos ao redor, permitindo sua estabilidade e incorporação, como ocorre em geral com os biomateriais (Czaja et al, 2007).

Segundo Sevastjanova et al (1987) quando um polímero sintético é implantado no organismo, a primeira reação deste é a destruição do implante e necrose do tecido receptor. É sabido que há uma reação universal do organismo, inicialmente com formação de tecido inflamatório composto de células de exsudato sangüíneo e desenvolvimento de tecido inflamatório, com acúmulo de biopolímeros no tecido conjuntivo extracelular da matriz. O processo completa-se com a formação de tecido conjuntivo denso rico em colágeno, levando à reparação anatômica e

biomecânica do defeito. Por isso, a biocompatibilidade do material implantado pode ser avaliada por métodos morfológicos com a análise do tecido conjuntivo, fibras de colágeno e glicosaminoglicanos ao redor do implante. Esses resultados dependerão de algumas características próprias do material como porosidade, textura da superfície, consistência e propriedades físico-químicas.

1.1 Celulose Bacteriana

A pesquisa de material biocompatível busca encontrar um substituto do tecido humano que não desencadeie distúrbio tecidual, e que também interaja favoravelmente com o tecido hospedeiro, aproximando-se ao máximo das qualidades exigidas pela função específica a ser exercida por aquele órgão ou tecido reparado (Czaja et al, 2007; Ko et al, 2010).

O material utilizado em implantes não pode ser rejeitado e não pode causar uma resposta inflamatória, devendo ser, portanto, biocompatível. Além disso, deve promover a cura e a regeneração tecidual e, quando necessário, ser biodegradável (Chen e Wu, 2005; de Castro Brás et al, 2010).

Nos últimos anos, uma grande variedade de biomateriais vem sendo desenvolvida com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, dependendo da aplicação biomédica prevista. Inclui-se nesse contexto regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos (Pritchard et al, 2010), novos enxertos vasculares (Fink et al, 2010) ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (Serrano et al, 2004; Czaja et al, 2007).

Farah (1984), de forma empírica, e utilizando meios através da fermentação da bactéria *Acetobacter xylinum* conseguiu produzir a biocelulose, ou celulose bacteriana, que logo despertou o interesse médico, a princípio, devido à sua grande

semelhança com a pele humana. Posteriormente, observou-se que apresentava propriedade físico-química de permeabilidade seletiva que permitia a passagem de gases, impedindo a passagem de líquidos e o trânsito de microorganismos.

A celulose bacteriana possui uma nanoestrutura fibrilar única, que determina propriedades físicas e mecânicas características e lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas (Hoenich, 2006; Czaja et al, 2007). Ela é um homopolímero linear de glicose $(C_6H_{10}O_5)_n$, com n variando de 500 a 5000, e é o material polimérico mais difundido na natureza (Muller et al, 2006). É insolúvel em água e é degradado na natureza por enzimas. A produção da celulose faz-se pela polimerização das cadeias de glicose e pela cristalização de microfibrilas, um processo celular direto da *Acetobacter xylinum* (Martson et al, 1999).

Tal polissacarídeo é excretado para o meio extracelular em longas nanofibras não agregadas por diversas bactérias, entre elas a *Acetobacter xylinum* (Brown et al, 1976). Esta bactéria constrói uma película de celulose bacteriana entre o meio de cultura e a superfície gasosa, que tem de um lado uma superfície densa, e do lado oposto uma camada gelatinosa, que está em contato com o líquido (Backdahl et al, 2006).

Diferente da celulose das plantas, a celulose bacteriana, não contém lignina, que é uma macromolécula tridimensional amorfa encontrada nas plantas terrestres, associada à celulose na parede celular, cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Também não contém componentes de origem animal e nenhuma espécie de proteína estranha e, portanto, não causa reações alérgicas (Sanchavanakit et al, 2006).

A sua estrutura nanofibrilar vem sendo utilizada em diversas aplicações médicas como: substituto temporário de pele no tratamento de lesões, queimaduras,

úlceras, enxertos; como curativo de ferimentos e auxiliar em abrasões dérmicas (Fontana et al, 1990; Costa et al, 2005; Sanchavanakit et al, 2006).

A celulose bacteriana é um material promissor também na produção de suportes (*scaffolds*) de tecido cartilaginoso visto que possui alta resistência no estado úmido, ser moldável *in situ*, biocompatibilidade, relativa simplicidade, e baixo custo de produção (Svensson et al, 2005).

Helenius et al (2006), em seu trabalho com a celulose bacteriana *in vivo* contribuíram para um maior conhecimento sobre este biomaterial e sua interação com células. Utilizaram pedaços de celulose bacteriana, que foram implantados no tecido subcutâneo de ratos, e sua biocompatibilidade *in vivo* foi avaliada. Os implantes de celulose bacteriana não causaram reação de corpo estranho, não apresentaram formação de fibrose ou encapsulamento e o tecido conjuntivo dos ratos apresentou-se muito bem integrado às estruturas de celulose bacteriana. Após semanas do implante, os fibroblastos estavam completamente integrados na estrutura da celulose e sintetizaram colágeno. Neste estudo foi mostrado que a densidade do material influencia na forma e na invasão das células e, quanto maior a densidade da celulose bacteriana, menor a migração celular. Foi observado que as diferentes formas dos núcleos dos fibroblastos dependem da direção das nanofibras de celulose e que o novo tecido formado apresentou vascularização.

A celulose bacteriana tem sido utilizada com sucesso como curativo em escaras de pele, queimaduras, dermoabrasões e em áreas doadoras de pele. Também foi utilizada como substituta de meninge, dorso nasal, membrana timpânica e como material de revestimento de próteses intravasculares e de traquéia para evitar estenose circunferencial (Panerari et al, 2008; Costa et al, 2008; Amorin et al, 2009).

Kolodziejczyk e Pomorski (1999) implantaram pedaços de celulose bacteriana (1 cm de diâmetro) no subcutâneo de coelhos e examinaram-os periodicamente (uma e três semanas). Os implantes não causaram quaisquer respostas inflamatórias macroscópicas e observações histológicas mostraram apenas um pequeno número de células gigantes e uma fina camada de fibroblastos na interface entre a celulose e o tecido. Os resultados positivos também foram obtidos por Oster et al (2003) em um estudo in vitro utilizando fibroblastos de rato. Um estudo específico in vivo da biocompatibilidade de celulose bacteriana foi realizado por Klemm et al (2001), que implantou celulose na forma de um tubo oco como uma interposição de segmento das artérias carótidas de ratos.

1.2 Biocompatibilidade

O conceito de biocompatibilidade é baseado na interação entre o material a ser implantado e o ambiente biológico receptor. A falha de um biomaterial em oferecer biocompatibilidade geralmente é revelada por um rompimento das propriedades do material ou por uma resposta biológica insatisfatória. O principal aspecto da biocompatibilidade é a resposta tecidual local. A resposta do processo cicatricial é um fenômeno dinâmico, no qual as células e seus produtos interagem para reparar o tecido danificado. Muitas células estão envolvidas neste processo reparativo, incluindo macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. A observação da distribuição e contagem dessas células podem ser usadas na descrição da reação inflamatória (Vince et al, 1991).

Segundo o *Dorland's Medical Dictionary*, biocompatibilidade é descrita como a capacidade de não apresentar efeitos tóxicos ou prejudiciais em sistemas biológicos. Porém, esta definição é bastante incompleta, pois trata apenas das ausências de

reações negativas, sem incluir interações positivas desejáveis. Segundo a *American Society for Testing and Material* (ASTM), biocompatibilidade é a comparação entre a resposta produzida por um tecido implantado com o material em estudo e a resposta reconhecida e estabelecida como adequada com materiais-controle (ASTM, 2004).

Para a agência norte americana que regula drogas e alimentos (*Food and Drugs Administration* - FDA), um biomaterial para ser considerado biocompatível não deve ser tóxico, carcinogênico, antigênico nem mutagênico, não deve interferir com a cicatrização dos tecidos lesados durante o ato cirúrgico e os tecidos do hospedeiro devem tolerar bem as propriedades biomecânicas dos materiais. Além disso, deve ser de possível fabricação, esterilizável e estável durante a implantação e quando necessário, para aplicação. Não deve ser corrosível, degradável.

Robbins et al (1994) descrevem que a inflamação é a principal reação do organismo vivo à presença de corpo estranho. Consiste estruturalmente em exsudação de líquidos e de proteínas plasmáticas – edema – e, migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, nas primeiras horas ou dias do processo agudo. Com o passar do tempo esta reação tornar-se-á crônica, sendo menos uniforme, com presença de linfócitos e macrófagos e, com proliferação de vasos sangüíneos e tecido conjuntivo.

Segundo Bonzon et al (1995), estudos de biocompatibilidade de enxertos podem revelar nos primeiros oito dias edema ao redor do tecido e reação inflamatória ao lado do implante. Há uma concentração maior de células inflamatórias, na sua maioria linfócitos e neutrófilos, na interface entre o implante e o tecido conjuntivo. Após 15 dias, há a proliferação de alguns capilares no tecido conjuntivo e no local de implantação. Não são observadas células gigantes multinucleadas de corpo estranho ou formação de cápsula fibrosa. Alguns

macrófagos podem estar presentes. Após cerca de três semanas percebe-se menor resposta inflamatória e inicia-se a resposta fibroblástica. Com 30 dias, não se vê resposta inflamatória e o tecido conjuntivo está parcialmente organizado. Com 60 dias, há síntese de colágeno e após 90 dias tem-se tecido conjuntivo normal, novo e organizado.

A biocompatibilidade do material implantado pode ser avaliada por métodos morfológicos para a análise do tecido conjuntivo, colágeno e glicosaminoglicanos ao redor do implante. Esses resultados dependerão de algumas características próprias do material como propriedades físicas, químicas e de porosidade (Chen e Wu, 2005).

Schadel et al, (1993) descrevem que existem vários métodos para a avaliação da biocompatibilidade do enxerto em relação ao tecido hospedeiro, Podemos utilizar cultura de células e tecidos, análise histoquímica, estudos bioquímicos, histológicos e estudos de perfusão. Existem ainda medidas de peso, rigidez, elasticidade, alongamento e alterações na superfície, que podem ser revelados na microscopia eletrônica (Sevastjanova et al, 1986; Vince et al, 1991).

O método mais utilizado para avaliação de biocompatibilidade, em estudos experimentais é a análise histológica com coloração pela hematoxilina-eosina (Högset e Bredberg, 1986; Willians e Blayney, 1987; Merchant e Nadol, 1994; Bonzon et al, 1995; Schwager e Geyer, 1998; Laidlaw et al, 2001; Meijer et al, 2002; Hoffman et al, 2003; Trabandt et al, 2004; Spiegel e Kessler, 2005; Weber et al, 2006).

Nos nossos trabalhos optamos pela análise histológica, por ser um método simples e por fornecer informações qualitativas gerais da resposta tecidual.

Nossa linha de pesquisa sobre o uso da celulose bacteriana produzida por *Acetobacter Xilinum* vem estudando a resposta tecidual em diversos locais desde 2005. Começamos com o uso da celulose como curativo em ferida de pele,

provocada por queimadura (Costa e Souza, 2005). Em seguida aplicamos a celulose em concha nasal (Osman et al, 2007), como substituto de septo nasal (Oliveira et al, 2007) e de membrana timpânica (Kato et al, 2008) e também em orelha média de cobaias (Costa et al, 2008).

Seguindo nossa linha, a membrana de celulose bacteriana foi utilizada em traquéia, após escarificação (Panerari et al, 2008). Depois publicamos seu uso em dorso nasal (Amorim et al, 2009).

Os artigos a seguir demonstram o desenvolvimento da nossa linha de pesquisa e as próximas etapas a serem seguidas.

2 ARTIGOS

2.1 Artigo Principal

Avaliação da resposta tecidual e deslocamento medial da prega vocal ao implante de celulose bacteriana em coelhos. Estudo experimental.

Flávia Coelho de Souza^I; Henrique Olival Costa^{II}; Leonardo da Silva^{III}; Paulo Pontes^{IV}; Carmen Lúcia Penteado Lancellotti^V

^I Doutoranda do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), Médica Veterinária, São Paulo.

^{II} Otorrinolaringologista, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, Prof. Titular do Depto de Otorrinolaringologia da FCMSCSP.

^{III} Doutor em Otorrinolaringologia, Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

^{IV} Professor Titular do Departamento de ORL da UNIFESP, Chefe do Departamento de ORL da UNIFESP.

^V Orientadora da Tese de Doutorado da aluna Flavia Coelho de Souza no Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Prof. Titular do Depto de Ciências Patológicas da FCMSCSP.

RESUMO

Os distúrbios de movimento das pregas, chamados de paralisia das pregas vocais (PPV) podem ter inúmeras causas: traumas, distúrbios neurológicos, lesão do nervo recorrente, tumores, etc. O método de tratamento dependerá das condições da paralisia e podem ser desde a cirurgia até a fonoterapia. Em alguns casos, a voz pode retornar sem que haja necessidade de tratamento durante o primeiro ano após o surgimento da paralisia. Por isso, muitas vezes se posterga o procedimento cirúrgico na expectativa de uma recuperação espontânea, porém pode acarretar limitação social ou profissional e consequências mais graves como aspiração de secreções. Portanto, a possibilidade de utilizar uma técnica que traga os benefícios de um deslocamento medial temporário, sem desencadear repercussões locais definitivas seria de grande valia para estes pacientes. Propomos neste estudo o implante da membrana de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* por apresentar pouca reatividade imune e, tender a permanecer no local da colocação. O uso da membrana de celulose bacteriana ainda não foi devidamente investigado no deslocamento medial da laringe com aumento de volume. Como os testes em animais não incluíram sua avaliação na região laríngea, entendemos que seria necessário constatar a resposta tecidual no modelo animal, assim como as possíveis condições de reabsorção da celulose, para avaliar sua utilidade como material de reconstrução laríngea. **Objetivo:** Avaliar o deslocamento medial e a resposta tecidual e cicatricial das pregas vocais de coelhos, com implante de celulose bacteriana. **Forma de Estudo:** Experimental **Material e Método:** Foram estudados 32 coelhos, sendo 2 animais do grupo de controle cirúrgico para localização do implante. Os animais foram seguidos por até quatro meses, sendo agrupados em períodos de seguimento diferentes, de duas semanas, quatro semanas e dezesseis semanas, a fim de avaliar os achados quanto às possíveis modificações cicatriciais decorrentes do passar do tempo. Os animais receberam manta de celulose bacteriana na porção lateral de suas pregas vocais e injeção de água destilada na porção contralateral, sob anestesia geral, e através de laringotomia-vídeoendoscópica. Após o período de estudo toda a região glótica, compreendendo desde o ventrículo laríngeo, acima da borda livre das pregas vocais até um cm abaixo delas foi submetido a exame histológico. Foram avaliados o grau de cicatrização e as condições inflamatórias em cada espécime. As condições do deslocamento medial foram avaliadas por exame macroscópico da peça ao final de cada período de seguimento. **Resultados:** Não houve diferença estatística significativa entre os diversos parâmetros inflamatórios e cicatriciais testados para os grupos estudo e controle e entre os diversos períodos de seguimento. A maioria dos animais que recebeu celulose teve sua prega vocal deslocada medialmente e, apesar de haver certa fragmentação inicial da celulose, todos os animais tinham o material no local implantado ao final do período de seguimento. **Conclusão:** A celulose bacteriana é um material útil no deslocamento medial de pregas vocais por não causar inflamação exacerbada e porque efetivamente desloca-as.

Descritores: Paralisia laríngea; biomaterial; celulose bacteriana; prega vocal; coelhos.

INTRODUÇÃO

As pregas vocais movem-se graças à ação dos músculos laríngeos, controlados pelo sistema nervoso. Os impulsos que regem os seus movimentos são gerados no córtex cerebral, passando posteriormente para o bulbo raquidiano, onde se encontra o núcleo de origem do nervo vago ou X par craniano. Este nervo, além de controlar a mobilidade de inúmeros órgãos internos, emite ramificações específicas que inervam os músculos da laringe: o nervo laríngeo superior, que rege a mobilidade do músculo cricotiroídeo, e o nervo laríngeo inferior ou nervo recorrente, que faz o mesmo com o resto da musculatura que aciona as cordas vocais. A paralisia do X nervo e/ou de seu ramo, o nervo laríngeo inferior recorrente, acarreta uma morbidade de grande repercussão sobre o paciente devido à perda das funções laríngreas¹⁻⁵.

A etiologia da paralisia da prega vocal (PPV) é variada e pode incluir lesões no próprio tronco cerebral. As lesões incluem tumores na base do crânio, carcinoma da nasofaringe, lesão na fossa jugular, lesão no espaço faríngeo lateral e lesão no nervo XI e vago abaixo dos gânglios nodosos⁶.

As etiologias possíveis de lesões baixas do vago são mais numerosas. Neurite é uma causa freqüente que ocorre com infecção respiratória superior, mononucleose infecciosa, sarcoidose e infecção dos espaços parafaríngeos⁷. Neoplasma no pescoço, brônquios e tórax podem invadir e afetar o nervo. O estiramento mecânico ou compressão do nervo pode também resultar em paralisia da musculatura laríngea. Entre as etiologias mais comuns encontram-se trauma externo agudo ao pescoço, cirurgia e etiologias idiopáticas^{7,8}.

Com relação à função esfínteriana, sabe-se que uma falha no seu desempenho resulta em aspiração de secreções, saliva, alimentos, líquidos ou sangue para a árvore traqueobrônquica, evento esse que, por sua vez, provoca a tosse e impossibilita a alimentação normal. A tosse somente é efetiva quando há o fechamento completo das pregas vocais, determinando uma intensa pressão subglótica que é liberada quando essas se abrem abruptamente. A paralisia da prega vocal unilateral (PPVU) determina um fechamento glótico incompleto e, portanto, uma tosse fraca e ineficaz. Há acúmulo de secreções na laringe, com necessidade de pigarrear constantemente. Sem uma tosse efetiva para eliminar essas secreções, um cortejo de comemorativos clínico se sucede, com aspiração laringo-tráqueo-brônquica, passando pelas infecções respiratórias, broncopneumonias, culminando, até mesmo, em morte. Por vezes, traqueostomias são necessárias para proteger as vias aéreas inferiores⁹.

Essa mesma competência glótica, que aprisiona o ar na região subglótica, é que faz ancorar a musculatura infraclavicular, capacitando o ser humano a exercer força para desempenhar atividades físicas, força para levantar peso e força para executar a manobra de Valsalva, da qual necessitamos para defecar. É ela também a responsável pela pressão intrapélvica-abdominal que possibilita a ejaculação, a

micção e o trabalho de parto. Quanto maior a incompetência glótica, determinada pela posição em que se encontra a prega vocal paralisada, maiores serão as limitações do paciente¹⁰.

Em alguns casos, a voz pode retornar sem que haja necessidade de tratamento, durante o primeiro ano após o surgimento da paralisia. Isto pode ocorrer por re-inervação ou por reposicionamento da prega vocal paralisada, devido aos ajustes musculares existentes na região. Por isso, muitas vezes se posterga o procedimento cirúrgico, na expectativa de uma recuperação espontânea¹¹. Durante o período de espera, o tratamento sugerido é usualmente a fonoterapia que pode envolver exercícios para favorecer a movimentação da prega vocal contra lateral e melhorar o controle respiratório durante fala.

O tratamento cirúrgico da insuficiência glótica causada por atrofia, paralisia ou perda de tecido tem por objetivo o deslocamento medial da prega vocal, que possibilita o fechamento glótico. Este deslocamento pode ser realizado por intermédio do uso de substâncias inseridas lateralmente ao músculo tireoaritenoideo, seja por infiltração com agulha, seja por colocação por via externa¹².

Também existem técnicas em que se coloca um agente de deslocamento medial para aumento de volume, diretamente no espaço de Reinke, acrescentando tamanho, à prega vocal paralisada^{13,14}.

Brunings¹⁵, em 1911, descreveu um método para estreitamento da fenda glótica com injeção de parafina nos casos de paralisia unilateral do nervo recorrente. Apesar do sucesso, este método foi abandonado por um longo tempo, devido aos efeitos colaterais adversos, como o parafinoma.

Dentre os materiais utilizados para dar volume às pregas vocais, o Teflon^{®16-19} foi o mais utilizado. Ford e Bless (1986 e 1987)²⁰⁻²² relatam que o Teflon pode desencadear reação inflamatória seguida de formação de tecido de granulação e é de difícil remoção.

Mais recentemente materiais biológicos ou semibiológicos tem sido usados para mudar a forma ou mesmo as características vibratórias das pregas vocais, como o colágeno^{23,24}, a gordura autóloga²⁵⁻²⁷ e a fásia^{28,29}.

O estudo de Chan & Titze (1998)³⁰, comparando vários materiais implantáveis na prega vocal, demonstrou que as características viscoelásticas do ácido hialurônico eram muito semelhantes às encontradas na lâmina própria da prega vocal normal de homens e mulheres. O ácido hialurônico foi também utilizado por³¹.

