

Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats[☆]

Débora Lopes Bunzen^{a,*}, Nathalia Lins^b, Mariana de Carvalho Leal^a,
Mariana Montenegro de Melo Lira^c, Silvio da Silva Caldas Neto^a

^a Serviço de Otorrinolaringologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

^b Núcleo de Pesquisa Experimental, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

^c Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

Recebido em 15 de outubro 2013; aceito em 14 de janeiro 2014

KEYWORDS

Biocompatible materials;
Otologic surgical procedures;
Gelatine sponge, absorbable;
Biopolymers

PALAVRAS-CHAVE

Materiais biocompatíveis;
Prática diária do otorrinolaringologista;
Esponja de gelatina absorvível;
Biopolímeros

Abstract

Introduction: Several biomaterials can be used in ear surgery to pack the middle ear or support the graft. The absorbable gelatin sponge is the most widely used, but it may produce fibrosis and impair ventilation of the middle ear.

Objective: This experimental study aimed to investigate the inflammatory effects of the sugarcane biopolymer sponge (BP) in the rat middle ear compared with absorbable gelatin sponge (AGS).

Methods: Prospective experimental study design. Thirty adult female Wistar rats were allocated to receive the BP sponge into the right ear and AGS into the left ear. Animals were randomly killed at 4 and 12 weeks post-procedure. Qualitative histological assessments were performed to evaluate the inflammatory reaction in the tympanic bullae.

Results: The BP sponge caused inflammation more intense and persistent than AGS. The BP was not absorbed during the experiment. Fibrosis was observed only in the ears with AGS. There were thickening of the mucosa and neoangiogenesis in the group of AGS.

Conclusion: Despite inflammation, the BP sponge produced less fibrosis and neoangiogenesis compared to AGS. The sponge BP appeared to be a non-absorbable biomaterial in the middle ear.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Materiais de suporte na orelha média: comparação entre a esponja de gelatina absorvível e a esponja do biopolímero da cana-de-açúcar em ratos

Resumo

Introdução: Existem diversos biomateriais que podem ser utilizados na cirurgia otológica para preencher a cavidade da orelha média ou dar suporte a enxertos. A esponja de gelatina absorvível é a mais utilizada, mas pode provocar fibrose e prejudicar a ventilação da orelha média.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2013.08.001>

*Como citar este artigo: Bunzen DL, Lins N, Leal MC, Lira MMM, Caldas Neto SS. Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:237-44.

* Autor para correspondência.

E-mail: dbunzen@gmail.com (D.L. Bunzen).

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Objetivo: Investigar os efeitos da reação inflamatória provocada pela esponja do biopolímero da cana-de-açúcar (BP) comparada a esponja de gelatina absorvível (EGA) na mucosa da orelha média de ratos.

Materiais e métodos: Estudo experimental prospectivo. A esponja do BP foi implantada na orelha direita e a EGA na orelha esquerda de 30 ratos Wistar fêmeas. Os animais foram sacrificados com 4 e 12 semanas após o procedimento. Avaliação histológica qualitativa foi realizada para verificar a reação inflamatória na bula timpânica.

Resultados: A esponja do BP provocou exsudato inflamatório mais intenso e persistente que a EGA. O BP não foi absorvido durante o tempo de observação. Traves de fibrose foram observadas apenas nos ouvidos com a EGA. Houve espessamento da mucosa e neoangiogênese no grupo da EGA.

Conclusão: Apesar da reação inflamatória, a esponja do BP provocou menos fibrose e neoangiogênese quando comparada a EGA. A esponja do BP comportou-se como um biomaterial não absorvível na orelha média.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

As cirurgias otológicas são comuns na prática diária do otorrinolaringologista, sendo as timpanoplastias e timpanomastoidectomias as mais frequentes. Na grande maioria das técnicas empregadas, faz-se necessário, além de um material de enxerto para o fechamento da perfuração da membrana timpânica (MT), outro material para suporte ou preenchimento da cavidade da orelha média. O material de suporte deve ser inócuo para o paciente, biocompatível e incapaz de provocar qualquer reação da mucosa que comprometa a ventilação da orelha média.¹ Idealmente, deve ser moldável à cavidade timpânica e manter o enxerto estável a médio prazo.¹ O material pode ser absorvido ou não pelo organismo após a cicatrização.

Vários tipos de materiais de suporte podem ser usados na timpanoplastia e timpanomastoidectomia. Há materiais não absorvíveis que necessitam de uma cirurgia revisional para removê-los, como o silicone. Os materiais absorvíveis podem ser produzidos a partir do ácido hialurônico, materiais sintéticos, materiais alternativos (plantas) ou gelatina. Em todo o mundo, o material mais usado para oferecer estabilidade ao enxerto timpânico é uma esponja hemostática de gelatina absorvível, derivada da derme de porco. Contudo, trabalhos na literatura surgem questionando seu uso na otologia. Foi encontrada fibrose importante da submucosa da orelha média de ratos em contato com essa esponja hemostática.² Um estudo comparou três substâncias: Nasopore® (membrana de poliuretano), Sepragel® (polímero de ácido hialurônico) e Gelfoam® (esponja hemostática absorvível), todas inoculadas na bula timpânica dos ratos. Após três dias, foi encontrada maior reação inflamatória no grupo do Gelfoam®, comparado aos outros, e após 20 dias houve maior grau de fibrose e espessamento subepitelial neste grupo.³