Perazzo *et al* (2009)³² utilizaram ácido hialurônico em pregas vocais de coelhos e concluíram que ele não promove um processo inflamatório significativo e permanece durante os três meses do estudo, no local aplicado.

As possíveis complicações dos procedimentos de injeção para aumento do volume das pregas vocais são: a super-infiltração que leva a uma voz tensa e dificuldade respiratória; reação imune à substância injetada; formação de granuloma; tempo de manutenção do material injetado muito reduzido e migração ou extrusão do material injetado³⁰.

Do ponto de vista biológico o ideal seria que o implante se integrasse com os tecidos ao redor permitindo sua estabilidade e incorporação, como ocorre em geral com os biomateriais e que ao mesmo tempo possibilitasse o ajuste de forma e o volume necessário para o melhor desempenho da técnica.

BIOMATERIAIS

O material utilizado em implantes não pode ser rejeitado e não pode causar uma resposta inflamatória, devendo ser, portanto, biocompatível. Além disso, deve promover a cura e a regeneração tecidual; e, quando necessário, ser biodegradável³³.

A celulose bacteriana possui uma nanoestrutura fibrilar única, que lhe conferem propriedades físicas e mecânicas características, que lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas^{34,35}. Ela é um homopolímero linear de glicose $(C_6H_{10}O_5)_n$, com n variando de 500 a 5000, e é o material polimérico mais difundido na natureza³⁶. É insolúvel em água e é degradado na natureza por enzimas³⁷.

Ela é um polissacarídeo excretado extracelularmente por diversas bactérias, entre elas a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*, em longas nanofibras não agregadas^{38,39}.

Ela tem sido utilizada com sucesso como curativo em escaras de pele, queimaduras, dermoabrasões e em áreas doadoras de pele. Também foi utilizada como substituta de meninge, dorso nasal, membrana timpânica e como material de revestimento de próteses intravasculares e traquéia para evitar estenose circunferencial⁴⁰⁻⁴⁵.

OBJETIVO

Avaliar o deslocamento medial e a resposta inflamatória e cicatricial das pregas vocais de coelhos, com implante de celulose bacteriana.

MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICAO em 27/6/2007 - processo 06/07, o estudo foi realizado no biotério do Instituto de Ciências Avançadas em ORL com supervisão e acompanhamento veterinário, sendo que os coelhos permaneceram em gaiolas individuais, com livre acesso à água e à ração comercial padronizada, com jejum hídrico pré-operatório de 4 horas.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas da comissão de ética da Unidade de Técnica Cirúrgica Experimental da Santa Casa de São Paulo e obedeceu às normas da Lei Federal nº 6.638 de oito de maio de 1979 e aos princípios éticos na experimentação, postulados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O número de animais utilizado para o estudo seguiu as sugestões do National Institute of Health que considera ser adequada uma amostra de 6 a 10 animais por grupo quando o estudo for preliminar de sondagem (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/faqs.htm>).

Seleção e tamanho da amostra

Foram selecionados 32 coelhos da raça New Zealand, com idade de seis meses, machos, com peso de 2400 a 2800 gramas.

Os animais estudados foram coelhos, uma vez que apresentam estrutura anatômica da laringe semelhante a dos seres humanos e oferecem boas condições de manipulação, acompanhamento e avaliação. Foram seguidos por até quatro meses, sendo agrupados em períodos de seguimento diferentes para que pudéssemos detectar alterações na cicatrização.

Os volumes e as substâncias introduzidas foram:

- 0,3 cc de água destilada;
- 0,25 cc de manta de celulose bacteriana (Bionext®).

Os animais foram divididos em três grupos de dez e alocados de acordo com o tempo de seguimento até 120 dias. Dois animais foram utilizados para garantir que a técnica cirúrgica seria realizada conforme o planejado. Foi realizada a análise morfológica após a extração da laringe mostrando que os animais tiveram a celulose implantada lateralmente ao músculo tireoaritenóideo e medial à lâmina da tireóide, confirmando o método considerado adequado.

Detalhamento dos procedimentos

Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral intramuscular, utilizando Zoletil® (Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan), na dose de 0,4 mL/kg e Nilperidol® (Citrato de Fentanila + Droperidol), na dose de 0,3 mL/kg.

Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, e em respiração espontânea com máscara aberta de oxigênio. Realizamos a tricotomia da região cervical anterior, estendendo-a desde a mandíbula até a fúrcula externa. A

antisepsia da área foi realizada com Polvidine[®]. Os animais foram submetidos à uma incisão transversa, na projeção externa de 0,5cm. Em seguida estabelecemos um espaço sub-cutâneo com divulsão roma com Kelly e descolamento de tecido subcutâneo, até o mento e os ângulos da mandíbula. Realizado o descolamento do espaço subcutâneo, procedeu-se a colocação de um trocater de 11 mm. Para fixação do mesmo foi realizada uma sutura do trocater na pele cervical com nylon 2-0. Uma vez fixado o trocater, foi insuflado CO₂ até a pressão máxima de 0,5 mmHg. Depois da insuflação, colocamos uma ótica de 10 mm e 30° no trocater e realizamos novas aberturas para colocação dos trocateres. As incisões foram realizadas de cada lado da fúrcula, cada uma com 0,2 mm e a 2 cm da linha média e 2 cm cranialmente à incisão inicial. Foram realizadas as colocações dos trocateres de 5 mm e fixação com nylon 2-0 na pele. Inserimos uma pinça merilan no trocater da esquerda e uma tesoura no da direita. Com eles completamos a dissecação dos tecidos subcutâneos e realizamos a apresentação da laringe. Uma vez apresentadas as cartilagens cricoídea e tireóide, fizemos uma abertura de 2 mm na membrana cricotireoídea com tesoura, e a 2 mm a esquerda da linha mediana, estendendo-a pela lâmina da cartilagem tireóide. Com esta abertura criamos um túnel no sentido longitudinal usando uma pinça de pega curva para esquerda, utilizadas nas microcirurgias de laringe. A lâmina da cartilagem foi elevada em direção cranial expondo a musculatura endolaríngea que foi dissecada em seu plano subpericondral interno (Figura 1 A). Neste espaço foi colocada a manta de celulose, lateralmente ao músculo vocal do coelho, no volume de 0,25 cc (Figura 1 B). Para efeito de controle foi infiltrada água destilada com agulha de 30X8 mm, no volume de 0,3 cc no lado direito.

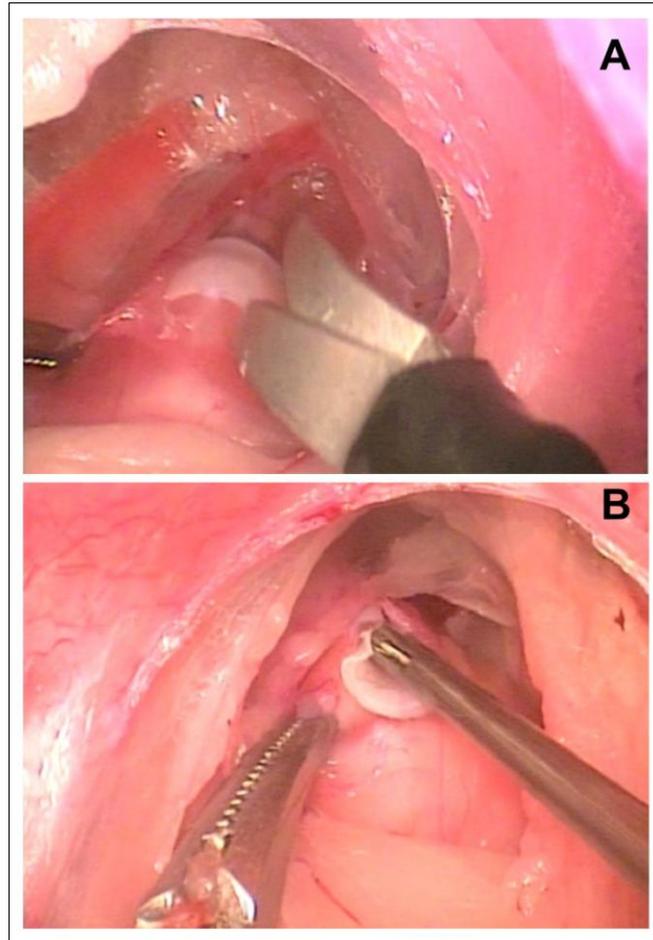


FIGURA 1. Momento da abertura da membrana cricotireoidea por via vídeo assistida (A) e colocação de manta de celulose através da laringofissura (B)



FIGURA 2. Corte anatômico axial em três níveis glóticos mostrando local de colocação de celulose

Todos os coelhos receberam antibioticoterapia com clindamicina 0,1 mL/kg e analgesia com dipirona sódica na dose de 0,1 mL/kg no pós-operatório imediato.

Grupos de seguimento

Foram criados três grupos de seguimento.

O grupo de estudo 1 foi aquele onde os animais foram seguidos por duas semanas e contou com 10 animais.

O grupo de estudo 2 foi aquele onde os animais tiveram quatro semanas de sobrevida e contou com 10 animais.

O grupo de estudo 3 foi aquele onde os animais tiveram dezesseis semanas de sobrevida e contou com 10 animais.

Para a alocação nos grupos de seguimento houve um sorteio no dia anterior a eutanásia que designou quais os animais comporia os grupos.

Ao final de cada período de seguimento, os animais foram novamente anestesiados e receberam tiopental sódico EV (dose 40 mg/kg), e logo após 2 mL de KCl 19,1% (cloreto de potássio), para eutanásia.

Após a eutanásia, realizamos abertura longitudinal da região cervical dos animais e, através de laringectomia total convencional associada à remoção do terço superior da traquéia para obter a peça de estudo. O produto da laringotraqueoectomia foi encaminhado para exame histopatológico.

Avaliação histopatológica

Foi submetida a exame toda a região glótica compreendendo desde o ventrículo laríngeo, acima da borda livre das pregas vocais até 1 cm abaixo delas (Figuras 3).

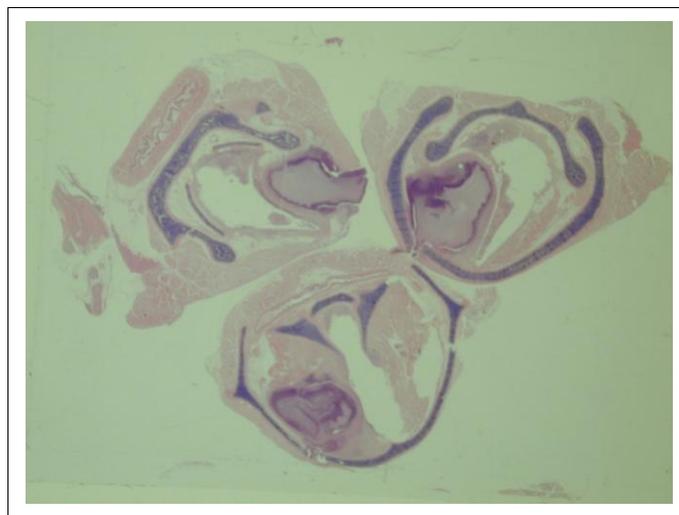


FIGURA 3. Cortes axiais de laringe na extensão compreendendo desde a borda livre das pregas vocais até 1 cm abaixo delas, apresentando celulose na porção lateral

Os tecidos foram preparados em parafina, cortados em amostras de 6 µm e analisados no Departamento de Patologia da Santa Casa de São Paulo. As lâminas foram preparadas com coloração de hematoxilina-eosina. A biocompatibilidade foi determinada de acordo com os procedimentos de avaliação descritos pela norma ISSO 10993-631. A análise das lâminas foi realizada por dois patologistas e supervisionada pelo professor responsável.

Foram avaliados o grau de cicatrização e as condições inflamatórias encontrados em cada espécime.

Os parâmetros definidores de condição inflamatória foram: Congestão vascular (abertura de novos capilares e dos leitos venulares locais, dilatação excessiva dos vasos existentes e concentração com aglutinação de hemácias em seu interior), Exsudato celular (presença de células fagocíticas mortas ou com presença de microorganismos em seu interior presença de polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e plasmócitos), edema por extravasamento por abertura de junções endoteliais.

O parâmetro definidor das condições cicatriciais, considerados de cura por segunda intenção, foi: Angiogênese e Proliferação conjuntivofibrosa.

Cada um dos parâmetros inflamatórios foi categorizado, sendo classificados em:

- Transudato inflamatório: ausente (0), discreto (1) - edema extra vascular, moderado (2) - presença de poucas células polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, intenso (3) - presença predominante das células polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e plasmócitos.
- Congestão vascular: ausente (0), discreta (1) - dilatação dos vasos, moderada (2) - aglutinação de hemácias, e intensa (3) - abertura de novos capilares e leitos venulares locais.
- Exsudato celular: ausente (0), presente (1)
- Angiogênese e Proliferação conjuntivofibrosa: (0) ausente, (1) discreta, (2) moderada.

Quanto à integridade da manta de celulose foi classificada em:

- íntegra (1)
- parcialmente fragmentada (2)
- fragmentada (3)

Também observamos na peça anatômica a posição da celulose e categorizamos em:

- anterior
- médio
- posterior

E o deslocamento medial provocado na borda livre da prega vocal em:

- ausente (0) nenhum abaulamento na borda livre da prega vocal
- presente (1) quando houve abaulamento na borda livre da prega vocal

Tanto os valores individuais quanto as médias dos resultados foram considerados para a análise estatística.

Avaliação estatística

Comparamos os resultados encontrados entre os grupos de estudo e controle através de análise de teste de Wilcoxon, (Mann-Whitney) não paramétrico, para as variáveis não contínuas como parâmetros inflamatórios, de cicatrização e fibrose.

Procurando definir se havia diferença entre os parâmetros (inflamação, congestão vascular, proliferação conjuntivo-fibrosa e integridade da celulose) avaliados de acordo com o tempo de seguimento utilizamos o Teste de Jonckheere.

Os achados de nosso estudo serão apresentados nas Tabelas de 1 e 2, e as análises estatísticas descritas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Alguns exemplos de nossos achados estão dispostos nas Figuras de 4 a 7.

RESULTADOS

TABELA 1. Categorias dos parâmetros inflamatórios e cicatriciais relativos à resposta tecidual à manta de celulose, de acordo com o tempo de seguimento em semanas

Coelho	Tempo	Inflamação			Cicatricial
		Transudato	Congestão vascular	Exsudato celular	Angiogênese fibrose
2	2	3	2	0	1
3	2	3	3	0	2
4	2	0	1	0	2
5	2	3	2	0	0
14	2	0	1	0	1
12	2	3	2	0	2
17	2	1	2	0	2
18	2	0	0	0	0
21	2	3	2	0	2
29	2	2	2	0	0
7	4	0	1	0	0
8	4	3	2	0	2
9	4	0	2	0	0
11	4	0	0	0	0
19	4	3	1	0	2
20	4	0	1	0	0
23	4	0	0	0	0
25	4	2	3	0	2
30	4	2	3	0	0
32	4	3	2	0	1
6	16	2	2	0	0
10	16	1	2	0	1
13	16	1	3	0	0
15	16	2	2	0	1
16	16	0	0	0	0
22	16	3	2	0	1
24	16	1	2	0	0
26	16	2	1	0	0
27	16	1	1	0	1
28	16	3	2	0	1

TABELA 2. Categorias dos parâmetros das condições de integridade da celulose e do deslocamento medial nos coelhos do grupo de estudo, segundo tempo de seguimento

Coelho	Grupo	Integridade da celulose	Posição da celulose	Deslocamento medial
2	2	3	Anterior	1
3	2	3	Anterior	1
4	2	1	Anterior	1
5	2	1	Anterior	0
14	2	3	Anterior	0
12	2	3	Anterior	1
17	2	1	Anterior	0
18	2	1	Anterior	0
21	2	2	Anterior	0
29	2	1	Média	0
7	4	1	Anterior	0
8	4	3	Anterior	1
9	4	3	Anterior	1
11	4	1	Anterior	0
19	4	1	Anterior	0
20	4	1	Anterior	0
23	4	3	Anterior	1
25	4	2	Média	1
30	4	3	Anterior	1
32	4	3	Anterior	1
6	16	2	Anterior	1
10	16	3	Anterior	1
13	16	2	Anterior	1
15	16	2	Anterior	1
16	16	2	Anterior	1
22	16	3	Anterior	1
24	16	2	Anterior	1
26	16	3	Anterior	1
27	16	3	Anterior	1
28	16	2	Anterior	1

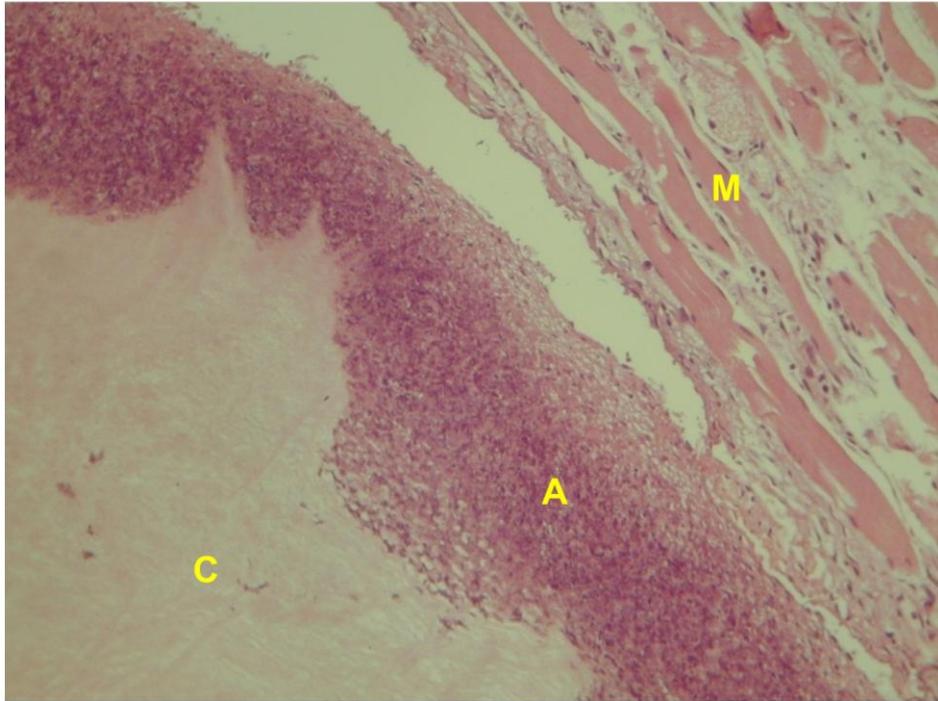


FIGURA 4. Corte coronal de borda livre de prega vocal, mostrando relação da celulose bacteriana (C) com coroa neutrofílica (A) e músculo tireoaritenóideo (M). HE, 40X

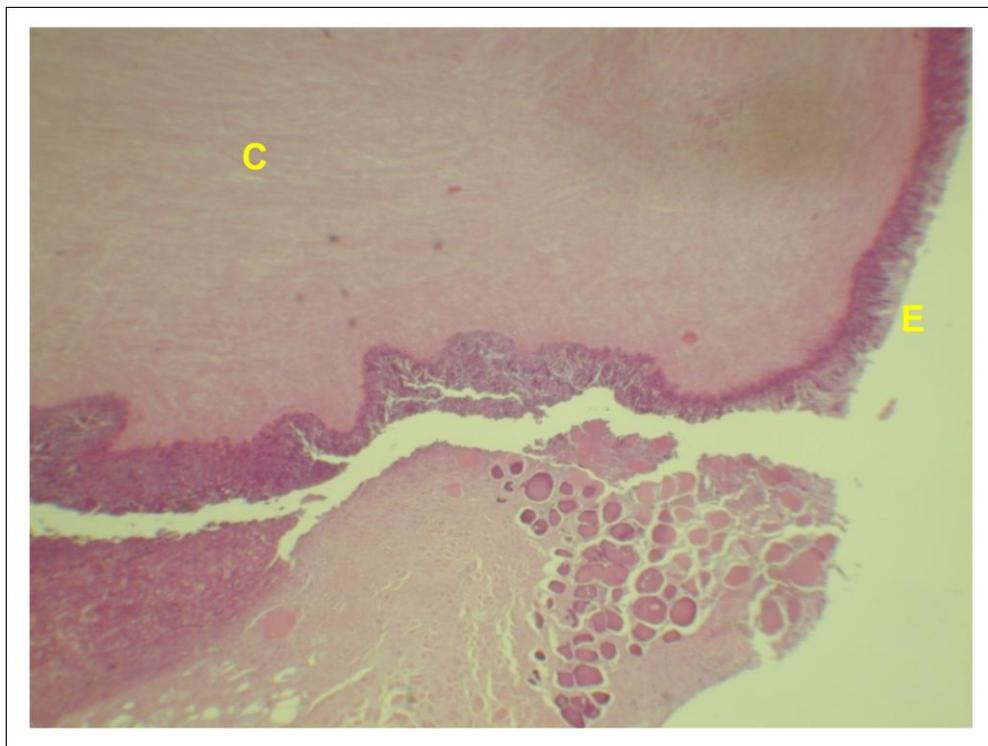


FIGURA 5. Corte coronal de prega vocal, mostrando a celulose bacteriana (C) e o epitélio de revestimento (E) totalmente preservado. HE, 40x

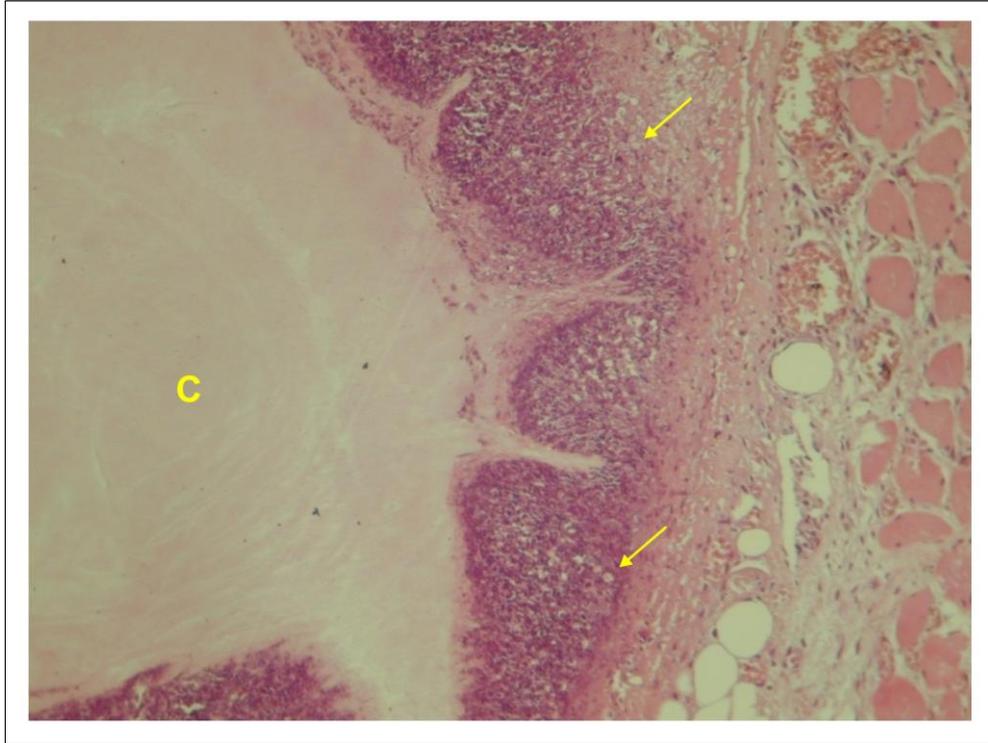


FIGURA 6. Corte coronal de prega vocal, mostrando permeação da celulose bacteriana (C) com proliferação de neutrófilos (setas). HE, 40X

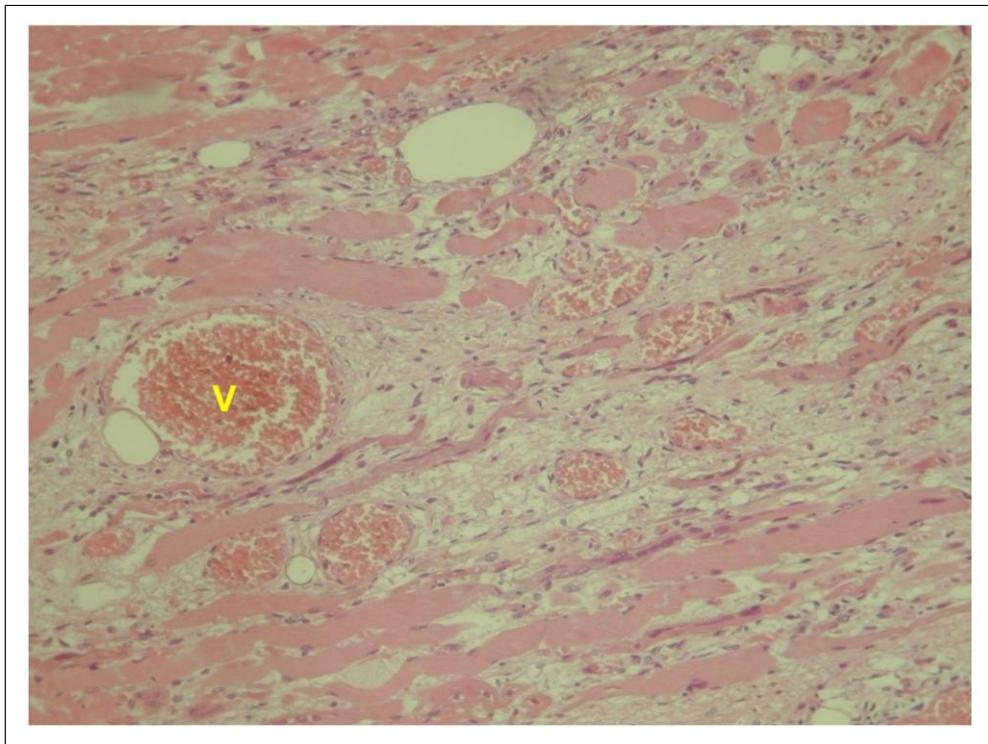


FIGURA 7. Prega vocal com congestão vascular discreta (V). HE, 40X

TABELA 3. Teste de Wilcoxon (Mann-Whitney), nos parâmetros inflamatórios e cicatriciais, comparando os grupos de estudo e controle

Variáveis estatísticas	Transudato		Congestão vascular		Angiogênese e proliferação conjutivofibrosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
N	30	30	30	30	30	30
Média aritmética	0,92592	1,56	1,33333	1,6	0,70370	0,96
Variância	0,68660	1,6733	0,53846	0,6666	0,44729	0,87333
Teste de razão de variância (Teste F)	1,733853776		1,40918959		0,8931862024	
P	0,082944		0,158779		0,371757	

TABELA 4. Teste de Jonckheere entre múltiplos parâmetros de tempo, para a integridade da celulose

Variáveis estatísticas	Integridade da Celulose		
	2 Sem	4 Sem	4 Meses
N	10	10	10
Média aritmética	1,9	2,1	2,4
Variância	0,98888	0,98888	0,26666
Teste de Jonckheere	1,099999876		
P	0,13566609		

TABELA 5. Resultado do teste de Jonckheere entre múltiplos parâmetros de tempo, para a inflamação

Coelho	Transudato		
	2 Sem	4 Sem	4 Meses
N	10	10	10
Média aritmética	1,8	1,375	1,42857
Variância	1,9555	2,2678	0,9523
Teste de Jonckheere	-0,6549835074		
P	0,74376081		

TABELA 6. Resultado do teste de Jonckheere entre múltiplos parâmetros de tempo, para a congestão vascular

Coelho	Congestão vascular		
	2 Sem	4 Sem	4 Meses
N	10	10	10
Média aritmética	1,7	1,5	1,5714
Variância	0,6777	0,8571	0,6190
Teste de Jonckheere	-0,3619481003		
P	0,64130459		

TABELA 7. Resultado do teste de Jonckheere entre múltiplos parâmetros de tempo, para a proliferação conjuntivofibrosa

Coelho	Proliferação conjuntivofibrosa		
	2 Sem	4 Sem	4 Meses
N	10	10	10
Média aritmética	1,3	0,875	0,5714
Variância	1,1222\$	0,9821	0,2857
Teste de Jonckheere	-1,484059413		
P	0,93110342		

DISCUSSÃO

As pessoas que sofrem de paralisia de pregas vocais (PPV), em geral experimentam mudanças em sua voz que podem afetar desde a qualidade vocal, até gerar dificuldade de sustentação vocal, instabilidade de sonorização ou mesmo incapacidade de vocalização. Quando uma das pregas vocais está paralisada, na dependência de sua posição na laringe, poderemos encontrar desde uma voz com intensidade normal, mas pouca restrita quando a paralisia se dá com a prega em posição mediana, até uma voz sem qualquer sonorização e grande escape de ar, quando a prega se encontra em posição lateral⁶.

O uso de biomateriais nos procedimentos de aumento volumétrico das pregas vocais, assim como para provocar o seu deslocamento medial é de uso corrente na Laringologia^{18,30,46,47}. Entretanto, o material ideal, que seria aquele que provocasse pouca atividade inflamatória no sítio do hospedeiro, apresentasse boa integração aos tecidos circunvizinhos e que não sofresse degradação com o decorrer do tempo, ainda não foi encontrado.

Baseando-se na fisiopatogenia da resposta tecidual à biomateriais, Coltran *et al* (1994)⁴⁸ e Bonzon *et al* (1995)⁴⁹, descrevem que inicialmente um processo inflamatório agudo desenvolve-se ao redor do implante, em que nas primeiras horas ou dias, há exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos (neutrófilos). A observação da distribuição e a contagem dessas células podem ser

usadas para promover uma descrição da reação inflamatória. Com o passar do tempo esse processo vai diminuindo, dando lugar à inflamação crônica. Quando a inflamação crônica, caracterizada por formação de cápsula fibrosa espessa, granulação e rompimento do tecido, esta instalada pode haver subsequente formação de abscesso ou fístula, desencadeando a extrusão do enxerto e indução a alterações neoplásicas.

Desde o início do planejamento do nosso estudo, não achamos que a imunohistoquímica fosse essencial para a nossa avaliação uma vez que o processo inflamatório que pode resultar, eventualmente, da não biocompatibilidade da celulose seria uma reação inflamatória de corpo estranho. A imunohistoquímica é um método de análise molecular dos tecidos, que visa identificar características moleculares da doença. Dentre as inúmeras aplicações estão o diagnóstico de doenças inflamatórias, doenças infecciosas e câncer. A técnica também é importante para determinar os fatores preditivos e prognósticos em câncer. Assim, em nossa compreensão a técnica poderia, talvez, oferecer uma melhor documentação sobre o processo, mas não daria mais dados objetivos e sua ausência não invalida nossos resultados.

A biocompatibilidade do material implantado pode ser avaliada por métodos morfológicos (análise do tecido conjuntivo, colágeno e glicosaminoglicanos ao redor do implante). Esses resultados dependerão de algumas características próprias do material como propriedades físicas e porosidade (ocorre influência nas células que participam do processo inflamatório), textura da superfície, consistência e propriedades químicas. O conceito de biocompatibilidade é baseado na interação entre o material a ser implantado e o ambiente biológico receptor. A falha de um biomaterial em ser biocompatível geralmente é revelada por uma ruptura das propriedades do material ou uma resposta biológica insatisfatória. O principal aspecto da biocompatibilidade é a resposta tecidual local³³.

Curiosamente, nós não conseguimos encontrar a cápsula ao redor da celulose e, além disso, houve a penetração da celulose no tecido vizinho, o que pode significar uma espécie de incorporação do implante.

A celulose produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum* é um material de grande pureza, homogêneo em sua composição e com disposição de fibras que muito se assemelha ao colágeno que compõe as porções superficiais das pregas vocais³⁵. Estas características parecem compor um padrão próximo do ideal para o uso deste material nas cirurgias de somação volumétrica das pregas vocais.

Em nosso estudo, utilizamos a celulose em forma de manta, no volume de 0,25 cc para provocar a deslocamento medial de uma das pregas vocais de coelhos e comparamos a resposta inflamatória resultante, em tempos diferentes, com os controles de água destilada no volume de 0,3 cc.

O procedimento foi realizado através de pertuito confeccionado na cartilagem tireóide após exposição da laringe por cirurgia vídeoendoscopia cervical.

Os animais foram seguidos e mantidos nas mesmas condições e nenhum animal apresentou sinais ou sintomas de infecção no período pós-operatório.

Quanto aos procedimentos cirúrgicos

A vídeo cirurgia endoscópica vem sendo utilizada para o acesso a região da laringe⁵⁰.

Não encontramos dificuldades técnicas para a introdução da manta de celulose no espaço paraglótico através de laringofissura vídeo endoscópica, sendo que o tempo cirúrgico, sangramento intra-operatório e tamanho da manta colocada foi semelhante para todos os animais.

Quanto ao resultado funcional do procedimento

As injeções endoscópicas intra-cordais, inicialmente com pasta de Teflon, e posteriormente também com outras substâncias, ganharam notoriedade no tratamento da PPVU¹³. Estas substâncias podem ser: gordura, colágeno, silicone, pasta de Teflon e outras. Inúmeros trabalhos foram publicados mostrando a eficiência do método e suas eventuais complicações e limitações^{47,51}. A injeção da pasta de Teflon se tornou o substrato de injeção intracordal preferido dos anos 60 aos anos 90, em parte por ser método de fácil preparação e técnica cirúrgica. Complicações relacionadas com sua "supercorreção", migração de partículas e formação de granulomas, além da dificuldade de remoção da pasta em cirurgias revisionais, repercutiram na exclusão do Teflon da prática moderna do laringologista.

Outras substâncias também estão disponíveis para injeção intracordal: gordura autóloga tem sido utilizada desde 1990 e tem inúmeras vantagens. É de fácil viabilidade e baixa antigenicidade. Em comparação com os tecidos autólogos, a gordura oferece propriedades de visco-elasticidade semelhantes ao tecido das pregas vocais. Sua maior desvantagem é o grau de reabsorção que pode ocorrer, fazendo com que os resultados vocais em longo prazo sejam imprevisíveis^{52,53}.

O uso de fáschia autóloga para o tratamento da PPVU também vem sendo estudada. Ela pode ser aplicada na forma de enxerto livre, sendo considerado um procedimento relativamente fácil. Sua desvantagem é sua maior morbidade, já que necessita de injeção com agulha grossa para a obtenção de um enxerto viável⁵⁴.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo que faz parte da matriz extracelular, não provocando nenhuma resposta humoral ou celular imunológica. Existem dois produtos comerciáveis na atualidade, o Hylan b gel e o Restylane. Alguns estudos

demonstraram as propriedades de visco-elasticidade do ácido hialurônico em pregas vocais, com melhores resultados em relação ao colágeno e ao teflon^{32,46,55,56}.

Outros implantes, como o silicone particulado tem feito parte de estudos em ratos, recentemente. Os resultados preliminares sugerem que o deslocamento medial é estável, mas reações de corpo estranho podem ocorrer. Nos EUA, esta substância foi proibida em 1991, mas tem sido usada largamente em outros países pelo mundo⁵⁷.

Em nosso estudo com a membrana de celulose bacteriana, todos os animais apresentavam o implante no momento da eutanásia. A posição onde a celulose foi encontrada era praticamente a mesma para todos os casos, sendo que apenas três animais apresentavam celulose no terço médio das pregas vocais e o restante apresentava celulose na porção anterior.

O deslocamento medial foi considerado efetivo em 20 animais, sendo este um resultado bastante satisfatório (Tabela 2).

Quanto aos resultados histológicos

Na literatura observamos que para a avaliação da biocompatibilidade do enxerto em relação ao tecido hospedeiro, existem vários métodos. Têm-se: cultura de células e tecidos, análise histoquímica⁵⁸, estudos bioquímicos^{59,60} e histológicos e estudos de perfusão de todo um órgão. Além de medidas de peso, rigidez, elasticidade, alongamento, quebras na mecânica e alterações na superfície, que podem ser revelados na microscopia eletrônica. Mais recentemente, têm-se também usado exames complementares de radiologia como, por exemplo, a tomografia computadorizada, a ressonância nuclear magnética associada ou não à injeção de marcadores radioativos específicos, para avaliar a resposta do tecido aos implantes metálicos que podem se dissolver e causar inflamação^{59,61}. Porém o método mais utilizado em estudos experimentais é a análise histológica com coloração de hematoxilina-eosina⁶²⁻⁷¹.

Neste trabalho optamos pela análise histológica, por ser um método simples e por fornecer informações gerais da resposta tecidual ao material implantado. Não houve utilidade a coleta de exames laboratoriais como marcadores sanguíneos de inflamação, imunohistoquímica ou mesmo do uso de exames muito elaborados como a ressonância magnética.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo e controle para os parâmetros inflamatórios agudos (transudato, exsudato celular e congestão vascular) ou crônicos (angiogênese e proliferação conjuntivofibrosa) (Tabela 3).

Também as diferenças no decorrer do tempo foram pequenas, não sendo significantes do ponto de vista estatístico (Tabelas 5 a 7).

Quanto à integridade da celulose

Não houve diferenças significativas neste quesito com o decorrer do tempo o que faz supor que o material se mantenha relativamente estável a partir da segunda semana de colocação.

Entretanto, se considerarmos que todos os animais tinham a celulose integra no momento zero (dia da cirurgia) em seu pós-operatório imediato, houve diferença significativa na integridade da celulose logo imediatamente após o procedimento ($P = 0,000000654$).

Com os achados de nosso estudo podemos considerar que a celulose pode ser útil nos procedimentos de deslocamento medial das pregas vocais, uma vez que apresenta pouca capacidade de elicitar resposta inflamatória no hospedeiro e não extruem. Além disso, apesar de haver uma perda inicial da integridade do material implantado, o mesmo permaneceu no local após quatro meses sem maiores modificações, sugerindo que seja material estável no longo prazo.

CONCLUSÃO

A celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum* não provoca reação de corpo estranho maior que a água destilada quando colocada no espaço paralaríngeo de coelhos.

A membrana de celulose bacteriana produz deslocamento medial e se mantém estável até o quarto mês de acompanhamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Storey A. A functional analyses of sensory units innervating epiglottis and larynx. *Expt Neurol* 1968;20:366-83.
2. Sasaki CT; Weaver EM. Physiology of the larynx. *Am J Med* 1997;103(5A):9s-18s.
3. Bradley RM. Sensory receptors of the larynx. *Am J Med* 2000;108(4A):47s-50s.
4. Sanders I, Wu BL, Mu L, Li Y, Biller HF. The innervation of the human larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:934-39.
5. Wu BL, Sanders I, Mu L, Biller HF. The human communicating nerve: an extension of the external superior laryngeal nerve that innervates the vocal cord. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1321-27.
6. Colton RH; Casper, JK. Compreendendo os problemas de voz: perspectiva fisiológica ao diagnóstico e ao tratamento. 1996.

7. Bellenger JJ. Diseases of the nose, Throat, Ear, Head and Neck (13th Ed.), Philadelphia: Lea & Febiger. 1985.
8. Tucker HM. Vocal cord paralysis-etiology and management. *Laryngoscope* 1980;90:585-590.
9. Imamura R, Yoshida Y, Fukunaga H, Nakashima T, Hirano M. Thyroarytenoid muscle: functional subunits based on morphology and fiber typing in cats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110:158-67.
10. Hirano M, Sato K. Histological color atlas of the human larynx. San Diego: Singular; 1993. p. 1-36.
11. Sataloff RT; Gould WJ; Spiegel JR. Manual Prático de Fonocirurgia. 2002.
12. Rontal E; Rontal M. Vocal cord injection techniques. *Otolaryngol Clin North Am* 1991; 24:1151-77.
13. Arnold GE. Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia: IX. Technique of intracordal injection. *Arch Otolaryngol* 1962; 76:358-68.
14. Leden HV. The history of phonosurgery. In: Ford C, Bless DM. *Phonosurgery: assessment and surgical management of voice disorders*. New York: Raven. 1991.
15. Brunings W. Über eine neue behandlungsmethode der rekurrenslähmung 1911. *Verh Dtsch Laryngol*; 18:93-151.
16. Koufman JA, Laryngoplasty for vocal cord medialization: an alternative to Teflon. *Laryngoscope* 1986; 96:726-31.
17. Alessi DM, Berke GS, Trapp TK, Gerratt BR, Hanson DG. An accurate method of Teflon injection using functional phonosurgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 114(11):1321-3.
18. Trapp TK, Berke GS, Bell TS, Hanson DG, Ward PH. Effect of vocal fold augmentation on laryngeal vibration in simulated recurrent laryngeal nerve paralysis: a study of Teflon and Phonogel. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989 Mar; 98(3):220-7.
19. Heman-Ackah YD. How I do it: miniplate reconstruction of the lateral thyroid lamina: one-stage restoration of voice after teflon granuloma resection. *J Voice* 2005; 19(3):504-9.
20. Ford CN, Bless DM, Campbell D. Studies of injectable soluble collagen for vocal fold augmentation. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1987; 108(1):33-6.

21. Ford CN, Bless DM. Clinical experience with injectable collagen for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 1986; 96(8):863-9.
22. Ford CN, Bless DM. A preliminary study of injectable collagen in human vocal fold augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 94(1):104-12.
23. Belafsky PC, Postma GN. Vocal fold augmentation with calcium hydroxylapatite. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131(4):351-4.
24. Rosen CA, Thekdi AA. Vocal fold augmentation with injectable calcium hydroxylapatite: short-term results. *J Voice* 2004; 18(3):387-91.
25. Sato K, Umeno H, Nakashima T. Histological investigation of liposuctioned fat for injection laryngoplasty. *Am J Otolaryngol* 2005; 26(4):219-25.
26. Sasai H, Watanabe Y, Muta H, Yoshida J, Hayashi I, Ogawa M, Kubo T. Long-term histological outcomes of injected autologous fat into human vocal folds after secondary laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132(5):685-8.
27. Cantarella G, Mazzola RF, Domenichini E, Arnone F, Maraschi B. Vocal fold augmentation by autologous fat injection with lipostucture procedure. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132(2):239-43.
28. Tamura E, Kitahara S, Kohno N, Ogura M, Hiroi S. Use of freeze-dried autologous fascia to augment the vocal fold: an experimental study in dogs. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5):537-40.
29. Reijonen P, Lehtikoinen-Soderlund S, Rihkanen H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(6):523-9.
30. Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope* 1998; 108(5):725-31.
31. Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. *Laryngoscope*. 1998; 108(3):393-7.
32. Perazzo PSL, Duprat AC, Lancellotti C. Histological behavior of the vocal fold after hyaluronic acid injection. *J Voice* 2009; 23:95-8.
33. Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005; 26(33):6565-78.
34. Hoenich N. Cellulose for medical applications: past, present, and future. *BioResources* 2006; 1(2):270-80.

35. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007; 8(1):1-12.
36. Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(21):3955-63.
37. Martson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials* 1999; 20(21):1989-95.
38. Brown Jr. RM, Willison JH, Richardson CL. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73(12):4565-9.
39. Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials* 2006; 27(9):2141-9.
40. Fontana JD, De Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute.* *Appl Biochem Biotechnol.*1990; 24-25:253-64.
41. Costa HO, Souza FC. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida à lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. *Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia.* 2005; 23(3):23-7.
42. Sanchavanakit N, Sangrungraungroj W, Kaomongkolgit R, Banaprasert TM. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnology Progress.* 2006; 22(4):1194-9.
43. Panerari AD, Costa HO; Souza FC; Castro M; Silva L; Neto OMS Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol* 2008; 74(4):July/Aug.
44. Amorim WL, Costa HO, Souza FC, Castro MG, Silva L. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol* 2009; 75(2):Mar./Apr.
45. Costa HO, Kato M, Neto OMS, Silva L, Souza FC, Castro M. Avaliação da resposta tecidual da mucosa da orelha média de cobaias à presença de celulose bacteriana. Estudo experimental. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74(Jan/Fev).

46. Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. *Laryngoscope*. 1998; 108(3):393-7.
47. Milstein CF, Akst LM, Hicks MD, Abelson TI, Strome M. Long-term effects of micronized Alloderm injection for unilateral vocal fold paralysis. *Laryngoscope*. 2005; 115(9):1691-6.
48. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara-Koogan; 1991.
49. Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M. New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials*. 1995; 16(11):881-5
50. Costa HO, Pontes P, Silva L, Sarvat MA, Sousa FC. Cirurgia endolaringea cervicoscópica: estudo pré-clínico em animais. *Acta ORL* 2007; 25(2): 89-172.
51. Patel NJ, Kerschner JE, Merati AL. The use of injectable collagen in the management of pediatric vocal unilateral fold paralysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67(12):1355-60.
52. Hsiung MW, Lin YS, Su WF, Wang HW. Autogenous fat injection for vocal fold atrophy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260(9):469-74.
53. Sato K, Umeno H, Nakashima T. Histological investigation of liposuctioned fat for injection laryngoplasty. *Am J Otolaryngol* 2005; 26(4):219-25.
54. Rihkanen H, Kaliste E, Leivo I. Processing of fascia for vocal fold injection. A study in vitro and in paralyzed canine vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112(8):729-33.
55. Dahlqvist A, Garskog O, Laurent C, Hertegard S, Ambrosio L, Borzacchiello A. Viscoelasticity of rabbit vocal folds after injection augmentation. *Laryngoscope* 2004; 114(1):138-42.
56. Hertegard S, Hallen L, Laurent C, Lindstrom E, Olofsson K, Testad P, Dahlqvist A. Cross-linked hyaluronan used as augmentation substance for treatment of glottal insufficiency: safety aspects and vocal fold function. *Laryngoscope* 2002; 112(12):2211-9.
57. Kanemaru S, Nakamaru T, Omori K, et al: Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112:915-920.
58. Schadel A, Thun G, Stork L, Metzler R. Immunodiffusion and immunohistochemical investigations on the reactivity of oxide ceramic middle-ear implants. *ORL* 1993; 55:216-21.

59. Vince DG, Hunt JA, Williams DF. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials* 1991; 12:731-6.
60. Sevastjanova NA, Mansurova LE, Dombrovskaja LE, Slutskii LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials*. 1987.
61. Dormer KJ, Bryce GE, Hough JVD. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28(1):17-27.
62. Högset O, Bredberg G. Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. *Acta Otolaryngol* 1986; 101:445-52.
63. Williams KR, Blayney AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials* 1987; 8:254-8.
64. Merchant SN, Nadol Junior JB. Histopathology of ossicular implants. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27(4):813-33.
65. Schwager K, Geyer G. Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. *ORL* 1998; 60:322-8.
66. Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope*. 2001; 111(4 Pt 1):702-7.
67. Meijer AGW, Segenhout HM, Albers FWJ, van de Want HJL. Histopathology of biocompatible hydroxylapatite-polyethylene composite in ossiculoplasty. *ORL* 2002; 64:173-9.
68. Hoffmann KK, Kuhn JJ, Strasnick B. Bone Cements as Adjuvant Techniques for Ossicular Chain Reconstruction. *Otol Neurotol* 2003; 24:24-8.
69. Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M. Limitations of Titanium Dioxide and Aluminum Oxide as Ossicular Replacement Materials: An Evaluation of the Effects of Porosity on Ceramic Prostheses. *Otol Neurotol* 2004; 25:682–693.
70. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol* 2005; 26:563-6.
71. Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-Engineered Calcium Alginate Patches in the Repair of Chronic Chinchilla Tympanic Membrane Perforations. *Laryngoscope* 2006; 116:700-4.

2.2 Artigo 2

Revista Brasileira de Otorrinolaringologia

Rev. Bras. Otorrinolaringol. vol.74 no.4 São Paulo July/Aug. 2008

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos

Angelo D'urso Panerari^I; Henrique Olival Costa^{II}; Flávia Coelho de Souza^{III}; Marília Castro^{IV}; Leonardo da Silva^V; Osmar Mesquita de Sousa Neto^{VI}

^IMestrando em ORL pela Santa Casa de São Paulo, Médico otorrinolaringologista, Maringá, Paraná

^{II}Otorrinolaringologista, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, Doutor em Otorrinolaringologia, Prof. Adjunto do Depto de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo, Coordenador do programa de Pós-Graduação em ORL da Santa Casa de São Paulo

^{III}Mestre pela Escola Paulista de Medicina, veterinária responsável pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês

^{IV}Médica patologista, Patologista da Irmandade de Misericórdia da Santa Casa de São Paulo

^VDoutor em Otorrinolaringologia, Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

^{VI}Doutor em Otorrinolaringologia, Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

RESUMO

Dentre as causas de insucesso nas cirurgias para a estenose traqueal está a formação de tecidos de cicatrização exuberantes. O uso de curativos para evitar esta reação pode ser de grande valia nestes casos. A celulose bacteriana produzida por acetobacter xylinun pode ser útil nestes casos. Não há estudos na região laringotraqueal. **Objetivo:** Avaliar a resposta tecidual subglótica de coelhos após escarificação e colocação de curativo de celulose, comparando com grupo controle. **Forma de Estudo:** Experimental **Material e Métodos:** Foram estudados 26 coelhos, submetidos a escarificação da região laringotraqueal e tratados com curativo e comparados com controle. Foram estabelecidos 4 tempos de seguimento. Os seguimentos laringotraqueais foram examinados histologicamente e os resultados foram avaliados estaticamente. **Resultados:** O grupo de estudo evoluiu com o passar do tempo com resultados estatisticamente semelhantes ao do grupo controle, nos parâmetros Congestão vascular, Exsudato purulento, Inflamação aguda, Integridade do epitélio, Proliferação fibrosa e Reação granulomatosa. **Conclusão:** Não foram observadas diferenças entre os grupos controle e estudo quanto aos parâmetros inflamatórios ou cicatriciais. Não houve sinais inflamatórios relacionados ao uso da membrana de celulose que não tivessem ocorrido devido ao traumatismo cirúrgico.

Palavras-chave: Celulose, cicatrização, coelho, traquéia.

INTRODUÇÃO

A estenose das vias aéreas superiores tem se mantido como um problema de difícil resolução na prática otorrinolaringológica, tendo sua prevalência aumentada devido ao advento das unidades de cuidados intensivos que propiciaram melhores condições de sobrevivência a pacientes que outrora teriam um provável êxito fatal. Dentre as causas da lesão laríngea e traqueal temos: entubação prolongada, traqueostomia, irradiação para tumores na orofaringe e laringe, trauma externo, causas idiopáticas, sendo que diversos procedimentos cirúrgicos são necessários para seu tratamento^{1,2}. A traqueostomia ocorre em cerca de 10 % dos pacientes com lesão cerebral e em torno de 50 a 70% dos pacientes com graduação menor que nove na escala de coma de Glasgow, sendo que a complicação tardia mais freqüente da traqueostomia é a estenose laríngea e traqueal, que ocorre em cerca de 15%³. Quando a estenose adquirida cicatricial ou mesmo congênita atinge a região subglótica, o tratamento cirúrgico muitas vezes é necessário devido às grandes repercussões clínicas que pode acarretar, levando à limitação ou mesmo impossibilidade ventilatória e disfonia.

As técnicas utilizadas no tratamento cirúrgico desta afecção são as mais variadas, o que indica que nenhuma atinge um grau de satisfação suficiente para todos os casos. Dentre os procedimentos usados podemos agrupar 4 categorias: ressecção completa e anastomose término-terminal da traquéia, ressecção do tecido cicatricial com ou sem revestimento da área cruenta, incisão da região estenótica e ampliação de suas paredes anterior e/ou posterior com colocação de enxertos livres ou pediculados e, finalmente, dilatação pura e simples⁴⁻⁶.

Todas as técnicas têm um grau de sucesso e insucesso, entretanto, há evidências de que a formação de tecido de granulação exuberante sobre a área de tratamento seja um dos principais motivos dos insucessos por re-estenose⁷⁻¹².

As principais maneiras de se evitar o crescimento deste tipo de tecido têm sido as prevenções de infecção, o uso de enxertos para a substituição do epitélio de revestimento e a colocação de moldes².

A substituição do tecido ressecado evita a formação de área cruenta e conseqüente crescimento de tecido de granulação, um dos fatores com maior impacto no prognóstico da terapia deste problema. Entretanto, as técnicas cirúrgicas que têm como objetivo o revestimento da área cruenta com o uso de enxerto de pele ou de mucosa proporcionam um aumento do tempo cirúrgico e da morbidade, com o acréscimo temporal da obtenção do enxerto em outro sítio e da colocação deste na área estenosada^{13,14}.

A possibilidade de utilização de tecido que possa favorecer uma cicatrização mais natural, que ofereça um formato adequado e tubular à porção subglótica da laringe e que dispense a necessidade da sua obtenção em outro sítio pode ser de grande valia no tratamento desta difícil afecção médica.

Curativos para ferimentos de pele têm sido considerados em sua maioria dispositivos passivos que oferecem a função de barreira interina e estabelecem um ambiente úmido. Uma geração nova de dispositivos, projetada para interagir com a ferida e promover a formação de tecido novo vem sendo desenvolvida atualmente e está sendo testada. Dentre estes dispositivos temos aqueles compostos por celulose de *Acetobacter xylinun* (Bionext®).

A celulose bacteriana é uma membrana flexível, semitransparente, de cor amarelada, usada como substituto temporário de pele, composto de polissacarídeos, sintetizados por bactéria do gênero *acetobacter*, sendo biodegradável, não-tóxico, não-pirogênico e estéril. Este composto tem sido utilizado com sucesso como curativo em escaras de pele, queimaduras, dermatabrasões e áreas doadoras de pele. Também foi utilizado como substituto de meninge e como material de revestimento de stents intravasculares para evitar estenose circunferencial em artérias de largo calibre.

Ante o exposto acima observamos que apesar de existirem diversas medidas e técnicas cirúrgicas para se prevenir a cicatrização exagerada e tratar os casos de estenose, nenhuma apresentou resultado satisfatório para todos os casos. Associado a isso, evidenciamos o fato que os procedimentos cirúrgicos que utilizam enxerto aumentam o tempo cirúrgico e a morbidade para sua obtenção, logo um curativo ideal seria aquele que prevenisse a cicatrização exagerada, não promovesse reação de corpo estranho, não tivesse a necessidade de realizar sua obtenção em outro sítio corpóreo, nem de realizar a sua retirada posterior do local onde foi implantado.

As características físicas e de biocompatibilidade do Bionext®, assim como a facilidade de colocação, e a provável dispensa de procedimento para sua remoção posterior podem ser vantajosos nos casos em que evidenciamos uma cicatrização exagerada.

Como o uso de material com estas propriedades ainda não foi investigado em situações que evidenciamos um processo cicatricial exacerbado e o fato dos testes em animais não incluírem sua avaliação na traquéia e subglote, entendemos que seja necessário avaliar a resposta tecidual ao Bionext® como curativo temporário em lesão desepitelizada da região subglótica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta tecidual da mucosa da região subglótica de coelhos após escarificação quando receptora do curativo de celulose produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum*.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos animais

Após aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICAO - processo 03/2005, o estudo foi realizado no biotério do Instituto de Ciências Avançadas em ORL com supervisão e acompanhamento veterinário, sendo que os coelhos permaneceram em gaiolas, com livre acesso à água e à ração comercial padronizada, não necessitando de jejum pré-operatório.

Foram selecionados 26 coelhos, adultos, de ambos os sexos, com peso mínimo de 1700 gramas, todos em bom estado nutricional.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética da Unidade de Técnica Cirúrgica Experimental da Santa Casa de São Paulo obedeceu às normas da Lei Federal nº 6.638 de oito de maio de 1979 e aos princípios éticos na experimentação, postulados pelo Código Brasileiro de Experimentação em animais (COBEA). O número de animais utilizado para o estudo seguiu as sugestões do National Institute of Health que considera ser adequada uma amostra de 6 a 10 animais por grupo quando o estudo for preliminar de sondagem (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/faqs.htm>).

Todos os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, de acordo com técnica a ser descrita a seguir.

Detalhamento dos procedimentos

Seleção e tamanho da amostra

Os animais utilizados foram coelhos adultos de quatro meses de idade com peso que variava entre 1700 e 3250 g. Apesar da grande variação do peso a luz laríngea era semelhante por se tratarem de animais adultos.

Para o grupo controle utilizamos oito animais, dois para cada tempo de seguimento, e para o grupo de estudo utilizamos 16 animais, quatro para cada período de seguimento, além de dois animais para o tempo zero que foi considerado controle positivo da técnica de desepitelização.

Os animais foram alocados aleatoriamente entre grupo controle e de estudo após terem sido submetidos à desepitelização.

A decisão sobre a alocação nos grupos de tempo de seguimento foi realizada por meio de sorteio, no dia final de cada período.

Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia intramuscular, utilizando Zoletil[®] (Cloridrato de Tiletamina 125/5 mL e Cloridrato de Zolazepan 125/5 mL), na dose de 0,4 mL/kg e Nilperidol[®] (Citrato de Fentanila + Droperidol).

Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, sem a necessidade de assistência ventilatória.

Realizamos a tricotomia da região cervical anterior, estendendo-a desde a mandíbula até a fúrcula externa. A anti-sepsia foi realizada na área cervical anterior com Polvidine[®]. A incisão foi realizada na linha mediana, a partir da margem superior da cartilagem tireóidea até cerca de 0,5 cm abaixo da margem inferior da cartilagem cricóidea, utilizando bisturi de lâmina 15, na pele e no tecido celular subcutâneo. A incisão permitiu a exposição das cartilagens tireóide, cricóidea e traqueal. A anestesia geral foi complementada com xilocaína 2% associada a vasoconstritor que foi aplicada no tecido subcutâneo, momentos antes de realizarmos as incisões.

A membrana cricotireóidea foi incisada na linha mediana, com bisturi de lâmina 15, permitindo a visualização da região infraglótica. As cartilagens tireóidea e cricóidea abertas permitiram a exposição das luzes laríngea e traqueal.

O animal foi mantido em ventilação espontânea por meio da incisão laríngea, sem necessidade de cânula traqueal.

Realizada a exposição das luzes laríngea e traqueal, realizamos a remoção com cureta até ocorrer a desepitelização, evidenciada pela presença de sangramento, da mucosa de parte da porção posterior da região infraglótica, estendendo por cerca de 1 cm na direção caudal e por cerca de 2 mm no sentido látero-lateral (Figura 1). Este método descrito por Branski et al. (2005) e Loewen et al. (2001) atingiu mais de 50% de estenose laringotraqueal em coelhos nas mãos dos autores.



FIGURA 1. Peça removida com local da ressecção de mucosa traqueal

Após a hemostasia, realizamos um sorteio com as seguintes possibilidades:

- a) fim do procedimento e alocação em grupo controle de desepitelização;
- b) fim do procedimento e alocação em grupo de controle de cicatrização;
- c) colocação de celulose bacteriana de *Acetobacter xylinun* (Bionext®) e alocação em grupo de estudo de curativo de celulose.

Posterior ao sorteio, o animal considerado para os grupos A e B, foi acordado e o procedimento considerado finalizado, após o fechamento da cartilagem tireóide e cricóideia, da membrana cricotireoidea e da pele com fios de Nylon 5-0. O animal considerado para o grupo C teve uma folha de celulose inserida e apoiada sobre a superfície desepitelizada até que aderisse à área cruenta do plano de ressecção.

Após a aderência do curativo realizamos o fechamento da cartilagem tireóide e cricóideia, da membrana cricotireoidea e da pele com fios de Nylon 5-0 e o animal foi acordado.

Todos os coelhos receberam antibioticoterapia com clindamicina 0,1 ml/kg no momento da anestesia e no pós-operatório imediato.

Grupos de seguimento

Foram distribuídos animais em grupos controle e de estudo, sendo que no pós-operatório imediato tivemos dois animais sacrificados para avaliação das condições de desepitelização pelo método sem que houvesse processo cicatricial. Os animais considerados para este controle foram sorteados após cada procedimento de desepitelização de maneira a não termos idéia de qual seria o animal a ser estudado. O momento da alocação ocorreu logo após a retirada do epitélio de maneira que pudéssemos continuar o procedimento com a colocação da celulose se esta fosse a determinação do sorteio.

Foram criados quatro grupos de seguimento para os grupos controle e estudo. Para a alocação nos grupos houve um sorteio no dia anterior ao sacrifício que determinou quais seriam os animais a compor o grupo.

O grupo de estudo 1 foi aquele onde os animais tiveram uma semana de sobrevida e contou com quatro animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com dois animais.

O grupo de estudo 2 foi aquele onde os animais tiveram um mês de sobrevida e contou com quatro animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com dois animais.

O grupo de estudo 3 foi aquele onde os animais tiveram três meses de sobrevida e

contou com quatro animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com dois animais.

O grupo de estudo 4 foi aquele onde os animais tiveram 6 meses de sobrevivência e contou com quatro animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com dois animais. Os animais que compuseram este grupo foram os remanescentes do estudo.

Ao final do tempo de seguimento, os animais foram novamente pré-anestesiados e receberam tiopental sódico EV (dose 40 mg/kg), associado a 2 mL de KCl 19,1% (cloreto de potássio), para eutanásia.

Após a eutanásia, realizamos abertura longitudinal da região cervical dos animais e, através de laringectomia total convencional associada à remoção do terço superior da traquéia a peça de estudo foi obtida. O produto da laringotraqueoectomia foi encaminhado para exame anatomopatológico.

Avaliação anatomopatológica

Toda a região infraglótica, compreendendo desde o ventrículo laríngeo, acima da borda livre das pregas vocais até 4 cm abaixo dele foi submetido a exame histopatológico (Figuras 2 e 3).