A mucosa da orelha média é muito reativa. Tonnaer *et al.* inocularam várias substâncias por via transtimpânica (bactéria, hemocianina, carvão ativo ou soro fisiológico) na bula timpânica de ratos.⁴ Os autores concluíram que com qualquer das substâncias testadas (exceto o soro fisiológico), ao atingir a cavidade da orelha média, é possível induzir-se a otite média aguda.⁴ A dificuldade em se conseguir um material biocompatível com o mínimo de dano à mucosa impulsiona o desenvolvimento de novos biomateriais.

O biopolímero da cana-de-açúcar é uma macromolécula produzida pela bactéria *Zoogloea SP* quando cultivada em um meio de cultura rico em melão da cana-de-açúcar.⁵ Este polímero tem-se mostrado biocompatível na forma de membranas em vários estudos já realizados em diferentes áreas.⁶ Silva DB *et al.*⁷ realizaram pesquisa experimental usando o biopolímero como enxerto timpânico fixado na face externa da perfuração da MT e observaram fechamento da perfuração timpânica na maioria das amostras estudadas. Mayer DLB *et al.*⁸ analisaram a reação inflamatória da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar dentro da orelha média de ratos. Houve exsudato e espessamento da mucosa, mas com regressão ao longo do tempo.

A membrana do biopolímero da cana-de-açúcar é uma estrutura laminar não porosa que foi testada experimentalmente com o objetivo de substituir ou fixar o enxerto na cirurgia para fechamento da perfuração da MT. Já a esponja do biopolímero da cana-de-açúcar é um material poroso e denso. Em contato com a água, apresenta pouca expansibilidade, tornando-se friável. Esse tipo de material poderia ser usado como suporte para o enxerto ou mesmo como preenchimento da cavidade timpânica e canal auditivo. Este estudo pretende avaliar a reação inflamatória causada pelo biopolímero da cana-de-açúcar em forma de esponja em contato com a mucosa da orelha média comparada à esponja de gelatina absorvível, comercialmente conhecida como Gelfoam®. A resposta inflamatória precoce será analisada através da caracterização do exsudato e edema da submucosa. A resposta tardia da inflamação será avaliada, pela neoangiogênese e fibrose, além do exsudato crônico.

Materiais e métodos

No presente estudo foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas, sadias, da linhagem Wistar, pesando de 211 a 290 g (média de 247,25 g), com cerca de quatro meses de idade. Como critério de exclusão foi considerada qualquer alteração na orelha média ou alteração na membrana timpânica (perfuração ou miringosclerose extensa).

Os animais selecionados foram operados e acompanhados no Núcleo de Cirurgia Experimental. Os animais foram

mantidos no biotério, com refrigeração constante e temperatura ambiente controlada de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), em gaiolas coletivas com piso de serragem com cinco animais antes do experimento, e gaiolas individuais após o experimento. O local oferecia iluminação programada a cada 12 horas. Os animais foram alimentados com ração industrializada do tipo Labina® *ad libitum*.

Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental, controlado, analítico e prospectivo.

Procedimentos

Os ratos foram submetidos à anestesia geral para o procedimento, utilizando-se: cloridrato de cetamina (5 mg/100 g de peso) via intramuscular, cloridrato de xilazina (2 mg/100 g de peso) via intramuscular, e atropina (0,16 mL/100 g de peso) via subcutânea. A antibioticoprofilaxia foi feita com cefalotina (1,3 mg/100 g de peso) via intramuscular.

Arbitrariamente, todas as orelhas do lado direito formaram o grupo da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar (BP), e as orelhas do lado esquerdo dos mesmos ratos o grupo da esponja de gelatina absorvível, Gelfoam® (GF).

Todos os animais foram submetidos à otomicroscopia com microscópio cirúrgico (marca D.F. Vasconcelos® de coluna, modelo MC-M31). Após a otomicroscopia com aumento de 10 \times , os ratos incluídos foram submetidos à cirurgia otológica.

Cirurgia otológica

O procedimento foi realizado em bancada cirúrgica com todos os cuidados de assepsia e antisepsia. Após anestesia e tricotomia da região retroauricular e cervical, foi feita uma incisão ventrolateral de 2 cm com bisturi frio de lâmina nº15, distante 0,5 cm da implantação da orelha externa (fig. 1). Afastou-se, então, o plano muscular para evitar traumas desnecessários, visualizando-se, assim, o tendão de inserção do músculo digástrico na base do crânio. Nesta posição, profundamente, situa-se a porção posterior da bula timpânica (fig. 2). Após a exposição retroauricular, a bula timpânica foi perfurada delicadamente com a ponta da agulha 40 \times 1,20 mm. Em seguida, com a pinça tipo jacaré, houve a introdução do material correspondente. No mesmo rato, foi colocado, no lado direito, o biopolímero, e no lado esquerdo, o Gelfoam®, de tamanhos padronizados em 5 mm de comprimento e 1 mm de espessura (fig. 3). Após a introdução dos materiais, o plano muscular foi reposicionado e a pele foi suturada com fio náilon 4-0. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo pesquisador, para evitar variações da técnica. Após 15 dias, a pele do rato expulsou naturalmente o fio de sutura, não tendo sido necessário removê-lo.

Os ratos operados foram divididos em dois subgrupos, após sorteio aleatório: Tempo T1 - sacrificados com quatro semanas; e Tempo T2 - sacrificados com 12 semanas após a cirurgia. No tempo estipulado, os animais foram submetidos à eutanásia de maneira indolor, através da administração intraperitoneal de tiopental sódico seguido de dose letal deste barbitúrico por injeção intracardíaca. Após a eutanásia, foram removidas suas bulas timpânicas para estudo.

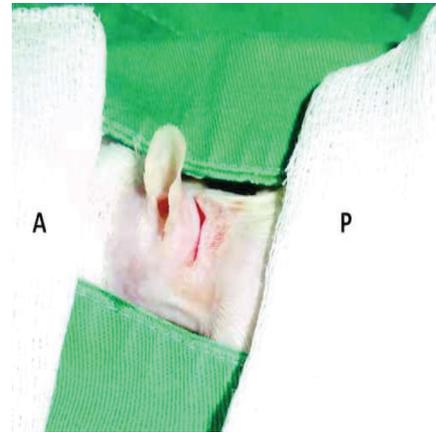


Figura 1 Rato Wistar em decúbito lateral. Incisão cirúrgica na região retroauricular da orelha esquerda. A, anterior; P, posterior.

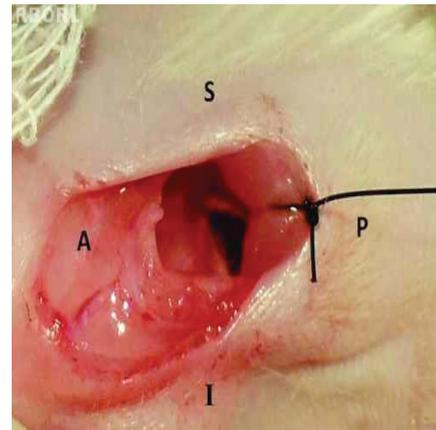


Figura 2 Exposição do local onde está situada a bula timpânica, profundamente à musculatura cervical no lado esquerdo do rato. A, anterior; P, posterior; S, superior; I, inferior.



Figura 3 Materiais estudados. GF, Gelfoam® (esponja de gelatina absorvível); BP, esponja do biopolímero da cana-de-açúcar.

Preparo e análise histológica

As bulas timpânicas foram isoladas e preparadas para o estudo histológico. A fixação foi realizada através de formalina tamponada a 10% e a descalcificação em ácido nítrico a 5%, durante 24 horas. A fim de se obter melhor fixação, foi feita uma abertura de 2 mm na porção posterior da bula timpânica para entrada do formol tamponado. O material foi desidratado, em série crescente de etanol a 70%, 80%, 90% e 100%, uma hora cada; em seguida, foi submetido a processo de clarificação em xilol e incluído em parafina. Já incluídas em blocos de parafinas, as peças foram levadas para corte de 5 µm de espessura em micrótomo (Spencer AO) com intervalo de 50 µm. Os cortes foram feitos em plano transversal ao da MT.

Em seguida, o material foi submetido à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Após todas as lâminas serem processadas, foram selecionadas aquelas cujo corte situava-se na altura do final do cabo do martelo, correspondente ao mesotímpano, e o corte na altura do processo longo da bigorna correspondente ao epitímpano. Os cortes selecionados foram submetidos à análise qualitativa por um patologista experiente. Na análise, foram observados a morfologia da mucosa e da MT das bulas, o tipo e a intensidade da reação inflamatória, a presença de fibrose e o comportamento do biopolímero comparado com o Gel-foam®.

A descrição dos achados histológicos foi subdividida de acordo com os seguintes parâmetros: espessamento da MT ou mucosa, o tipo celular do infiltrado inflamatório, a neovascularização e a fibrose da submucosa.

O espessamento da MT foi classificado em ausente, leve, moderado ou intenso. A intensidade do processo inflamatório foi descrita a partir da observação da celularidade no exsudato e da extensão do processo pela cavidade da bula timpânica. A intensidade da atividade inflamatória foi assim classificada: nula - ausência de sinais inflamatórios; leve - exsudato com infiltração celular em pequena quantidade, reação envolvendo até 1/3 da luz da bula timpânica (epitímpano ou mesotímpano); moderada - exsudato com infiltração celular em quantidade moderada, reação envolvendo entre 1/3 e 2/3 da luz da bula (epitímpano e mesotímpano); intensa - exsudato com infiltração celular em grande quantidade, reação envolvendo mais que 2/3 da luz da bula com sinais de necrose.