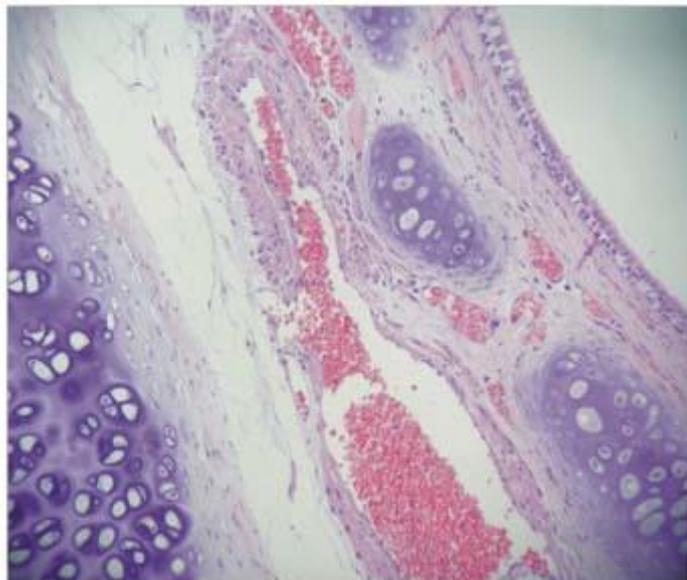


FIGURA 2. Congestão vascular moderada. HE 40X

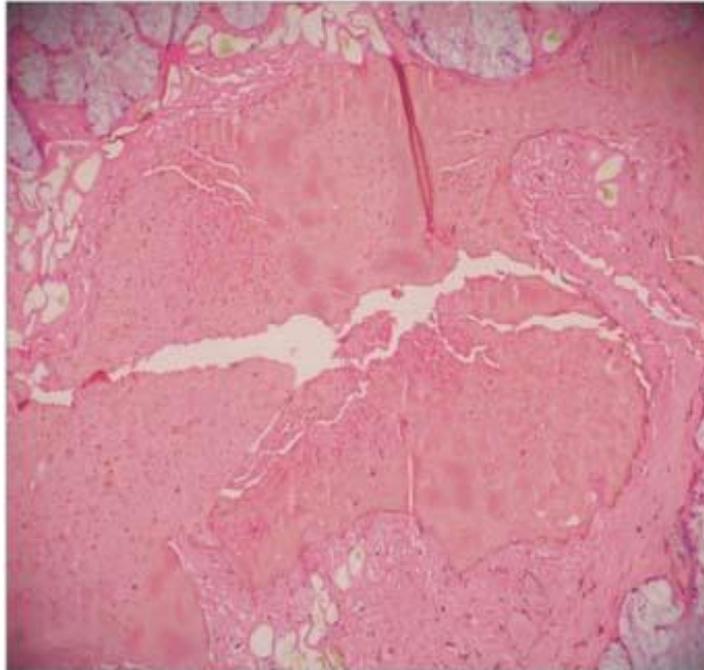


FIGURA 3. Congestão vascular intensa

O produto da laringotraqueoectomia dos coelhos alocados no grupo controle positivo de desepitelização foi submetido à análise histológica sendo evidenciada a remoção completa da mucosa subglótica como lesão atingindo a lâmina própria e pericôndrio através do procedimento padrão realizado.

Foram avaliados o grau de cicatrização e fibrose e as condições inflamatórias encontrados em cada espécime.

Os parâmetros definidores de condição inflamatória foram: Congestão vascular (abertura de novos capilares e dos leitos venulares locais, dilatação excessiva dos vasos existentes e concentração com aglutinação de hemácias em seu interior), Exsudato purulento (presença de células fagocíticas mortas ou com presença de microorganismos em seu interior), Inflamação aguda (presença de polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e plasmócitos, associada a edema por extravasamento).

Os parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose, considerados de cura por segunda intenção, foram: Integridade do epitélio (presença ou ausência de úlcera no epitélio de revestimento, modificação de volume da camada de revestimento e/ou metaplasia), Proliferação fibrosa (presença de fibroblastos acumulados ou no permeio de tecido conjuntivo), Reação granulomatosa (acúmulo de exsudato inflamatório com predomínio de fibroblastos e reação vascular associada).

Cada um dos parâmetros foi categorizado, sendo classificados em:

- Congestão vascular: ausente (0), discreta (1) e intensa (2);
- Exsudato purulento: (0) ausente, (1) presente.
- Inflamação aguda: (0), ausente, (1), presente.
- Integridade do epitélio: (0) conservado, (1) descamado.
- Proliferação fibrosa: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada.
- Reação granulomatosa (0), ausente, (1) presente.

A luz traqueal foi mensurada com medidas nos diâmetros anteroposterior e transversal.

As lâminas foram preparadas por um único patologista e a avaliação histológica realizada por um único profissional a partir de uma padronização prévia entre um médico otorrinolaringologista e um médico patologista, a qual foi determinada após serem analisadas todas as lâminas.

Tanto os valores individuais quanto as médias dos resultados foram considerados para a análise estatística.

Análise estatística

Os resultados encontrados foram comparados entre os grupos de estudo e controle por meio de análise de variância e teste T de Student entre os grupos, para os parâmetros com valores contínuos como diâmetro da luz infraglótica e por meio de teste de Spearman, não-paramétrico, para as variáveis não contínuas como, parâmetros inflamatórios e de cicatrização e fibrose.

RESULTADOS

Após a análise histológica das lâminas agrupamos nas Tabelas 1 a 8 os parâmetros definidores de condição inflamatória entre o os coelhos do grupo controle e de estudo comparando os resultados em relação ao tempo de pós-operatório.

TABELA 1. Parâmetros definidores de condição inflamatória entre grupo de estudo e controle no 7º dia pós-operatório (grupo I)

Coelho	Congestão Vascular		Exsudato Purulento		Inflamação	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	1	2	0	0	0	0
2	1	2	0	0	0	0
3		2		0		0
4		2		0		0

Legenda: Congestão vascular - 0: ausência, 1: discreto, 2: intenso; Exsudato purulento - 0: ausente, 1: presente; Inflamação aguda - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 2. Parâmetros definidores de condição inflamatória entre grupo de estudo e controle no 30º dia pós-operatório (grupo II)

Coelho	Congestão Vascular		Exsudato Purulento		Inflamação	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	1	2	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0
3		1		0		0
4		0		0		0

Legenda: Congestão vascular - 0: ausência, 1: discreto, 2: intenso; Exsudato purulento - 0: ausente, 1: presente; Inflamação aguda - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 3. Parâmetros definidores de condição inflamatória entre grupo de estudo e controle no 90º dia pós-operatório (grupo III)

Coelho	Congestão Vascular		Exsudato Purulento		Inflamação	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	1	0	1	0	1	1
2	1	2	1	0	1	0
3		1		0		1
4		0		0		0

Legenda: Congestão vascular - 0: ausência, 1: discreto, 2: intenso; Exsudato purulento - 0: ausente, 1: presente; Inflamação aguda - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 4. Parâmetros definidores de condição inflamatória entre grupo de estudo e controle no 180º dia pós-operatório (grupo IV)

Coelho	Congestão Vascular		Exsudato Purulento		Inflamação	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	1	1	1	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0
3		0		0		0
4		0		0		0

Legenda: Congestão vascular - 0: ausência, 1: discreto, 2: intenso; Exsudato purulento - 0: ausente, 1: presente; Inflamação aguda - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 5. Parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose entre o grupo controle e de estudo e controle no 7º dia pós-operatório (grupo I)

Coelho	Integridade do Epitélio		Proliferação Fibrosa		Reação Granulomatosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	0	0	0	2	0	0
2	0	0	0	2	0	0
3		0		0		0
4		1		1		0

Legenda: Integridade do epitélio - 0: conservado, 1: descamado; Proliferação fibrosa - 0: ausente, 1: leve, 2: moderado; Reação granulomatosa - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 6. Parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose entre o grupo controle e de estudo e controle no 30º dia pós-operatório (grupo II)

Coelho	Integridade do Epitélio		Proliferação Fibrosa		Reação Granulomatosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	0	0	0
3		0		0		0
4		0		0		0

Legenda: Integridade do epitélio - 0: conservado, 1: descamado; Proliferação fibrosa - 0: ausente, 1: pericartilagem, 2: estende ao tecidos moles; Reação granulomatosa - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 7. Parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose entre o grupo controle e de estudo e controle no 90º dia pós-operatório (grupo III)

Coelho	Integridade do Epitélio		Proliferação Fibrosa		Reação Granulomatosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0
3		0		0		1
4		0		0		0

Legenda: Integridade do epitélio - 0: conservado, 1: descamado; Proliferação fibrosa - 0: ausente, 1: pericartilagem, 2: estende ao tecidos moles; Reação granulomatosa - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 8. Parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose entre o grupo controle e de estudo e controle no 180º dia pós-operatório (grupo IV)

Coelho	Integridade do Epitélio		Proliferação Fibrosa		Reação Granulomatosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3		0		0		0
4		0		0		0

Legenda: Integridade do epitélio - 0: conservado, 1: descamado; Proliferação fibrosa - 0: ausente, 1: pericartilagem, 2: estende ao tecidos moles; Reação granulomatosa - 0: ausente, 1: presente.

TABELA 9. Comparação dos grupos de estudo e controle por teste de Spearman os parâmetros de congestão vascular, exudato purulento e inflamação aguda

	Congestão Vascular		Exsudato Purulento		Inflamação Aguda	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
N	8	16	8	16	8	16
Média aritmética	1,0909	0,9444	0,0909	0,1667	0,1818	0,222
Intervalo de confiança de 95%	0,5325 a 1,6493	0,5454 a 1,3435	-0,1116 a 0,2935	-0,0240 a 0,3574	-0,0899 to 0,4536	0,0095 a 0,4350
Variância	0,6909	0,6438	0,0909	0,1471	0,1636	0,1830
Desvio padrão	0,8312	0,8024	0,3015	0,3835	0,4045	0,4278
Teste de razão de variância (Teste F)		1,0732		1,6176		1,1184
p		0,863		0,443		0,885

TABELA 10. Comparação dos grupos de estudo e controle por teste de Spearman os parâmetros de integridade do epitélio, proliferação fibrosa e reação granulomatosa

	Integridade Do Epitélio		Proliferação Fibrosa		Reação Granulomatosa	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
N	8	16	8	16	8	16
Média aritmética	0,1818	0,222	0,2727	0,500	0,0909	0,0556
Intervalo de confiança de 95%	-0,0899 to 0,4536	0,0095 a 0,4350	-0,1617 to 0,7072	0,0736 a 0,9264	-0,1116 to 0,2935	-0,061 a 0,1728
Variância	0,1636	0,1830	0,4182	0,7353	0,0909	0,0556
Desvio padrão	0,4045	0,4278	0,6467	0,8575	0,3015	0,2357
Teste de razão de variância (Teste F)	1,1184		1,7583		1,6364	
p	p = 0,885		0,366		0,357	

Os resultados encontrados por meio do teste de Spearman, não-paramétrico, para as variáveis não-contínuas como parâmetros inflamatórios e de cicatrização e fibrose se encontram nas Tabelas 9 e 10.

DISCUSSÃO

A celulose tem se mostrado um excelente curativo biológico. O seu uso na área médica vem aumentando, na medida em que aumenta o uso de materiais biológicos como curativos em tecidos lesionados ou doentes, pois devido a sua estrutura única e suas propriedades a celulose produzida por *Acetobacter xylinun* é um candidato natural a ser utilizado em diversas áreas da medicina em que se tenha como objetivo a restauração tecidual. Este composto tem sido utilizado como curativo em escaras de pele, queimaduras, dermabrasões e áreas doadoras de pele, sendo usado como substituto de meninge e como material de revestimento de stents intravasculares para evitar estenose circunferencial em artérias de largo calibre¹⁵.

Já a estenose das vias aéreas superiores tem se tornado um problema cada vez mais freqüente com o avanço de técnicas que propiciem uma diminuição da mortalidade, porém um aumento da morbidade. Existem diversas formas de tratamento de estenose de laringe, porém nenhuma delas atinge um resultado suficientemente satisfatório, logo vários estudos têm sido realizados no intuito de obter técnicas ou fatores que propiciem uma redução na incidência de estenoses desta área.

Como o curativo de celulose tem sido empregado com resultados promissores em outras áreas foi realizado estudo que se propunha realizar uma comparação do processo cicatricial após escarificação da região subglótica de coelhos com o uso de curativo de celulose (Bionext®) em relação à cicatrização espontânea.

Para tanto, procuramos estabelecer um modelo de escarificação a partir de métodos já utilizados e descritos na literatura. Diversas variáveis foram observadas tais como:

- a) tipo e idade do animal utilizado
- b) métodos de se realizar a escarificação da região subglótica
- c) quantidade de animais no grupo de estudo e controle

a) Tipo e idade do animal - Os animais utilizados no trabalho foram coelhos de ambos os sexos adultos, fato semelhante ao que ocorre em diversos trabalhos na literatura que utilizam esses animais por apresentarem a via aérea semelhante a dos seres humanos e serem animais de fácil manuseio e de baixo custo em relação aos animais de porte maior¹⁶⁻¹⁹.

Os animais apresentavam peso que variava entre 1700 e 3250 gramas. Apesar desta diferença considerável entre os pesos, não detectamos alterações significativas na estrutura da região subglótica, por se tratarem de animais em idade adulta, fato confirmado por outros estudos já realizados²⁰.

b) métodos de escarificação da região subglótica - o método adotado para promover a escarificação da subglote foi baseado em técnicas já utilizadas na literatura que obtiveram índices significativos de promoção de estenose da subglote e traquéia proximal e tiveram como princípio promover um dano que se aprofundasse até a lâmina própria e atingisse o pericôndrio, pois os trabalhos relatam que o fator principal para se promover uma reação inflamatória intensa e um processo de estenose é a profundidade da lesão, independente da idade do animal e da extensão circunferencial da lesão^{16,11,20}.

c) quantidade de animais no grupo de estudo e controle - A quantidade de animais escolhidos e a sua distribuição entre os grupos de estudo e controle foi baseada em resultados estatísticos de trabalhos da literatura em que foram utilizados métodos de escarificação da região subglótica e traqueal em coelhos, com obtenção de estenose dessa região em média de 50% dos animais submetidos ao processo traumático^{16,18,19}. Perante tais resultados selecionamos dois coelhos para o grupo controle e quatro coelhos para o grupo de estudos, na expectativa de que pelo menos um em cada dois coelhos apresentasse uma reação cicatricial exacerbada, podendo avaliar a eficácia do curativo de celulose na prevenção de uma cicatrização mais intensa.

Consideramos este um trabalho piloto e, por isso nossa amostra de animais foi reduzida. Acreditamos que no futuro possamos utilizar um grupo maior de animais para fazermos testes comparativos entre tratamentos conhecidos de estenose laringotraqueal.

Apesar de seguirmos as técnicas de escarificação já descritas na literatura e promovermos uma lesão que se aprofundasse até a lâmina própria e atingisse o pericôndrio, não conseguimos obter um processo cicatricial que evoluísse para uma cicatrização hipertrófica ou para estenose em nenhum dos coelhos. Este fato limitou o objetivo do trabalho ao estudo da resposta tecidual da mucosa da região subglótica após escarificação quando receptora do curativo de celulose produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum*.

Em relação à condição inflamatória, analisamos os seguintes critérios: congestão vascular, exsudato purulento e inflamação aguda:

a) Congestão vascular (Figuras 4, 5 e 6) - em nosso trabalho encontramos nos coelhos do grupo com o curativo de celulose uma congestão vascular intensa nos primeiros sete dias de pós-operatório, sendo que nos coelhos do grupo controle do mesmo período tal congestão foi classificada como discreta. Com o passar do tempo o grupo controle manteve a congestão vascular discreta em todos os grupos acompanhados, sendo que no grupo com 180 dias de pós-operatório, apresentou um dos coelhos com congestão vascular discreta e o outro coelho não apresentou congestão vascular.

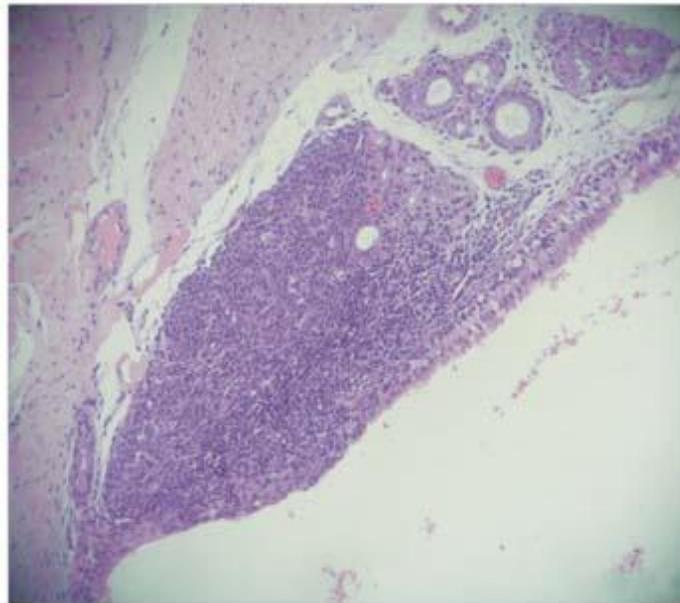


FIGURA 4. Processo inflamatório agudo intenso. HE 40X

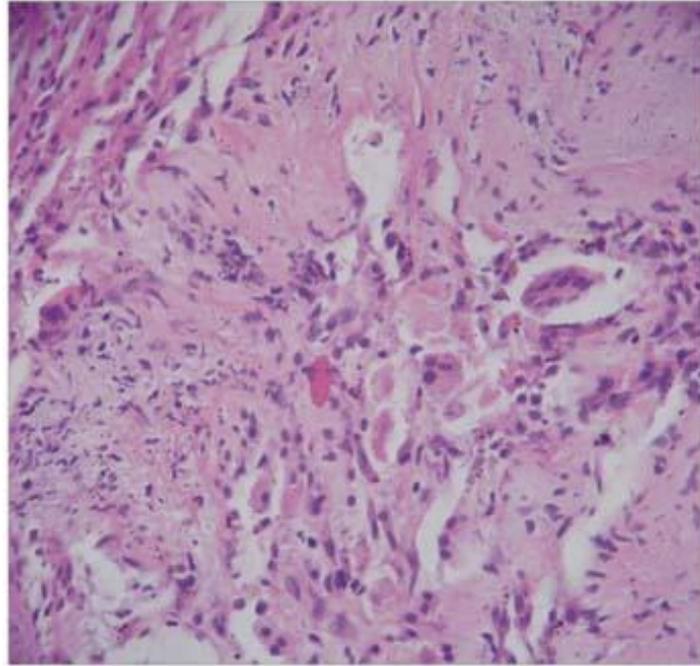


FIGURA 5. Reação de corpo estranho na mucosa traqueal. HE 100X

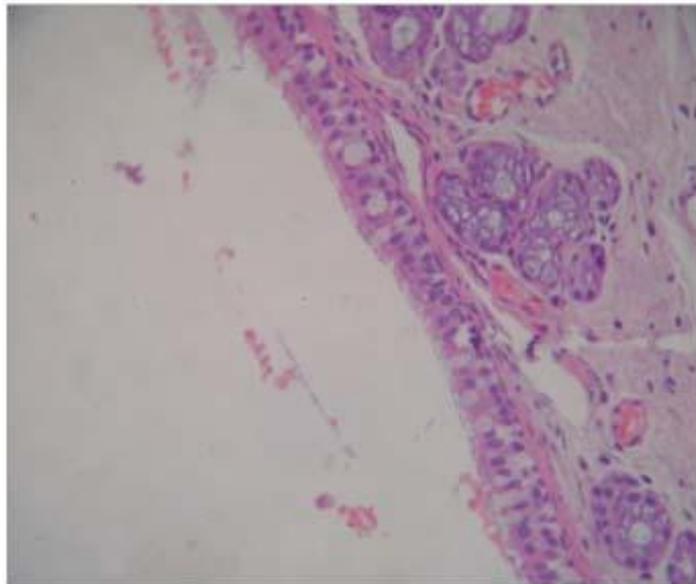


FIGURA 6. Mucosa com epitélio íntegro. HE 100X

Já o grupo de estudo evoluiu com o passar do tempo com resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo controle, sendo que no grupo com 180 dias de pós-operatório apenas um coelho apresentou congestão vascular discreta e o restante não mostrou congestão vascular, o que evidencia que apesar de num primeiro momento o curativo promover uma exacerbação da congestão vascular e conseqüentemente do processo inflamatório, esse processo logo fica semelhante ao processo cicatricial espontâneo, fato que é compatível com os estudos que analisam

a biocompatibilidade de enxertos, que revelam a ocorrência de edema e reação inflamatória ao redor do implante nos primeiros dias, ocorrendo melhora com a evolução do tempo^{21,22}.

Esse resultado é semelhante aos dos outros estudos experimentais com a celulose que evidenciam que tal curativo não afeta a intensidade e o tempo de cicatrização²³⁻²⁶.

b) Exsudato purulento - não houve, em todos os períodos analisados, diferenças estatisticamente significantes entre o exsudato purulento dos membros do grupo controle submetidos apenas a escarificação da região da subglote e os casos submetidos à escarificação e colocação do curativo de celulose, pois não houve formação de exsudato purulento em nenhum dos coelhos estudados. A formação de exsudato purulento é um sinal de reação inflamatória exacerbada causada pela falha de um biomaterial em oferecer biocompatibilidade, promovendo assim uma resposta inflamatória insatisfatória, pois o principal aspecto da biocompatibilidade é a resposta tecidual local²⁷.

O fato de não ocorrer a formação do exsudato purulento, demonstra a boa resposta do organismo a este curativo, que evitaria desta maneira a formação de processo inflamatório exacerbado e conseqüente possibilidade maior de se estabelecer um processo de estenose. Tal característica pode ser em virtude das características do curativo de celulose produzida pelo *Acetobacter xylinum*. Dentre estas temos o fato de apresentar poros pequenos o bastante para impedir a entrada de bactérias, mas grande o suficiente para que o tecido tenha uma adequada aeração, protegendo assim o tecido enquanto o organismo renova a mucosa por baixo dele.