O infiltrado inflamatório também foi analisado quanto à celularidade: se havia maior quantidade de linfócitos e plasmócitos, foi enquadrado como crônico com infiltrado linfomononuclear (LMN); se havia maior quantidade de neutrófilos, o infiltrado era agudo e classificado como polimorfonuclear (PMN); se havia tanto LMN quanto PLM, era classificado como um exsudato subagudo.

A neoangiogênese ocorre a partir de vasos pré-existent. Na resposta tardia da inflamação há vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e degradação da membrana basal, com migração das células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico. A presença ou não desse comportamento da inflamação da mucosa foi avaliado.

A fibrose também fez parte da fase tardia da inflamação e caracterizou-se pela presença de fibroblastos e deposição de colágeno na matriz extracelular. A fibrose subepitelial da bula foi classificada em leve, moderada e intensa,

dependendo da extensão do processo na bula timpânica.

Na avaliação do grau de absorção do material, na bula timpânica foi considerado se havia algum sinal de permanência do mesmo nas lâminas estudadas.

Análise estatística

Os dados obtidos são categóricos e apresentados de forma descritiva e analítica, tendo sido agrupados em tabelas. Na análise estatística comparativa foi verificado se havia diferença entre os biomateriais. Também houve comparação dos dados entre os tempos T1 e T2 para cada grupo separadamente. Foi aplicado o teste Exato de Fisher, devido ao número pequeno de observações. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram < 0,05. Os cálculos estatísticos foram realizados no software SPSS for Windows versão 18.0 - *Statistical Package for the Social Sciences*.

Considerações éticas

Esta pesquisa seguiu os princípios que regem o Código de Ética experimental e as leis de proteção dos animais, de acordo com as normas vigentes no Brasil. Especialmente a Lei nº 9.605 - art. 32 e o Decreto nº 3.179 - art. 17, de 21/09/1999, que tratam da questão do uso de animais para fins científicos. Além disso, teve aprovação integral do Comitê de Ética para Uso de Animais, no qual está registrado sob o protocolo nº 23076020776/2010-48. Inclusive, concordando com o fato de que a morte dos animais utilizados neste estudo justifica-se por não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico. A utilização de anestesia geral antes de quaisquer procedimentos teve como finalidade evitar a dor e reduzir o estresse dos animais. Houve acompanhamento dos veterinários responsáveis do Núcleo de Cirurgia Experimental durante o experimento.

Resultados

Do total dos 30 ratos do estudo, foram selecionados aleatoriamente 15 deles para o grupo T1 e 15 para o grupo T2. No grupo T1 houve uma perda de dois animais por complicações anestésicas no transoperatório. Dos 13 ratos operados, seis foram perdidos por problemas como infecção secundária bilateral ou falha no processamento histotécnico. Dos sete que sobraram, dois apresentaram otite unilateral (lado esquerdo) e permaneceram no estudo. Assim, ao final do primeiro mês de observação do experimento, obtivemos sete orelhas do lado direito (grupo BP) e cinco orelhas do lado esquerdo (grupo do GF).

Nos 15 ratos sacrificados no tempo T2, duas orelhas do lado esquerdo foram excluídas por infecção secundária, e outras duas pela baixa qualidade do processamento histotécnico. No grupo do GF ficaram 11 orelhas. As 36 orelhas analisadas ficaram assim distribuídas: T1 - sete no grupo do BP e cinco no grupo do GF; T2 - 15 no grupo do BP e 11 no grupo do GF.

A descrição dos achados histológicos foi subdividida de acordo com os seguintes parâmetros: espessamento

da MT e da mucosa, o tipo celular do infiltrado inflamatório, neovascularização e a intensidade da fibrose da submucosa. Com o objetivo apenas de caracterizar a amostra estudada, apresentamos as frequências absolutas (N) e relativas (percentuais) das classes de cada variável qualitativa nas tabelas 1 e 2.

Para compararmos os grupos com relação aos achados histológicos foi aplicado o teste Exato de Fisher, devido ao número pequeno de observações. Para efeito de análise estatística, os resultados histológicos classificados como ausente ou leve foram agrupados e comparados ao resultado agrupado dos dados classificados como moderado ou intenso.

A análise estatística dos dados se encontram nas tabelas 3 e 4, que compararam os biomateriais entre si.

Não houve diferenças estatísticas entre os parâmetros analisados quando foi comparado o resultado no

tempo T1 e T2 apenas do BP, assim como quando houve essa comparação entre os tempos, dentro do grupo do GF.

Em relação à presença do material implantado, após três meses do experimento, o BP foi visualizado em todas as bulas timpânicas. O GF foi visualizado em apenas uma. Foi observado neoformação óssea em duas bulas com GF e em três com BP.

O padrão de resposta fibrogênica foi distinto entre os dois grupos. Nos implantes de BP, a fibrose, quando era observada, apresentava-se, na maioria dos casos, de leve intensidade; enquanto nos implantes de GF, a fibrose presente apresentava em alguns casos a formação de aderências fibrosas, com preenchimento de espaços aéreos. Estas aderências foram observadas tanto no grupo após um mês de experimento, quanto no após três meses.