O resultado encontrado vem ao encontro dos achados de outros estudos experimentais com o curativo de celulose, que não mostraram exsudato purulento de forma estatisticamente significativa²³⁻²⁶.

c) Inflamação aguda (Figura 7) - em nosso estudo não houve, em todos os períodos analisados, diferenças estatisticamente significantes entre a resposta inflamatória dos membros do grupo controle submetido apenas a escarificação e os casos submetidos à escarificação e colocação do curativo de celulose. Portanto, o curativo de celulose não foi um agravante na reação inflamatória, sendo o curativo de celulose inerte e sua presença um fator não agravante do processo inflamatório, dado este semelhante ao descrito em outros trabalhos, que evidenciaram através de resultado histológicos que o curativo de celulose não prolongava o processo inflamatório em estudos experimentais^{15,26}.

Na evolução do processo inflamatório não houve diferenças estatisticamente significantes, em relação à sua intensidade, entre os grupos de sete, trinta, noventa e cento e oitenta dias, tanto no grupo controle como nos casos com enxerto de celulose, sendo que ocorreu processo inflamatório leve em apenas um coelho do

grupo controle com 30 dias de pós-operatório, no restante não foi detectada inflamação.

Já no grupo de estudo o fato se repetiu com exceção do grupo III (90 dias de pós-operatório) que apresentou dois coelhos com processo inflamatório com discreta presença de polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, associado a discreto edema local, sendo tal fato não significante estatisticamente.

Esses achados demonstram que apesar da escarificação da região subglótica seguir os princípios das técnicas descritas na literatura e atingir as camadas mais profundas dessa região, mostrou ser um procedimento pouco efetivo¹⁶⁻²⁰. Dessa forma, tal técnica não proporcionou uma reação inflamatória significativa, que não foi exacerbada pela presença do curativo de celulose.

O fato da presença de curativo de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório deve-se às suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície, consistência e propriedades químicas, que promovem uma melhor reação tecidual, não perpetuando o processo inflamatório²³⁻²⁵. Um dos aspectos importantes é a capacidade do curativo em conter exsudato em seu interior, formando dessa maneira um gel aderente que é efetivo para encapsular e imobilizar populações bacterianas potencialmente patogênicas, que promoveriam um processo infeccioso e conseqüente exacerbação e prolongamento da inflamação.

Os parâmetros definidores de grau de cicatrização e fibrose, considerados de cura por segunda intenção foram:

- a) integridade de epitélio,
- b) proliferação fibrosa,
- c) reação granulomatosa.

a) Integridade do epitélio no trabalho realizado não houve diferenças estatisticamente significantes entre o tempo necessário para se detectar a integridade do epitélio dos membros do grupo controle e estudo.

Todos os coelhos do grupo controle apresentaram epitélio íntegro no momento de estudo. Já no grupo de estudo observamos epitélio descamado em apenas um coelho no grupo com sete dias de pós-operatório e em um coelho no grupo com noventa dias de pós-operatório.

A integridade do epitélio é um importante parâmetro definidor de cicatrização e cura por segunda intenção e a regeneração tecidual deste tecido é um processo de intensa restauração e reorganização dos vários tecidos envolvidos neste processo conforme concluído em outros experimentos^{1,4,28}. A ausência de uma diferença

estatisticamente significativa deste parâmetro é um dado importante que evidencia um não prolongamento e cronificação da resposta inflamatória nos casos com o uso de curativo de celulose, que se ocorresse evoluiria para o rompimento do tecido, podendo levar à extrusão do enxerto e alterações significativas do epitélio. Tal fato demonstra que o curativo de celulose não promove uma reposta tecidual exacerbada que poderia ser um fator desfavorável para o seu uso em estudos seguintes.

b) Proliferação fibrosa: ao compararmos a presença de fibrose nos casos com o curativo de celulose e controle, não detectamos diferenças estatísticas nos grupos de tempo analisados. Nos coelhos do grupo de sete dias com o curativo de celulose houve proliferação fibrosa em três animais, sendo moderada em dois e discreta em um dos coelhos. Já nos coelhos do grupo controle do mesmo período tal proliferação fibrosa não foi observada. Com o passar do tempo o grupo de estudo não apresentou mais proliferação fibrosa em nenhum dos grupos estudados.

Já o grupo controle de todos os grupos estudados apresentou apenas um coelho com proliferação fibrosa moderada, o qual se encontrava no grupo de 90 dias de pós-operatório, tendo o restante ausência de proliferação fibrosa.

A presença de proliferação fibrosa evidenciada apenas em coelhos do grupo I de estudo sem apresentar tal ocorrência na evolução do processo inflamatório leva-nos a concluir que presença do enxerto pode induzir a uma proliferação fibrosa inicial, porém com o passar dos dias evoluiu para um processo cicatricial semelhante ao espontâneo.

Esses achados são semelhantes aos encontrados em outros estudos que usaram o curativo de celulose em outros animais e regiões corpóreas e evidenciaram as vantagens do curativo de celulose no processo cicatricial, promovendo uma melhora da cicatrização em feridas com cicatrização alterada²³.

Outros estudos evidenciaram que o uso do Bionext[®] não altera a velocidade nem a força de cicatrização, concluindo que o curativo atua de forma positiva no processo cicatricial^{20-23,25,27}.

c) Reação granulomatosa: em nosso trabalho não detectamos diferenças significativas entre o grupo controle e os casos com o curativo de celulose em nenhum dos tempos analisados: sete dias, um mês, três meses e seis meses.

No grupo controle, em nenhum dos coelhos estudados houve reação granulomatosa. Já no grupo de estudo evidenciamos a formação de reação granulomatosa apenas em dois coelhos no grupo com 90 dias de pós-operatório, sendo que o restante dos coelhos evoluiu sem a formação de granuloma.

A ausência de reação granulomatosa evidencia uma resposta favorável do tecido hospedeiro ao implante do curativo, pois segundo a literatura a reação de

biocompatibilidade trata-se de uma resposta de reação de corpo estranho e de reação cicatricial, que pode progredir para uma resposta favorável com a formação de uma fina cápsula fibrosa, envolvendo o implante e/ou crescimento de tecido dentro do biomaterial, ou evoluir para uma reação contínua, inflamatória crônica caracterizada por formação de cápsula fibrosa espessa, granulação e rompimento do tecido com subsequente formação de abscesso ou fístula, culminando com extrusão do enxerto e alterações neoplásicas.

Tal achado é compatível com estudos realizados com o curativo de celulose em outros trabalhos experimentais como o de Cohn, que utilizou e comparou um curativo de hidrofibra de celulose e gaze hidratada com solução salina e não evidenciou prolongamento do processo inflamatório e conseqüente retardo da cicatrização.

Resultado semelhante de Costa e Souza (2005), quando analisaram a cicatrização de pele de porcos *large White* comparando o uso do Bionext[®] ao curativo local diário não observando diferenças na evolução do processo inflamatório e da cicatrização entre as lesões.

Portanto, o curativo de celulose não foi um agravante na reação granulomatosa, logo o Bionext[®] é um curativo inerte e sua presença não agrava ou prolonga este processo, fato que se assemelha aos achados de outros estudos realizados com esse curativo^{20-23,27}.

Como um dos principais conceitos do tratamento das estenoses subglóticas e traqueais é a necessidade de revestimento das áreas cruentas, sempre associado à ampliação da luz traqueal, o uso de uma membrana, biologicamente inerte, não associada à resposta inflamatória e infecciosa pode ser de grande utilidade em estudos futuros, já que os achados do trabalho realizado são compatíveis com outros estudos com curativo de celulose em animais.

Frente a isso podemos levantar algumas perspectivas e vantagens em relação ao curativo de celulose tais como:

- Trata-se de um substituto viável em laringologia.
- Requer menor tempo e morbidade cirúrgica, pela sua facilidade de manipulação e pelo fato de não haver a necessidade de obtenção do curativo em outra área doadora.
- Tem menor custo.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste estudo permitiu concluir:

- Não foram observadas diferenças entre os grupos controle e de estudo quanto aos parâmetros inflamatórios ou cicatriciais.
- Não houve sinais inflamatórios relacionados ao uso da membrana de celulose que não tivessem ocorrido devido ao traumatismo cirúrgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zietek E, Matyja G, Kawczynski M, Stenosis of the larynx and trachea: diagnostics and treatment. *Otolaryngol Pol* 2001;55(5):515-20.
2. Koshkareva Y, Gaughan JP, Soliman AM. Risk factors for adult laryngotracheal stenosis: a review of 74 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007 Mar;116(3):206-10.
3. Richard I, Hamon MA, Ferrapie AL, Rome J, Brunel P, Mathe JF. [Tracheotomy in brain injured patients: which patients? Why? When? How?] *Ann Fr Anesth Reanim* 2005 Jun;24(6):659-62.
4. Couraud L, Jougon JB, Velly JF. Surgical treatment of nontumoral stenoses of the upper airway. *Ann Thorac Surg* 1995 Aug;60(2):250-9; discussion 259-60.
5. Ashiku SK, Kuzucu A, Grillo HC, Wright CD, Wain JC, Lo B, Mathisen DJ. Idiopathic laryngotracheal stenosis: effective definitive treatment with laryngotracheal resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 Jan;127(1):10-1.
6. Herrington HC, Weber SM, Andersen PE. Modern management of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope* 2006 Sep;116(9):1553-7.
7. Brown OE, Manning SC. Microbial flora of the subglottis in intubated pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996 Apr;35(2):97-105.
8. Obara S, Muto H, Ichikawa N, Tanaka O, Otsuka M, Kawanabe M, Ishii H, Niikura Y, Komatsu M. A repeated-dose dermal toxicity study of hydrophobically modified hydroxypropyl methylcellulose in rats. *J Toxicol Sci*; 1997 Aug; 22(3):255-80.
9. Korpela A, Aarnio P, Sariola H, Tormala P, Harjula A. Comparison of tissue reactions in the tracheal mucosa surrounding a bioabsorbable and silicone airway stents. *Ann Thorac Surg* 1998 Nov;66(5):1772-6.
10. Dufresne AM, Lafreniere D. Soft tissue response in the rabbit larynx following implantation of LactoSorb (PLA/PGA copolymer) prosthesis for medialization laryngoplasty. *J Voice* 2000 Sep;14(3):387-97.

11. Dodge-Khatami A, Niessen HW, Koole LH, Klein MG, Van Gulik TM, de Mol BA. Tracheal replacement in rabbits with a new composite silicone-metallic prosthesis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003 Sep;11(3):245-9.
12. Glatz F, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Damikas D, Mowlavi A. A tissue-engineering technique for vascularized laryngotracheal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003 Feb;129(2):201-6.
13. Saad AS, Falla A. Management of intractable and extensive tracheal stenosis by implantation of cartilage graft. *J Pediatr Surg* 1983 Aug;18(4):472-4.
14. Aidonis A, Nikolaou A, Bourikas Z, Aidonis I. Management of tracheal stenosis with a titanium ring and nasal septal cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002 Sep;259(8):404-8.
15. Mello LR, Machado FCN, Haas LJ, Zacchi V, Luzzi R, Zoschke J, Ramos RS. Efeitos hemostático e estrutural da esponja de cellulose liofilizada. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56(3B):613-20.
16. Adriaansen FC, Verwoerd-Verhoef HL, Van Der Heul RO, Verwoerd CD. Differential effects of endolaryngeal trauma upon the growth of the subglottis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1988 May;15(2):163-71.
17. Morera E, Alvarez H, Fontes L, Gorospe M, Bernaldez R, Gavilan J. Histopathological changes at the surgical site in experimental animals following partial cricoid resection and thyrotracheal anastomosis. *Acta Otorrinolaringol Esp*; 2004 Mar;55(3):131-8.
18. Loewen MS, Walner DL, Caldarelli DD. Improved airway healing using transforming growth factor beta-3 in a rabbit model; *Wound Repair Regen* 2001 Jan-Feb;9(1):44-9.
19. Roh JL, Lee YW, Park, HT. Subglottic wound healing in a new rabbit model of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006 Aug;115(8):611-6.
20. Loewen MS, Walner DL. Dimensions of rabbit subglottis and trachea. *Lab Anim* 2001 Jul;35(3):253-6.
21. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*. 5 Ed. Philadelphia: W. B. Saunders 1994;52-92.
22. Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M. New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials* 1995;16(11):881-5.

23. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 Dec;34(12):1557-70.
24. Moseley R, Walker M, Waddington RJ, Chen WY. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials--carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials* 2003 Apr;24(9):1549-57.
25. Cohn SM, Lopez PP, Brown M, Namias N, Jackowski J, Li P, Mishkin D, Lopez JM. Open surgical wounds: how does Aquacel compare with wet-to-dry gauze? *J Wound Care* 2004 Jan;13(1):10-2.
26. Costa HO, FC Souza. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue® 2005, Out/Nov/Dez;23(4):192-6.
27. Sevastjanova NA, Mansurova LE, Dombrovska LE, Slutskii LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials* 1987.
28. Dormer KJ, Bryce GE, Hough JVD. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28(1):17-27.

2.3 Artigo 3

Revista Brasileira de Otorrinolaringologia

Rev. Bras. Otorrinolaringol. vol. 75 no. 2 São Paulo Mar./Apr. 2009

ARTIGO ORIGINAL

Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos

Wander Lopes Amorim^I; Henrique Olival Costa^{II}; Flávia Coelho de Souza^{III}; Marília Germanos de Castro^{IV}; Leonardo da Silva^V

^IMestrando pela Santa casa de São Paulo, Médico Otorrinolaringologista

^{II}Otorrinolaringologista, Cirurgião de Cabeça e Pescoço. Doutor em Otorrinolaringologia, Prof. Adjunto do Depto. de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo, Coordenador do programa de Pós-Graduação em ORL da Santa Casa de São Paulo

^{III}Mestre em Veterinária, Doutoranda da Santa Casa de São Paulo

^{IV}Professora Instrutora da Santa Casa de São Paulo, Patologista

^VDoutor em Otorrinolaringologia, Professor Instrutor da Santa Casa de São Paulo. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

RESUMO

Vários materiais são propostos para reconstrução nasal, não havendo consenso sobre qual o melhor. A manta de celulose produzida por bactéria pode ser mais um elemento para adição cartilaginosa. Não há estudos deste material no dorso nasal.

Objetivo: Avaliar a resposta tecidual à presença da celulose bacteriana no dorso nasal de coelhos. **Material e Método:** Foram utilizados 22 coelhos Nova Zelândia, sendo que em 20 deles foi implantada a manta de celulose no dorso nasal e em 2 controles nada foi feito. Foram acompanhados por um período de três e seis meses, sendo então retirados as regiões do dorso nasal e narinas dos coelhos e realizado estudo histopatológico levando em consideração parâmetros definidos de condição inflamatória como congestão vascular, intensidade do processo inflamatório e presença de exsudato purulento. **Resultados:** O processo inflamatório manteve-se estável, demonstrando sua relação com o procedimento cirúrgico, e não com a presença da manta de celulose. Nos demais parâmetros estudados não houve diferença estatisticamente significativa. **Conclusão:** A manta de celulose de *Acetobacter xylinum* mostrou boa biocompatibilidade e manteve-se estável no decorrer do tempo de estudo, podendo ser considerada um bom material para uso na elevação do dorso nasal.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, celulose, coelhos, nariz.

INTRODUÇÃO

A busca por um ideal estético e a melhora dos contornos corporais sempre foi de grande interesse por parte da humanidade. O nariz, pela estratégica posição central que ocupa na face, fica mais susceptível às lesões traumáticas, que podem provocar deformidades faciais e motivar estigmas sociais e preconceitos de várias espécies.

Mesmo tendo função primordialmente respiratória, o nariz possui importante função estética e, por sua posição anatômica de destaque, revela a carga genética nos contornos faciais.

A reconstrução nasal é uma preocupação da Medicina desde a antiguidade. No Império Romano os prisioneiros de guerra eram submetidos à amputação nasal como castigo. Na Índia antiga, os delitos de adultério e roubo eram penalizados com a amputação nasal. Portanto, desde esta época surgiram os primeiros relatos de reconstrução de narizes deformados ou mutilados¹.

A chamada rinoplastia moderna iniciou-se em 1860, quando a comunidade científica começou a se preocupar com as bases estruturais do nariz. O sucesso do uso de osso maxilar e frontal para recompor a estrutura nasal levou os pesquisadores à tentativa de uso da ulna, tíbia e costela².

A partir dos esforços pioneiros no campo da rinoplastia, as técnicas de reconstrução nasal foram aprimoradas continuamente, apresentando atualmente excelentes resultados. Existe uma variedade de opções para a cirurgia reconstrutiva nasal e isto se deve, dentre outros fatores, ao desenvolvimento de materiais aloplásticos estáveis, não-reativos e de fácil disponibilidade³.

Os materiais preferidos para o suporte do dorso nasal devem apresentar resistência adequada, persistência no volume e forma, facilidade de inserção e revestimento, além de suficiente disponibilidade e habilidade para mimetizar o contorno natural do dorso^{1,2,4-7}.

Vários materiais têm sido propostos para o uso na reconstrução nasal. Entretanto, não há consenso sobre qual deles é o melhor. A necessidade de novos estudos fundamenta-se na necessidade de buscar materiais ou substâncias nunca utilizados ou usados em outros locais do corpo humano e que possam se apresentar como soluções viáveis, tanto pela praticidade, como pela economia e diminuição de comorbidades.

Em 1984, através da fermentação de bactérias do gênero *Acetobacter*, o microbiologista Luís Fernando Xavier Farah conseguiu desenvolver um processo industrial e economicamente viável de produção de celulose bacteriana. A membrana resultante desta síntese, após o processamento, é dotada de permeabilidade seletiva, permitindo a passagem de vapor de água, mas impedindo a passagem de microorganismos. É homogênea, com espessura média de 0,05 mm e

não contém adesivos ou aditivos. É constituída basicamente por celulose, substância inerte, resistente e insolúvel em todos os solventes orgânicos. Além disso, possui características físicas específicas, tais como: permeabilidade definida a líquidos e gases, resistência à tração e alongamento e peso e estrutura molecular característico e estável. A membrana de celulose vem sendo testada nas mais variadas áreas desde a utilização como pele artificial até em indústrias para confecção de coletes a prova de projéteis de arma de fogo, telas para computadores e papel para preservação de documentos históricos⁸ (Figura 1).

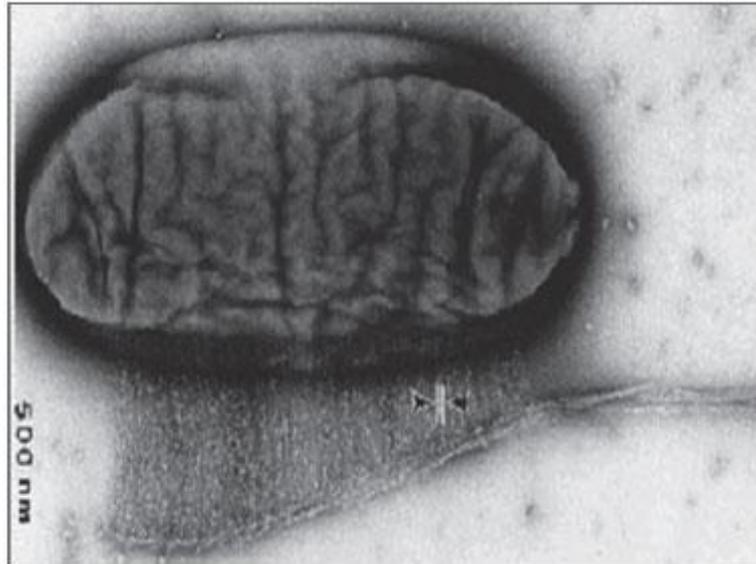


FIGURA 1. Microscopia de Acetobacter produzindo a celulose

Na busca de uma alternativa viável para a reconstrução do dorso nasal, com aumento do volume, sem que haja modificações das características habituais de textura e consistência do ponto de vista estético e que não incorra nas desvantagens relativas à colheita e tolerabilidade do material a ser enxertado, decidimos estudar as condições cicatriciais quando do uso de manta de celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum* (Bionext[®]) como elemento de elevação do dorso nasal.

A manta de celulose Bionext[®] (ANVISA N 80255120001) é produzida pela Bionext Produtos Biológicos e consiste de uma membrana flexível, semitransparente, amarelada, composta de polissacarídeos sintetizados por bactéria do gênero *Acetobacter*, sendo biodegradável, não-tóxica, não-pirogênica e estéril. Este composto tem sido utilizado com sucesso como curativo temporário de pele⁹⁻¹¹.

OBJETIVO

Avaliar a resposta tecidual à presença de celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum* como material de elevação do dorso nasal de coelhos.

MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em animais do Instituto de Ciências Avançadas em Otorrinolaringologia no dia 13 de junho de 2006, o estudo foi realizado no biotério do mesmo Instituto com supervisão e acompanhamento veterinário, sendo que os animais permaneceram em caixas apropriadas, com livre acesso à água e à ração comercial padronizada.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas da comissão de ética da Unidade de Técnica Cirúrgica Experimental da Santa Casa de São Paulo e obedeceu às normas da Lei Federal nº 6.638 de oito de maio de 1979 e aos princípios éticos na experimentação, postulados pelo Código Brasileiro de Experimentação em animais (COBEA).

Seleção e Tamanho da Amostra

Foram estudados vinte e dois coelhos da raça Nova Zelândia, do sexo masculino, com seis meses de idade, os quais foram acompanhados por um período de três e seis meses, sendo determinados aleatoriamente grupos de estudo de acordo com o tempo de seguimento. A escolha do animal baseou-se na peculiaridade de oferecerem boas condições de manipulação, acompanhamento e avaliação.

Os animais foram divididos em:

- a - 2 coelhos para controle do procedimento cirúrgico;
- b - 20 coelhos para o grupo de estudo, sendo 10 avaliados após três meses de pós-operatório e outros 10 em 6 meses de pós-operatório;

A determinação de qual grupo de seguimento o animal participaria foi feita por sorteio no dia da eutanásia.

Preparo do Material

Previamente ao procedimento cirúrgico o material derivado de celulose foi esterilizado em solução de glutaraldeído por 10 minutos e lavado em soro fisiológico, sendo que uma tira de 4 cm de comprimento e 1 cm de largura foi recortada, confeccionada, dobrada e moldada de maneira a constituir um elemento de elevação para ser inserido no dorso nasal (Figura 2).



FIGURA 2. Manta de celulose antes de dobradura para inserção

Procedimento Cirúrgico

Os coelhos foram submetidos à anestesia geral, após jejum pré-operatório de quatro horas. Todos os animais foram anestesiados com quetamina 40 mg/kg e hidrocloreto de xylasina 10 mg/kg por via intraperitoneal e permaneceram sob ventilação espontânea durante todo o procedimento.

Os animais tiveram a pele do dorso depilada para fotografia padronizada, observação da expansão volumétrica e avaliação das condições clínicas do enxerto.

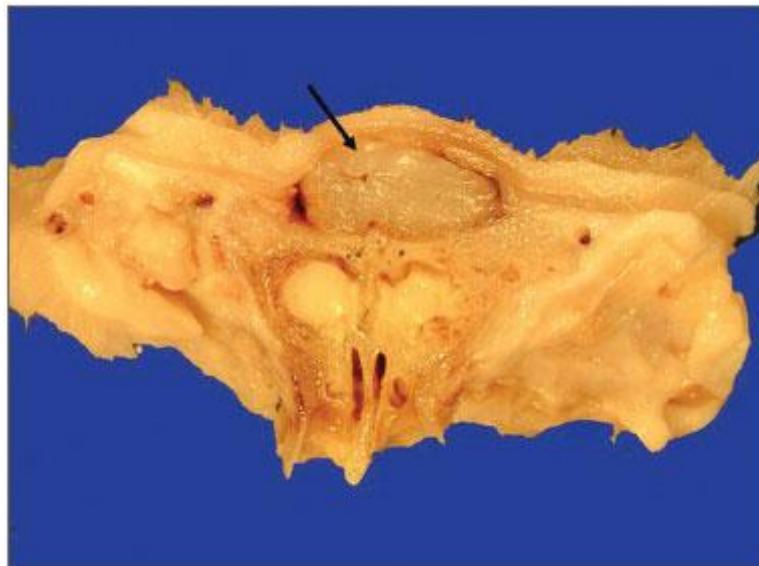


FIGURA 3. Corte sagital de peça mostrando a celulose incluída no dorso nasal (seta)

Uma incisão na região frontal foi utilizada com cerca de 1 cm de extensão horizontal e um plano de dissecção subperiosteal, da região incisada (interorbitária) à ponta nasal, para que um túnel de inserção de cerca de 7 cm de comprimento por 1 cm de largura fosse obtido. O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle, mas não houve inserção do material de celulose para que fosse observada a resposta ao procedimento cirúrgico.

Colocação da Celulose no Dorso Nasal

Uma tira de 4 cm de comprimento e 1 cm de largura, que foi previamente desenhada e recortada, foi colocada na bolsa de enxertia sobre o dorso nasal.

Após ter inserido na bolsa a tira da manta de celulose, pontos de sutura de mononylon 3.0 foram aplicados na incisão frontal e a cirurgia foi finalizada. No pós-operatório imediato foram aplicados Benzetacil 1 mL intramuscular e Dipirona 0,2 mL intramuscular e o procedimento foi encerrado.

Eutanásia

Após acompanhamento por 3 meses, 10 coelhos foram escolhidos por sorteio dentre os que receberam o enxerto e 1 dos que não receberam para serem submetidos à eutanásia. Os animais receberam injeção intracardíaca de cloreto de potássio enquanto anestesiados. Através de incisão seguindo a rima lateral da boca, passando pela borda rostral orbitária, contornando-a até alcançar o osso frontal foi retirada a peça da região rostral do animal. Foi mantida a integridade da região dorsal e lateral do nariz desde as narinas até a região frontal. As peças foram armazenadas em formaldeído a 10%, para serem realizados estudos anatomopatológicos. O mesmo procedimento foi repetido com seis meses de acompanhamento.

Avaliação Histopatológica

Após congelamento dos blocos das peças anatômicas, estes foram submetidos à descalcificação e, em seguida, foram estabelecidos cortes coronais seriados na distância de 5 mm da ponta nasal até a sutura frontal e estudados o padrão inflamatório, espessura do enxerto e relação enxerto-hospedeiro.

Foi feita uma padronização prévia dos parâmetros a serem observados por um médico otorrinolaringologista e um médico patologista e a análise das lâminas foi realizada por um único patologista, sem que o mesmo soubesse a que grupo o espécime pertencia. Os cortes foram submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliados histologicamente.

Foi feita então leitura em microscópio óptico. Alguns parâmetros definidores de condição inflamatória foram avaliados e graduados. Foram eles:

Congestão vascular:

0 - leve

1 - moderado

2 - intenso

Intensidade do processo inflamatório:

0 - ausente

1 - discreto

2 - moderado

3 - intenso

Exsudato purulento:

0 - ausente

1 - presente

Integridade da manta de celulose:

0 - ausente 1 - íntegro

2 - parcialmente fragmentado

3 - fragmentado

Todas as lâminas de histologia foram documentadas por fotografia digital (Figura 4).

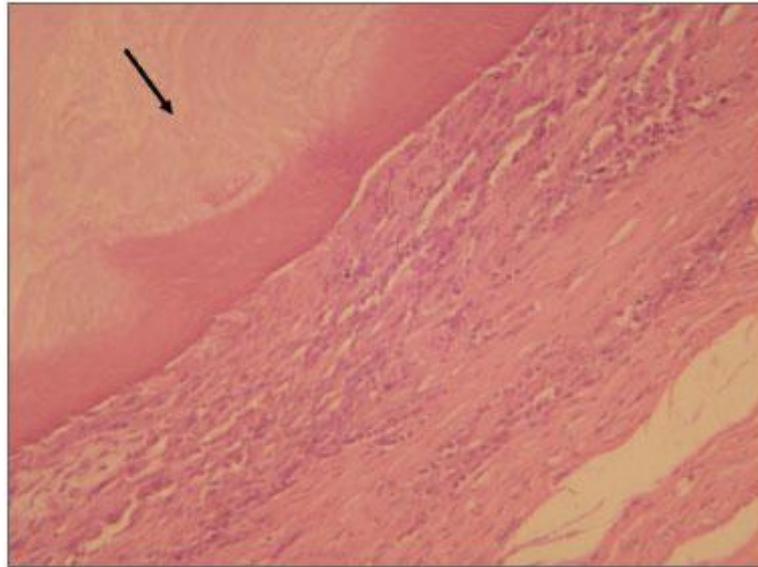


FIGURA 4. Exame histológico mostrando a celulose (seta) em contato com tecido subcutâneo. HE, 40X

Avaliação Macroscópica

Um parâmetro macroscópico foi também usado para avaliação da elevação do dorso com a colocação da manta de celulose, obtida com a observação do perfil do animal com três e seis meses após o procedimento cirúrgico.

Elevação do dorso:

- 1 - Dorso plano
- 2 - Dorso elevado

Análise Estatística

Os resultados encontrados no exame anatomopatológico foram tabulados em variáveis categóricas e comparados com teste não-paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney entre os diversos pares de intervenções.

O teste de Mann-Whitney é um teste não-paramétrico equivalente ao teste T para amostras independentes, devendo ser utilizado quando os resultados não são distribuídos normalmente, não podendo ser distribuídos através de uma transformação logarítmica. O teste combina e classifica os resultados de duas amostras e calcula a diferença estatística entre a soma dos rankings. Adotamos o valor de 5% para significância estatística ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Os achados dos aspectos histológicos da resposta inflamatória representados pelos parâmetros pré-determinados como congestão vascular, exsudato purulento e processo inflamatório agudo e condições da manta de celulose, além do aspecto macroscópico da observação da elevação do dorso nasal, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliadores da condição inflamatória e condições da manta de celulose implantada no período de seguimento de 3 meses

Tabela 1. Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliadores da condição inflamatória e condições da manta de celulose implantada no período de seguimento de 3 meses.

Coelho	Aspecto externo	Condições da celulose	CV	EP	PIA
1	Elevado	Íntegra	0	0	1
2	Elevado	Íntegra	1	0	1
3	Elevado com pele parcialmente necrótica	Parcialmente fragmentada	0	1	3
4	Elevado	Íntegra	2	0	2
5	Elevado	Parcialmente fragmentada	1	0	2
6	Elevado	Íntegra	0	0	1
7	Elevado	Parcialmente fragmentada	1	0	1
8	Elevado com pele parcialmente necrótica	Parcialmente fragmentada	2	2	3
9	Elevado	Íntegra	0	0	1
10	Elevado	Parcialmente fragmentada	2	0	3
11*	-	-	-	-	-
12**	-	-	-	-	-

CV - congestão vascular 0:leve; 1:moderado; 2: intenso.

EP - exsudato purulento 0: ausente; 1: presente.

PIA - processo inflamatório 0: ausente; 1: discreto; 2: moderado; 3: intenso.

* animal morreu no laboratório dias após o procedimento.

** animal sacrificado com peça retirada e enviada à patologia, porém material foi extraviado.

TABELA 2. Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliadores da condição inflamatória e condições da manta de celulose implantada no período de seguimento de 6 meses

Tabela 2. Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliadores da condição inflamatória e condições da manta de celulose implantada no período de seguimento de 6 meses.

Coelho	Aspecto externo	Condições da celulose	CV	EP	PIA
1	Elevado	Parcialmente fragmentada	2	1	2
2	Elevado	Parcialmente fragmentada	1	0	1
3	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	2
4	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	1
5	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	2
6	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	2
7	Elevado com pele parcialmente necrótica	Parcialmente fragmentada	0	0	1
8	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	2
9	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	0
10	Elevado	Parcialmente fragmentada	0	0	0
11*	-	-	-	-	-

CV - congestão vascular 0:leve, 1:moderado, 2: intenso

EP - exsudato purulento 0: ausente, 1: presente

PIA - processo inflamatório 0: ausente, 1: discreto, 2: moderado, 3: intenso

*** animal morreu no laboratório dias após o procedimento.

O aspecto macroscópico de avaliação externa do dorso nasal mostrou que todos os animais apresentavam dorso elevado ao final dos três meses, sendo que dois animais do total de 10 apresentavam pele parcialmente necrótica. Do mesmo modo, ao final dos seis meses todos os animais apresentavam o dorso elevado, com 1 animal com pele parcialmente necrótica.

O aspecto microscópico avaliado pelos parâmetros preestabelecidos mostrava que ao final dos três meses a manta de celulose se mostrava íntegra em cinco animais, e em outros cinco animais foi observada fragmentação parcial do material. Já no período de acompanhamento de seis meses observou-se tendência a fragmentação parcial, porém, não houve diferença estatística ($p = 0,065$).

Em relação aos parâmetros de resposta inflamatória, a congestão vascular não mostrou diferença estatística entre o grupo de três meses e o grupo de seis meses ($p = 0,279$), como também não foi observada diferença estatística em relação à presença de exsudato purulento nos grupos de três e seis meses ($p = 0,684$).

Quanto ao parâmetro de processo inflamatório não se observou diferença estatística entre o grupo de três e seis meses ($p = 0,317$).

Teste Mann-Whitney para amostras independentes

Congestão Vascular

Rank médio do grupo de 90 dias	12,00
Rank médio do grupo de 180 dias	9,00
Valor-p	0,279

O resultado do teste indicou que não existe diferença significativa (valor-p > 0,05) entre congestão vascular a 90 dias e 180 dias.

Exsudato Purulento

Rank médio do grupo de 90 dias	11,05
Rank médio do grupo de 180 dias	9,95
Valor-p	0,684

O resultado do teste indicou que não existe diferença significativa (valor-p > 0,05) entre exsudato purulento a 90 dias e 180 dias.

Processo Inflamatório

Rank médio do grupo de 90 dias	11,75
Rank médio do grupo de 180 dias	9,25
Valor-p	0,317

O resultado do teste indicou que não existe diferença estatística (valor-p > 0,05) entre o processo inflamatório a 90 e 180 dias.

Elevação do dorso

Rank médio do grupo de 90 dias	10,50
Rank médio do grupo de 180 dias	10,50
Valor-p	1

O resultado do teste indicou que não existe diferença significativa (valor-p = 1) entre elevação do dorso a 90 dias e 180 dias.

Integridade da celulose

Rank médio do grupo de 90 dias	7,75
Rank médio do grupo de 180 dias	12,50
Valor-p	0,065

O resultado do teste indicou que não existe diferença estatística (valor-p > 0,05) entre integridade da celulose a 90 e 180 dias.

DISCUSSÃO

Na Otorrinolaringologia, estudos sobre a viabilidade do uso da celulose bacteriana em regiões mucosas como septo nasal, cornetos e substituições de membranas timpânicas foram realizados e se mostram promissores. O uso de material com estas propriedades ainda não foi devidamente investigado em pacientes submetidos à remodelação nasal. Como os testes em animais não incluíram sua avaliação na região de interesse, entendemos que seria necessário constatar as condições de cicatrização e eficácia da manta de celulose como material de elevação do dorso nasal em coelhos.

A técnica cirúrgica se mostrou adequada e de fácil realização quanto ao implante da celulose no dorso nasal de coelhos. A incisão frontal interorbitária com o descolamento subperiosteal até a ponta nasal permitiu a realização de um túnel de fácil acesso para o implante do material. Uma sensibilidade maior foi observada em alguns animais na região da ponta nasal, mas nada que impedisse a confecção do túnel e a inserção da manta de celulose.

A principal preocupação do estudo era determinar se o material era biocompatível, resultando em resposta inflamatória tolerável e também avaliar se as suas condições de elevação do dorso permaneceriam inalteradas com o decorrer do tempo.

Na literatura observamos que, para a avaliação da biocompatibilidade do enxerto em relação ao tecido hospedeiro, existem vários métodos. Têm-se: cultura de células e tecidos, análise histoquímica¹², estudos bioquímicos^{13,14}, estudos histológicos e estudos de perfusão de todo um órgão. Existem também medidas de peso, rigidez, elasticidade, alongamento, quebras na mecânica e alterações na superfície que podem ser revelados na microscopia eletrônica. Mais recentemente, têm-se utilizado exames complementares de radiologia, como por exemplo, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética associada ou não à injeção de marcadores radioativos específicos, para avaliar a resposta do tecido a implantes metálicos que podem se dissolver e causar inflamação¹⁴⁻¹⁷. Porém, o método mais utilizado em estudos experimentais é a análise histológica com coloração de hematoxilina-eosina¹⁸⁻²⁸.

Neste trabalho optamos pela análise histológica por ser um método simples e por fornecer informações gerais da resposta tecidual ao material implantado.

O fato de a presença de curativo de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório pode ser devido às suas características de biocompatibilidade, que promovem uma melhor reação tecidual, não perpetuando o processo inflamatório, o qual já foi demonstrado em diversos estudos na literatura^{13,14,29,30}.

A questão da biocompatibilidade foi investigada através da observação da resposta inflamatória local. A congestão vascular e a presença de exsudato purulento tiveram baixa expressão.

O processo inflamatório encontrado no terceiro mês de acompanhamento não apresentou mudança significativa no sexto mês, mostrando sua relação com o procedimento cirúrgico e não com a presença da manta de celulose. A presença de processo inflamatório representa a participação das células no processo de reparação dos tecidos. Não houve sinais de resposta inflamatória maior nos animais operados com colocação de enxerto do que naqueles que foram operados e não receberam a celulose. Nos animais que receberam a celulose observou-se a formação de um processo inflamatório à custa de polimorfonucleares, com a presença de células gigantes multinucleadas. Entretanto, não houve a formação de um processo inflamatório crônico com predomínio de macrófagos e linfócitos, nem tampouco formação de granulomas após o aparecimento das células gigantes, típicos de resposta imune e de sequestro por macrófagos.

Quanto à qualidade final do enxerto, como material de elevação do dorso nasal, percebemos que houve uma notável modificação na estrutura do dorso nasal dos coelhos no pós-operatório imediato, que se manteve inalterada até o final dos períodos de acompanhamento. O exame do perfil mostrou elevação do dorso em todos os animais dos dois grupos ($p = 1$).

Já o estudo histológico do material enxertado mostrou uma tendência de fragmentação no decorrer do tempo, não havendo, porém, diferença estatística entre o grupo do terceiro mês e o do sexto mês ($p = 0,065$). Salientamos também que esta fragmentação não foi acompanhada de macrofagia, não havendo, portanto, reabsorção da celulose no período de acompanhamento do estudo. O rompimento de propriedades do material implantado poderia sugerir falha de biocompatibilidade, mas a resposta tecidual local não pareceu insatisfatória para considerarmos como tal. A fragmentação da celulose também deve ser analisada como um sinal positivo de incorporação ao tecido, sem ocorrência de resposta inflamatória exacerbada e patológica.

Os estudos de biocompatibilidade de materiais geralmente necessitam de uma avaliação em períodos diferentes pela própria fisiopatogenia da resposta tecidual a

um corpo estranho. O tempo de evolução foi importante para avaliarmos o comportamento da manta de celulose, a reação inflamatória local e a condição do dorso nasal neste período estipulado. Como não existem outros trabalhos na literatura sobre o uso deste material para esta finalidade, não dispomos de condições para uma análise comparativa. Talvez novos estudos, com um tempo de acompanhamento maior, possam nos dar mais informações quanto à evolução da fragmentação, observada em algumas amostras, e se viria a afetar a elevação do dorso nasal dos animais.

Neste estudo, pudemos perceber que a manta de celulose teve boa maleabilidade, sendo de fácil manipulação. Uma vez inserida na bolsa subcutânea, emprestou uma consistência natural ao dorso nasal e deu excelente elevação ao perfil nasal. Suas características físicas e de biocompatibilidade, assim como a facilidade de colocação e a provável possibilidade de modelação no ato da inserção, fazem deste produto um possível elemento de ajuda no tratamento que exija adição cartilaginosa e/ou óssea.

CONCLUSÃO

A manta de celulose de *Acetobacter xylinum* mostrou boa biocompatibilidade e manteve-se estável no decorrer do tempo de estudo, podendo ser considerada um bom material para uso na elevação do dorso nasal de coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maniglia AJ. Reconstructive rhinoplasty. *Laryngoscope*. 1989;99:865-7.
2. Joseph J. Joseph's Rhinoplasty and Facial Plastic Surgery with a Supplement on Mammoplasty and Other Operations in the Field of Plastic Surgery of the Body. An Atlas and Textbook. A Limited First Edition en English. Phoenix: Columella Press; 1987.p.:213-20.
3. Min S, Ahn, M.D, Nathan Monhian, M.D., Corey S. Maas, M.D., F.A.C.S., and Nadim B. Bikhazi, M.D. Facial plastic surgery. 1998; 14(2):145-50.
4. Millard DR. Total reconstructive rhinoplasty and a missing link. *Plast Reconstr Surg*. 1966: 37:167-83.
5. Jackson IT, Smith J, Mixer RC. Nasal bone grafting using split skull grafts. *Ann Plast Surg*. 1983;11:533-40.
6. Frodel JL Jr., et al. Calvarial bone graft harvest. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;119:17-23.
7. Cheney ML, Glicklich RE. The use of calvarial bone in nasal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;643-8.

8. Abrantes ACS. Do avião à urna eletrônica. Fonte: Ministério da Ciência & Tecnologia (jovem). Disponível em <<http://ctjovem.mct.gov.br>> (03/11/2006).
9. De Paola DQ, Souza MGPP. Membrana celulósica. Novo curativo biológico para melhoria do leito receptor de enxertia cutânea. *Rev Bras Cir.* 1987;77(3):135-8.
10. Rebello C, Almeida DA, Lima Júnior EM, Dornelas MP. Bio-fill, um novo substituto de pele: nossa experiência. *Rev Bras Cir.* 1987;77(6):407-14.
11. Peixoto RS, Santos DLN. Biofill: uso e avaliação clínica de uma membrana celulósica em lesões cutâneas. *Rev Bras Cir.* 1998;78(2):141-5.
12. Schadel A, Thun G, Stork L, Metzler R. Immunodiffusion and immunohistochemical investigations on the reactivity of oxide ceramic middle-ear implants. *ORL.* 1993;55:216-21.
13. Sevastjanova NA, Mansurova LE, Dombrovska LE, Slutskii LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials.* 1987;8(4):242-7.
14. Merchant SN, Nadol Junior JB. Histophology of ossicular implants. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(4):813-33.
15. Vince DG, Hunt JA, Williams DF. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials.* 1991;12:731-6.
16. Dormer KJ, Bryce GE, Hough JVD. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995;28(1):17-27.
17. Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T. Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials.* 2001;22:677-85.
18. Högset O, Bredberg G. Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. *Acta Otolaryngol.* 1986;101:445-52.
19. Williams KR, Blayney AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials.* 1987;8:254-8.
20. Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M. New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials.* 1995;16(11):881-5.
21. Schwager K, Geyer G. Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. *ORL.* 1998;60:322-8.