Tabela 1 Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês do experimento (T1)

Achados histológicos	E.Mu	E.MT	LMN	PMN	Neoangio	Fibrose
BP (n = 7)						
Ausente	1 (14,28%)	3 (42,86%)	-	-	1 (14,28%)	-
Leve	3 (42,86%)	4 (57,14%)	1 (14,28%)	1 (14,28%)	6 (85,71%)	5 (71,43%)
Moderada	-	-	4 (57,14%)	3 (42,86%)	-	2 (28,57%)
Intensa	3 (42,86%)	-	2 (28,57%)	3 (42,86%)	-	-
GF (n = 5)						
Ausente	2 (40,0%)	3 (60,0%)	-	5 (100%)	-	-
Leve	1 (20,0%)	-	4 (80,0%)	-	4 (80,0%)	1 (20,0%)
Moderada	1 (20,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	-	1 (20,0%)	3 (60,0%)
Intenso	1 (20,0%)	1 (20,0%)	-	-	-	1 (20,0%)

BP, bipolímero; GF, Gelfoam®; E.Mu, espessamento da mucosa; E.MT, espessamento da membrana timpânica; LMN, infiltrado linfomononuclear; PMN, infiltrado polimorfonuclear; Neoangio, neoangiogênese.

Tabela 2 Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses do experimento (T2)

Achados histológicos	E.Mu	E.MT	LMN	PMN	Neoangio	Fibrose
BP (n = 15)						
Ausente	1 (6,66%)	8 (53,33%)	-	-	5 (33,33%)	1 (6,66%)
Leve	5 (33,33%)	5 (33,33%)	-	1 (6,66%)	8 (53,33%)	8 (53,33%)
Moderada	4 (26,66%)	1 (6,66%)	12 (80,0%)	6 (40,0%)	2 (13,33%)	5 (33,33%)
Intensa	5 (33,33%)	1 (6,66%)	3 (20,0%)	8 (53,33%)	-	1 (6,66%)
GF (n = 11)						
Ausente	1 (9,09%)	5 (45,45%)	-	9 (81,81%)	-	-
Leve	1 (9,09%)	3 (27,27%)	7 (63,63%)	1 (9,09%)	3 (27,27%)	4 (36,36%)
Moderada	3 (27,27%)	3 (27,27%)	4 (36,36%)	-	7 (63,63%)	3 (27,27%)
Intense	6 (54,54%)	-	-	1 (9,09%)	1 (9,09%)	4 (36,36%)

BP, bipolímero; GF, Gelfoam®; E.Mu, espessamento da mucosa; E.MT, espessamento da membrana timpânica; LMN, infiltrado linfomononuclear; PMN, infiltrado polimorfonuclear; Neoangio, neoangiogênese.

Tabela 3 Comparison between groups of biomaterials in relation to histological findings in the tympanic bulla of rats after 1 month of experiment (T1)

Achados histológicos	Grupo - T1		p-valor
	BP (n = 7)	GF (n = 5)	
E.Mu			
Ausente/Leve	4 (57,1%)	3 (60,0%)	> 0,999
Moderado/Intenso	3 (42,9%)	2 (40,0%)	
E.MT			
Ausente/Leve	7 (100%)	3 (60,0%)	0,152
Moderado/Intenso	0 (0%)	2 (40,0%)	
LMN			
Ausente/Leve	1 (14,3%)	4 (80,0%)	0,062
Moderado/Intenso	6 (85,7%)	1 (20,0%)	
PMN			
Ausente/Leve	1 (14,3%)	5 (100%)	0,015 ^a
Moderado/Intenso	6 (85,7%)	0 (0%)	
Neoangio			
Ausente/Leve	7 (100%)	4 (80,0%)	0,417
Moderado/Intenso	0 (0%)	1 (20,0%)	
Fibrose			
Ausente/Leve	5 (71,4%)	1 (20,0%)	0,234
Moderado/Intenso	2 (28,6%)	4 (80,0%)	

^a Estatisticamente significativa (p < 0,05).

Tabela 4 Comparação dos grupos de biomateriais em relação aos achados histológicos na bula timpânica do rato após três meses de experimento (T2)

Achados histológicos	Grupo - T2		p-valor
	BP (n = 15)	GF (n = 11)	
E.Mu			
Ausente/Leve	6 (40,0%)	2 (18,2%)	0,234
Moderado/Intenso	9 (60,0%)	9 (81,8%)	
E.MT			
Ausente/Leve	13 (86,7%)	8 (72,7%)	0,620
Moderado/Intenso	2 (13,3%)	3 (27,3%)	
LMN			
Ausente/Leve	0 (0%)	7 (63,6%)	0,001 ^a
Moderado/Intenso	15 (100%)	4 (36,4%)	
PMN			
Ausente/Leve	1 (6,7%)	10 (90,9%)	0,001 ^a
Moderado/Intenso	14 (93,3%)	1 (9,1%)	
Neoangio			
Ausente/Leve	13 (86,7%)	3 (27,3%)	0,004 ^a
Moderado/Intenso	2 (13,3%)	8 (72,7%)	
Fibrose			
Ausente/Leve	9 (60,0%)	4 (36,4%)	0,234
Moderado/Intenso	6 (40,0%)	7 (63,6%)	

^a Estatisticamente significativa (p < 0,05).

Discussão

O uso de biomateriais na cirurgia otológica é uma prática comum na otorrinolaringologia. Após a introdução, na década de 50, por Zollner e Wullstein dos materiais de preenchimento na cavidade timpânica, o uso dos biomateriais tem-se expandido.^{9,10} A depender da indicação e técnica cirúrgica proposta ao paciente, materiais foram desenvolvidos para serem usados como implantes na substituição dos ossículos da orelha média, como selantes da janela oval, materiais para hemostasia, tubos de ventilação, materiais de suporte para o enxerto e material de preenchimento da cavidade timpânica ou canal auditivo externo.¹ Os materiais de suporte e preenchimento são indicados na maioria das timpanoplastias e mastoidectomias.

O Gelfoam[®] é o biomaterial absorvível mais utilizado atualmente nas cirurgias otológicas. Inicialmente, essa esponja foi usada como agente hemostático na neurocirurgia. A capacidade de expansão do material em contato com fluidos e sua absorção pelo organismo em médio prazo o fizeram ganhar espaço em várias áreas cirúrgicas. Em 1951, Blaine G¹¹ publicou seu uso não apenas como agente hemostático, mas também como substituto de tecidos destruídos. Desde a década de 1950 que o Gelfoam[®] é usado nas diversas cirurgias otológicas, mas a partir da década de 1960 foram atribuídos a ele efeitos deletérios na orelha média. Schuknecht HF^{12,13} observou, em dois estudos, perda auditiva após cirurgia de

estapedectomia e concluiu que essa falha foi secundária ao uso de Gelfoam[®] na janela oval.

A mucosa da orelha média e a MT, quando em contato com algum material danoso, sofrem edema e hiperplasia subepitelial evidenciados pelo espessamento histológico. No presente estudo foi observado tanto no tempo T1 quanto no tempo T2 do experimento que nenhum dos biomateriais provocou um espessamento importante da MT. Laurent C et al.¹⁴ também não observaram alterações da MT em cirurgias experimentais utilizando GF.

A MT é formada por três camadas, e a mais interna é contígua com a mucosa da bula timpânica, sofrendo, inclusive, as mesmas injúrias e com resposta inflamatória semelhante. Mayer DLB et al.⁸ observaram um espessamento importante da MT após inoculação de material através de uma perfuração timpânica. Os autores observaram que este achado resultou não apenas da presença do material, mas da própria manipulação da MT, e concluíram que a metodologia para colocação do material na cirurgia experimental da bula timpânica pode influenciar nos resultados.⁸ Por isso, nosso estudo utilizou a via retrobulbar já descrita por outros autores, que não causa nenhum dano à MT.

Apesar de não haver diferença estatística, o grupo do GF no tempo T2 apresentou o maior percentual da mucosa da bula timpânica com espessamento intenso (81,85%). A tendência do espessamento da mucosa secundário ao GF apresentar-se mais intenso era esperado, visto que outros estudos experimentais demonstraram esse comportamento.

Krupala JL et al.¹⁵ encontraram espessamento com inflamação da mucosa em nove de dez animais em que foi utilizado GF como material de suporte. Jang CH et al.¹⁶ encontraram importante espessamento da mucosa na comparação do GF com o material Interceed®. Em seu estudo, realizou-se miringotomia com escarificação da mucosa antes do procedimento, e após três semanas os achados histológicos evidenciaram aderências e espessamento da mucosa em sete de dez orelhas com GF.¹⁶ Bahadir et al.¹⁷ encontraram espessamento moderado da mucosa ao inocular Gelfoam®, via transtimpânica, em ratos, após oito semanas de observação. Quando houve escarificação da mucosa em contato com o GF, os autores encontraram um espessamento da mucosa muito mais importante, com seis ratos de grau moderado e quatro de grau intenso, do total de dez ratos.¹⁶

O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os casos, mas houve diferença quanto à celularidade do processo. Nas orelhas preenchidas pelo BP houve maior reação inflamatória, com presença de infiltrado tanto polimorfonuclear (PMN) quanto linfomononuclear (LMN). O infiltrado PMN estava presente ao redor da esponja do BP e o infiltrado LMN na mucosa subjacente. Já nas orelhas com GF, o infiltrado LMN correspondeu à maioria dos casos e não houve presença de exsudato PMN, com diferença estatisticamente significativa entre os biomateriais.

A intensidade do exsudato também foi diferente entre os grupos, já que 85,7% do exsudato do BP foram considerados moderados a intensos no início do experimento, ao contrário do GF, que provocou reação inflamatória leve ou ausente na maioria dos casos. A reação inflamatória provocada pela esponja do BP permaneceu diferente do GF, no decorrer do experimento. Em T2, a tabela 4 revela que, na grande maioria dos casos, o BP manteve uma resposta inflamatória moderada a intensa tanto no exsudato PMN quanto no LMN, enquanto o grupo de orelhas do GF apresentou reação leve ou ausente, com diferença estatisticamente significativa. Não houve modificação da intensidade inflamatória no decorrer do tempo, o grupo do BP permaneceu com a reação mais intensa e o grupo do GF com a reação mais leve.