22. Ye Q, Ohsaki K, Il K, Li DJ, Zhu CS, Yamashita Y et al. Subcutaneous inflammatory reaction to a synthetic auditory ossicle (Bioceram®) in rats. *Acta Otolaryngol.* 1999;119:83-8.
23. Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope.* 2001;111(4 Pt 1):702-7.
24. Meijer AGW, Segenhout HM, Albers FWJ, van de Want HJL. Histopathology of biocompatible hydroxylapatite-polyethylene composite in ossiculoplasty. *ORL.* 2002;64:173-9.
25. Hoffmann KK, Kuhn JJ, Strasnick B. Bone Cements as Adjuvant Techniques for Ossicular Chain Reconstruction. *Otol Neurotol.* 2003;24:24-8.
26. Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M. Limitations of Titanium Dioxide and Aluminum Oxide as Ossicular Replacement Materials: An Evaluation of the Effects of Porosity on Ceramic Prostheses. *Otol Neurotol.* 2004;25:682-93.
27. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol.* 2005;26:563-6.
28. Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-Engineered Calcium Alginate Patches in the Repair of Chronic Chinchilla Tympanic Membrane Perforations. *Laryngoscope.* 2006;116:700-4.
29. Cullen B, Watt PW, Lundgyst C, Silcock D, Schmidt RJ, Bogan D, Light ND. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(12):1544-56.
30. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(12):1557-70.

3 DISCUSSÃO

As propriedades mecânicas dos biomateriais se tornam importantes na escolha do material a ser utilizado na aplicação médica desejada. Diferentes tipos de tecidos exigem diferentes propriedades mecânicas do material para poderem ser regenerados ou substituídos, como na engenharia de tecidos de pele, cartilagem, óssea ou vascular.

O comportamento físico-químico de um polímero é fortemente influenciado pelo grau de cristalinidade da sua estrutura. Por exemplo, a cristalinidade da celulose influencia diretamente as propriedades de degradação, absorção e retenção de água (Schenzel et al, 2005).

O curativo de celulose tem se mostrado um excelente curativo biológico e tem sido usado em grande variedade de aplicações na prática médica. Na realidade, o seu uso vem aumentando, à medida que aumenta o uso de materiais biológicos como curativos em tecidos lesados ou doentes, pois devido a sua estrutura única e suas propriedades físicas e de biocompatibilidade a celulose produzida por *Acetobacter xylinum* é uma candidata natural a ser utilizada em diversas áreas da Medicina em que se tenha como objetivo a restauração tecidual (Czaja et al, 2007).

Uma das maiores vantagens da celulose bacteriana é a sua capacidade para ser moldada em praticamente qualquer tamanho e forma durante a sua síntese, sem causar qualquer alteração significativa de suas propriedades físicas. Devido à recentes avanços nas tecnologias de implantes e técnicas de microcirurgia, objetos pequenos e versáteis de celulose bacteriana podem revelar-se muito úteis na área de pesquisa biomédica.

O fato da presença de curativo de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório pode ser devido as suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície,

consistência e propriedade químicas, que promovem uma melhor reação tecidual, não perpetuando o processo inflamatório (Sevastjanova et al, 1987; Vince et al, 1991; Cullen et al, 2002; Hart et al, 2002).

A porosidade, bem como o tamanho de poro pode variar dependendo do grau de interligação entre as microfibrilas, tornando a malha de fibras mais densa. O processo de secagem da celulose bacteriana também interfere na porosidade do material, sendo que quando secas em estufa, a porosidade e o tamanho dos poros das membranas diminuem consideravelmente (Messaddeq et al, 2004).

A falta de produção de exsudato purulento também pode ser devida às características do curativo de celulose produzida pelo *Acetobacter xylinum* (Brown et al, 1976; Benziman et al, 1980). Dentre estas, salientamos o fato de apresentar poros pequenos o bastante para impedir a entrada de bactérias, mas grandes o suficiente para que o tecido tenha uma adequada aeração (Mateos, 2004).

Um dos aspectos importantes de sua característica para se evitar um prolongamento do processo inflamatório é a capacidade do curativo em conter exsudato em seu interior, formando um gel aderente que é efetivo para encapsular e imobilizar populações bacterianas potencialmente patogênicas, que promoveriam um processo infeccioso e conseqüente exacerbação e prolongamento da inflamação (Moseley et al, 2003).

A ausência de reação granulomatosa demonstra uma resposta favorável do tecido hospedeiro ao implante do curativo, pois segundo a literatura a reação de biocompatibilidade trata-se de uma resposta de reação de corpo estranho e de reação cicatricial, que pode progredir para uma resposta favorável com a formação de um fina cápsula fibrosa envolvendo implante e/ou crescimento de tecido dentro do biomaterial, ou evoluir para uma reação contínua, inflamatória crônica,

caracterizada por formação de cápsula fibrosa espessa, granulação e rompimento do tecido com subsequente formação de abscesso ou fístula, culminando com extrusão do enxerto e alterações neoplásicas (Dormer et al, 1995).

Um dos aspectos fundamentais da engenharia de tecidos envolve a criação de um andaime, a matriz tridimensional que permite que as células se transformem em um tecido totalmente funcional (Aguirre et al, 2010; Rezwan et al.2006; Yarlagaadda et al 2005). Alguns cientistas propuseram que o material de suporte deve ser biodegradável de modo que, as células semeadas proliferem e secretem suas próprias moléculas extracelulares, substituindo assim o material implantado (Kakisis et al 2005). No entanto, esta exigência é problemática devido ao fato de que o temporário suporte muitas vezes pode degradar mais rápido do que as células podem substituí-lo (Rezwan et al, 2006; Sokolnicki et al, 2006). Portanto, a solução para este problema pode acarretar a necessidade de um material de suporte permanente, que seja biocompatível, poroso e que contenha as propriedades mecânicas necessárias para a função do tecido normal.

Nossa linha de pesquisa e outros estudos preliminares indicam que a celulose bacteriana poderia realmente funcionar como este material ideal para engenharia de tecidos e órgãos (Watanabe et al, 1993; Svensson et al 2005; Helenius et al, 2006).

Muitos estudos já demonstraram que membrana de celulose pode acelerar o processo de cura da infecção aguda e crônica de feridas cutâneas. No entanto, estas membranas também podem ser utilizadas com compostos que são conhecidos por promover a cura. Assim, celulose bacteriana, quando utilizada como curativo ou como um arcabouço para engenharia de tecidos pode ser incrementada com substâncias, a fim de acelerar ainda mais a processo de cicatrização. A membrana de celulose pode ser impregnada com compostos terapêuticos, quer durante a sua

síntese ou depois que foi criada sem causar nenhuma alteração em suas propriedades. Por exemplo, Legeza et al (2004) criou um curativo de celulose bacteriana para o tratamento queimaduras de terceiro grau, que foi impregnado com superóxido dismutase (antioxidante) ou Poviargol[®] (um antibiótico), a fim de aumentar sua propriedade terapêutica. Um estudo de Ciechanska (2004) demonstrou que um material de celulose pode ser criado durante a síntese da membrana de celulose pela adição de quitosana. Em outras palavras, a glucosamina e unidades de N-acetilglicosamina foram incorporadas durante a síntese das cadeias de celulose, o que foi demonstrado também em outro estudo por Shirai et al (1997). Ciechanska (2004) afirma que esse novo material melhorou as propriedades biológicas e físicas da celulose. A quitosana adicionada à membrana de celulose bacteriana é capaz de reter umidade superior a uma membrana pura de celulose. Isso pode ser benéfico porque uma cicatrização deve ser mantida úmida por tanto tempo quanto possível. Além disso, a quitosana, quando degradada por enzimas endógenas, promove o processo de cura estimulando a angiogênese.

Uma vez que alguns tecidos requerem matrizes extracelulares fortes, os suportes de biomateriais, para fins de engenharia de tecidos devem ser criados com um nível de resistência mecânica elevado. Mesmo que a celulose bacteriana já seja bastante forte, ela pode ser aumentada com vários compostos, a fim de torná-la ainda mais resistente.

Em um estudo realizado por Yasuda et al (2005) a celulose bacteriana foi imersa em dois tipos de soluções de polímeros (2-acrilamido-2-metil-propano sulfônico e gelatina), a fim de criar um hidrogel reforçado. O resultado foi que o material formado por estes diferentes polímeros, pode suportar altas forças de atrito, mostrando que eles são resistentes ao desgaste. Assim, estes compósitos de

celulose bacteriana poderiam funcionar como substitutos de cartilagem nas articulações danificadas. Da mesma forma, em outro estudo realizado por Wan et al (2006), um material composto de celulose bacteriana poderia funcionar como um suporte para a regeneração do tecido ósseo. Neste estudo, os autores foram capazes de criar uma membrana de celulose bacteriana que foi revestida com hidroxiapatita, um composto que é importante para a formação óssea. O material resultante mantém a resistência mecânica e as propriedades físicas da celulose bacteriana embora seja infundida com cristais de hidroxiapatita.

Com isto, prosseguiremos a nossa linha de pesquisa visando o desenvolvimento de novos suportes, para a reconstrução de órgãos e tecidos, estudando a interação das células tronco com a celulose bacteriana e também utilizando a membrana associada à medicamentos, como um sistema de distribuição de drogas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os achados de nossos estudos podemos considerar que a celulose é útil nos procedimentos de deslocamento medial das pregas vocais, uma vez que apresenta pouca capacidade de eliciar resposta inflamatória no hospedeiro e não extrúe. Além disso, apesar de haver uma perda inicial da integridade do material implantado, o mesmo permanece no local após quatro meses sem maiores modificações, sugerindo que seja material estável no longo prazo.

A celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum* por não provocar reação de corpo estranho maior que a água destilada quando colocada no espaço paralaríngeo de coelhos, pode ser utilizada como substância de aumento de volume em pregas vocais.

A celulose pode ser usada como uma substância de proteção em áreas cruentas. O comportamento biotecidual comprovado nestes estudos é importante, pois pode evitar complicações sequelares estenosantes, sendo ideal no uso de próteses.

Será interessante observar seu comportamento em estudos de duração mais longa, pois se confirmada estabilidade do implante, é um elemento importante na engenharia de tecidos, que envolve dispositivos capazes de interações específicas com os tecidos biológicos que devem servir como suporte e arquitetura para o crescimento de células.

Dentre todas as possibilidades descritas, uma que nos tem interessado é o uso da celulose com a incorporação de células tronco. Temos novos estudos em andamento que irão determinar a melhor espécie, o meio de cultura mais adequado e os locais mais apropriados para coleta de células tronco adiposas. Em seguida incorporaremos a celulose bacteriana com estas células para a implantação no organismo.

5 ANEXOS

Anexo 1



Protocolo 06/07

São Paulo, 27 de junho de 2007.

Ilmo.Sra.Dra. Flávia Coelho de Souza

O Comitê de Ética em experimentação animal (CEEA) do Instituto de Ciências Avançadas em Otorrinolaringologia (ICAO) em reunião ordinária em 27/06/2007 e no cumprimento de suas atribuições, após avaliação do seu projeto de pesquisa: "**Estudo controlado e randomizado em coelhos da capacidade de medialização e da resposta cicatricial do aumento de volume de prega vocal com celulose bacteriana.**": **Aprovado**

Prof. Dr. Leonardo da Silva
Presidente do CEEA do ICAO



Protocolo 3/05

São Paulo, 02 de março de 2005.

Ilmo.Sr.Prof.Dr. Henrique Olival Costa

O Comitê de Ética em experimentação animal (CEEA) do Instituto de Ciências Avançadas em Otorrinolaringologia (ICAO) em reunião ordinária em 02/03/05 e no cumprimento de suas atribuições, após avaliação do seu projeto de pesquisa: "**Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos.**": **Aprovado**

Prof. Dr. Leonardo da Silva
Presidente do CEEA do ICAO



São Paulo, 13 de junho de 2006.

Ilmo.Prof. Dr. Henrique Olival Costa

O Comitê de Ética em experimentação animal (CEEA) do Instituto de Ciências Avançadas em Otorrinolaringologia (ICAO) em reunião ordinária em 13/06/2006 e no cumprimento de suas atribuições, após avaliação do seu projeto de pesquisa "**ESTUDO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA TECIDUAL A PRESENÇA DE CELULOSE PRODUZIDA POR ACETOBACTER XYLINUN NO DORSO NASAL EM COELHOS**", emitiu parecer considerando-o:

Aprovado

Prof. Dr. Leonardo da Silva

Presidente do CEEA do ICAO

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre A; Planell JA; Engel E Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 400(2):284-91.

Amorim WL; Costa HO; Souza FC; Castro MG; Silva L Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2009; 75(2):200-7.

ASTM - American Society for Testing and Materials. *F1008-04ae1 standart specification for veta-tricalcium phosphate for surgical implantation.* 2004.

Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. *Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells.* *Biomaterials.* 2006; 27(9):2141-9.

Benziman M, Haigler CH, Brown RM, White AR, Cooper KM. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc Nati Acad Sci.* 1980; 77(11):6678-82.

Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M. New artificial nconnective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials.* 1995; 16(11):881-5.

Brown Jr. RM, Willison JH, Richardson CL. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73(12):4565-9.

Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials.* 2005, 26(33):6565-78.

Ciechan´ska D. *Fibres text. East Eur.* 2004, 12(4):69-72.

Costa HO, Kato M, Neto OMS, Silva L, Souza FC, Castro M. Avaliação da resposta tecidual da mucosa da orelha média de cobaias à presença de celulose bacteriana. Estudo experimental. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008; 74(Jan/Fev):.

Costa HO, Souza FC. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. *Acta ORL.* 2005; 23(3):23-7.

Cullen B, Watt PW, Lundgyst C, Silcock D, Schmidt RJ, Bogan D, Light ND. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(12):1544-56.

Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown Jr. RM. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials.* 2006, 27(2):145-51.

Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules.* 2007; 8(1):1-12.

de Castro Brás LE, Proffitt JL, Bloor S, Sibbons PD. Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: A rodent model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 95(2):239-49.

Dorland WAN. *Dorland's Medical Dictionary*. s.i.:W.B. Saunders Company; 29^a Rev Ed, 2000.

Dormer KJ, Bryce GE, Hough JVD. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995; 28(1):17-27.

Fink H, Faxälv L, Molnár GF, Drotz K, Risberg B, Lindahl TL, Sellborn A. Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials. *Acta Biomater*. 2010; 6(3):1125-30.

Fontana JD, De Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*. 1990, 24-25:253-64.

Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. *Laryngoscope*. 1998; 108(3):393-7.

Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(12):1557-70.

Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*. 2006, 76(2):431-8.

Hoenic N. Cellulose for medical applications: past, present, and future. *BioResources*. 2006, 1(2):270-80.

Hoffmann KK, Kuhn JJ, Strasnick B. Bone cements as adjuvant techniques for ossicular chain reconstruction. *Otol Neurotol*. 2003; 24:24-8.

Högset O, Bredberg G. Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. *Acta Otolaryngol*. 1986; 101:445-52.

Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C, Sumpio BE. *J Vasc Surg*. 2005, 41:349-54.

Kato M, Neto OMS, Souza FC, Castro M, Costa HO. Reconstrução de membrana timpânica de cobaias com celulose. *Acta ORL*. 2008; 26(1):7-12.

Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. *Prog Polym Sci*. 2001; 26:1561-603.

Ko HF, Sfeir C, Kumta PN. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos transact a math. Phys Eng Sci*; 2010; 368(1917):1981-97.

Kołodziejczyk M, Pomorski L. Final report on the realization of the grant n^o 7 S20400407 from the Polish State Committee for Scientific Research (in Polish); 1999.

Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope*. 2001; 111(4 Pt 1):702-7.

Legeza VI, Galenko-Yaroshevskii VP, Zinov'ev EV, Paramonov BA, Kreichman GS, Turkovskii II, Gumenyuk ES, Karnovich AG, Khripunov AK. *Bull Exp Biol Med*. 2004; 138(3):311-5.

Lipp C, Kirker K, Agostinho A, James G, Stewart P. Testing wound dressings using an in vitro wound model. *J Wound Care*. 2010; 19(6):220-6.

Martson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials*. 1999; 20(21):1989-95.

Mateos, SB. *Pele descartável*. Indústria brasileira. 2004, Out; 38-41.

Meijer AGW, Segenhout HM, Albers FWJ, van de Want HJL. Histopathology of biocompatible hydroxylapatite-polyethylene composite in ossiculoplasty. *ORL*. 2002; 64:173-9.

Mello LR, Feltrin LT, Fontes Neto PT, Ferraz FAP. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. *J Neurosurg*. 1997; 86:143-50.

Mello LR, Machado FCN, Haas LJ, Zacchi V, Luzzi R, Zoschke J, Ramos RS. Efeitos hemostático e estrutural da esponja de celulose liofilizada. *Arq Neuropsiquiatr*. 1998; 56(3B):613-20.

Merchant SN, Nadol Junior JB. Histopathology of ossicular implants. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994; 27(4):813-33.

Messaddeq Y, Ribeiro SJL, Pecoraro E, Manzani D. *Relatório de caracterização físico-química da membrana de celulose BIONEXT*. 2004. 11 f. Relatório técnico - Instituto de Químico, UNESP, Araraquara - SP.

Moseley R, Walker M, Waddington RJ, Chen WY. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials--carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials*. 2003; 24(9):1549-57.

Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, 27(21):3955-63.

Nemetz AP, Loures DRR, Coelho JCU, Repka JC, Bueno RRA, Dietz UA, Mello LRO. Efeito estrutural da utilização de celulose biossintética e politetrafluoroetileno expandido como substitutos do peritônio em cães. *Arq Bras Cir Dig*. 2001; 14 (2):139-42.

Osman SA, Souza FC, Dolci JE. Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (Bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos. *Acta ORL*. 2007; 25(4):255-325.

Oster GA, Lantz K, Koehler K, Hoon R, Serafica G, Mormino R. Solvent dehydrated microbially derived cellulose for in vivo implantation. *U.S. Patent*. 6,599,518, 2003.

Panerari AD, Costa HO, Souza FC, Castro M, Silva L, Neto OMS Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008; 74(4):512-22.

Perazzo PSL, Duprat AC, Lancellotti C. Histological behavior of the vocal fold after hyaluronic acid injection. *J Voice*. 2009; 23:95-8.

Pritchard EM, Szybala C, Boison D, Kaplan DL Silk fibroin encapsulated powder reservoirs for sustained release of adenosine. *J Control Release*. 2010; 144(2):159-67.

Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini A. *Biomaterials*. 2006, 27:3413-31.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*. 5 Ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994 p. 52-92.

Sanchavanakit N, Sangrungrangroj W, Kaomongkolgit R, Banaprasert TM. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotech Progress*. 2006; 22(4):1194-9.

Schadel A, Thun G, Stork L, Metzler R. Immunodiffusion and immuno-histochemical investigations on the reactivity of oxide ceramic middle-ear implants. *ORL*. 1993; 55:216-21.

Schenzel K, Fischer S, Brendler E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose*. 2005; 12(3):223-31.

Schwager K, Geyer G. Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. *ORL*. 1998; 60:322-8.

Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regi M, Pena J, Ramila A, Izquierdo I, Portoles MT. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 2004, 25(25):5603-11.

Sevastjanova NA, Mansurova LE, Dombrovska LE, Slutskii LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials*. 1987; 8:242-7.

Shirai A, Sakairi N, Nishi N, Tokura S. Carbohydr. *Polym*. 1997, 32:223-7.

Sokolnicki AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL. *J Membr Sci*. 2006; 272:15-27.

Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol*. 2005; 26:563-6.

Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 2005; 26(4):419-31.

Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M. Limitations of Titanium Dioxide and Aluminum Oxide as Ossicular Replacement Materials: An Evaluation of the Effects of Porosity on Ceramic Prostheses. *Otol Neurotol*. 2004; 25:682-93.

Vince DG, Hunt JA, Williams DF. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials*. 1991; 12:731-6.

Wan YZ, Hong L, Jia SR, Huang Y, Zhu Y, Wang YL, Jiang HJ. Compos. *Sci Technol*. 2006, 66:1825-32.

Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations. *Laryngoscope*. 2006; 116:700-4.

Williams KR, Blayney AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials*. 1987; 8:254-8.

Yarlagadda P, Chandrasekharan M, Shyan J. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *BiosMed Mater Eng*. 2005; 15: 159-77.

Yasuda K, Ping Gong J, Katsuyama Y, Nakayama A, Tanabe Y, Kondo E, Ueno M, Osada Y. Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomaterials*. 2005; 26(21):4468-75.

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](#)