O BP, em outros estudos, também induziu uma resposta inflamatória importante. Em forma de membrana, na bula timpânica de ratos, o BP provocou exsudato subagudo classificado como moderado a intenso, em 33,3% dos casos.⁸ Como substituto vascular, o BP induziu reação inflamatória com presença de neutrófilos, linfócitos e fibrose.¹⁸ No tecido subaponeurótico, o BP foi testado como *sling* pubovaginal.¹⁹ Houve relato de intensa reação inflamatória com presença de PMN e células gigantes ao redor do biomaterial.¹⁹ No presente estudo, o infiltrado inflamatório revelou-se importante, principalmente no perimio da esponja; na região da bula, contralateral ao BP, não havia exsudato. Resta-nos compreender até que ponto essa reação inflamatória persistente pode prejudicar a ventilação e cicatrização da bula timpânica.

A degradação do BP apresentou-se mais lenta que a do GF, o que também contribuiu para a permanência do estímulo imunológico. A composição química do BP foi definida como um polissacarídeo celulósico, composto por diferentes bases monoméricas, a saber: glicose 87,57%; xilose 8,58%; ribose 1,68%; ácido glucurônico 0,83%; manose 0,82%; arabinose 0,37%; galactose 0,13%; fucose 0,01%; ramnose 0,01%.⁵ Apesar de, teoricamente, todos esses elementos serem facilmente

degradados no organismo, nos experimentos *in vivo*, a reação inflamatória intensa e a visualização da esponja do BP após três meses da cirurgia apontam para uma certa dificuldade, não observada na esponja derivada da derme do porco. Uma possibilidade seria a origem vegetal do BP, em contraste com a origem animal do GF. Ou mesmo uma dificuldade imunológica da espécie roedora. A permanência do BP no organismo pode ter aplicabilidade em outras situações, ou mesmo tornar-se um material de suporte não absorvível. Outros estudos biomoleculares podem ser realizados no futuro para avaliar melhor esse comportamento.

Apesar da presença do exsudato inflamatório persistente, a esponja do BP parece não induzir o processo de neovascularização e fibrose na mesma proporção que a esponja de GF. Na tabela 4 observa-se que a neovascularização foi ausente ou leve em 86,7% nas bulas com BP, e mostrou-se moderada a intensa em 72,7% no grupo do GF, com diferença estatisticamente significativa. A neovascularização ocorre como proliferação do endotélio na presença de um estímulo inflamatório. A reação imunológica provocada pelo GF permitiu a dilatação dos vasos com formação de novas tramas vasculares, que provavelmente apontam para uma organização do processo inflamatório. Essa neovascularização intensa nas orelhas com GF pode estar relacionada a uma maior taxa de fibrose em um tempo tardio. Afinal, em nosso resultado e na literatura, há maior tendência à fibrose na orelha média exposta ao GF.

Nos resultados descritivos foram evidenciadas traves de fibrose que atravessavam a cavidade da bula timpânica, não apenas fibrose na submucosa do grupo do GF. Na década de 1980, otologistas na Suécia encontraram aderências com traves de tecido conjuntivo na orelha média em reoperações de timpanoplastia e nas cirurgias programadas de revisão de mastoideomias - *second look*.²⁰ Houve a suspeita de que a esponja hemostática utilizada como suporte poderia ser a causa dessas alterações. Em cirurgia experimental com ratos, os pesquisadores suecos encontraram retração da MT com sinéquias e fibrose na orelha média na presença do Gelfoam® após dois meses.²⁰ Também observaram neoformação óssea e espessamento submucoso tanto no promontório quando no hipotímpano decorridos três meses do experimento.²⁰ Hellstrom et al. concluíram que o Gelfoam® poderia estar envolvido no insucesso de algumas cirurgias otológicas.²⁰

A presença de fibrose moderada ou intensa em 80% e 63,6% nos períodos T1 e T2, respectivamente, é compatível com a literatura, em estudos com GF. São encontradas proporções como quase 90% dos casos com fibrose moderada a severa.^{3,16,20-22} Em outros estudos, chega-se a 60% de observação de fibrose, como também há trabalhos que só observam essa alteração em 20% dos casos com GF.^{2,15,17}

A capacidade de causar fibrose endotelial faz com que o GF seja amplamente utilizado como micropartícula para embolização em procedimentos de hemodinâmica.²³ Contudo, a fibrose é indesejada na cirurgia da orelha média. Para um bom funcionamento, a cavidade timpânica deve estar bem aerada e os ossículos livres para vibrarem. O surgimento de aderências, fibrose da mucosa ou a presença de exsudato crônico prejudica a transmissão sonora e pode causar infecção secundária ou retração do neotímpano. O biomaterial ideal não deveria provocar reação inflamatória que resultasse no aumento do tecido conectivo.

A esponja de BP não causou fibrose importante, contudo houve exsudato inflamatório que poderia comprometer a cicatrização na cirurgia otológica. Não há, até os dias de hoje, descrito ou relato de biomaterial ideal para uso em contato com a mucosa da orelha média, já que a mesma é hiper-responsiva a qualquer estímulo.^{1,4} Contudo, alguns autores questionam a forma de usar o material de suporte ou preenchimento. A quantidade do material empregado, a preservação da mucosa e o uso de gotas de corticoide no transoperatório parecem favorecer um melhor resultado.^{17,24,25}

O BP é um polímero derivado da cana-de-açúcar, uma biomassa abundante no Brasil, de baixo custo aquisitivo, com capacidade de modificação de seu estado natural para gel, membrana ou esponja apenas através de fenômenos físicos, sem adição de produtos quimicamente ativos. Ele é biocompatível *in vitro*, mas ainda carece de mais estudos para garantir um resultado final satisfatório na cirurgia otológica.

Conclusão

A esponja do biopolímero da cana-de-açúcar provocou reação inflamatória com exsudato mais intenso quando comparada à esponja de gelatina absorvível. Houve pouca neovascularização e leve fibrose no grupo da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar em comparação à esponja de gelatina absorvível. Estudos posteriores poderão elucidar se esse comportamento do biopolímero da cana-de-açúcar pode ser favorável na cirurgia otológica.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Camila Sartechi por sua ajuda na análise estatística dos dados de nosso estudo. À veterinária Adriana Amorim pelo cuidado dispensado aos animais.

References

- Shen Y, Teh BM, Friedland PL, Eikelboom RH, Atlas MD. To pack or not to pack? A contemporary review of middle ear packing agents. *Laryngoscope*. 2011;121:1040-8.
- Liening DA, Lundy L, Silberberg B, Finstuen K. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;116:454-7.
- Dogru S, Haholu A, Gungor A, Kucukodaci Z, Cincik H, Ozdemir T, et al. Histologic analysis of the effects of three different support materials within rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140:177-82.
- Tonnaer ELGM, Ingels KJAO, Rijkers GT, Curfs JHAJ. Antigenic as well as nonantigenic stimuli induce similar middle ear responses in the rat. *Laryngoscope*. 2003;113:322-7.
- Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL M V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2000;42:375-83.
- Assis FD, Melo D, Marques E. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2004;49:73-7.
- Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho A, Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2006;51:45-51.
- Mayer DLB, Araújo JG de, Leal de C, Caldas Neto S da S, Ataíde RF, Mello RJV de. Membrana do biopolímero de cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média [Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear]. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011;77:44-50.
- Zollner F. The prognosis of the operative improvement of hearing in chronic middle ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1957;66:907-17.
- Wullstein H. The restoration of the function of the middle ear, in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1956;65:1021-41.
- Blaine G. Absorbable gelatin sponge in experimental surgery. *Lancet*. 1951;2:427-9.
- Schuknecht HF. Sensorineural hearing loss following stapedectomy. *Acta Otolaryngol*. 1962; 54: 336-40.
- Schuknecht HF. Gelfoam as an implant in oval window following stapedectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971;80:415-8.
- Laurent C, Hellström S, Stenfors LE. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study. *Am J Otolaryngol*. 1986;7:181-6.
- Krupala JL, Gianoli GJ, Smith RA. The efficacy of hyaluronic acid foam as a middle ear packing agent in experimental tympanoplasty. *Am J Otol*. 1998;19:546-50.
- Jang CH, Park H, Cho YB, Choi CH. The effect of Interceed for reducing adhesion as a middle ear packing agent: an experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008;72:1517-21.
- Bahadir O, Aydin S, Caylan R. The effect on the middle-ear cavity of an absorbable gelatine sponge alone and with corticosteroids. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003;260:19-23.
- Aguiar JLA, Lins EM, Marques SRB, Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV. Sugarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. *Acta Cir Bras*. 2007;22:77-81.
- Lucena R. Utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como novo material para sling pubovaginal: análise estereológica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Tese. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde; 2007.
- Hellström S, Salén B, Stenfors LE. Absorbable gelatin sponge (Gelfoam) in otosurgery: one cause of undesirable postoperative results? *Acta Otolaryngol*. 1983;96:269-75.
- McGhee MA, Dornhoffer JL. The effect of gelfilm in the prevention of fibrosis in the middle ear of the animal model. *Am J Otol*. 1999;20:712-6.
- Huang G, Chen X, Jiang H. Effects of NasoPore packing in the middle ear cavity of the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;145:131-6.
- Loffroy R, Guiu B, Cercueil J-P, Krausé D. Endovascular therapeutic embolisation: an overview of occluding agents and their effects on embolised tissues. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7:250-63.
- Park AH, Jackson A, Hunter L, McGill L, Simonsen SE, Alder SC, et al. Cross-linked hydrogels for middle ear packing. *Otol Neurotol*. 2001;27:1170-5.
- Li G, Feghali JG, Dinces E, McElveen J, Van de Water TR. Evaluation of esterified hyaluronic acid as middle ear-packing material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;127:534-9.