

Débora Lopes Bunzen Mayer



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde**

Pós-Graduação em Cirurgia

**Avaliação da resposta inflamatória da bula timpânica do rato à
membrana do biopolímero da cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Silvio da Silva Caldas Neto

Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia
do Centro de Ciências da Saúde da UFPE

Recife - PE

2009

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvado Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com:

O periódico internacional *The Laryngoscope* dedicado ao avanço da assistência ao paciente em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, adaptado da *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver), Updated October 2008*. Disponível no endereço eletrônico <http://www.icmj.org>.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

DEDICATÓRIA

iv

Aos meus pais, **Clóvis Bunzen Jr e Sônia Bunzen**
pela formação do meu caráter.

Ao meu esposo, **Cleyton**,
pelo amor e paciência.

Aos meus irmãos, **Israel e Isac**
pela alegria e descontração.

A **Marileide José de Santana (Leide)**

pelo apoio incondicional na minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Criador de todo o Universo, por sua infinita benignidade em permitir que nós, limitados seres humanos, tivéssemos o privilégio de descobrir, e recriar a natureza.

Ao **Prof. Silvio da Silva Caldas Neto**, pelo apoio e orientação não apenas nesse trabalho, mas na minha formação otorrinolaringológica.

Ao **Prof. Nicodemos Teles**, pela generosidade e incentivo no estudo morfométrico.

Ao **Prof. Roberto Melo** pela benéfica contaminação com a sua curiosidade científica e paixão pelo mundo da histologia.

Ao **Dr. Antônio Antunes Melo** pelas observações pertinentes durante a elaboração desta dissertação.

A **Dra. Adriana Ferreira**, pelo cuidado e carinho dedicado aos animais.

A **Rafael Ataíde e Juliana Gusmão**, pela ajuda voluntária no início desse estudo.

A **Maria Cecília Remígio**, amiga do mestrado, pela companhia nas dificuldades e alegrias desse projeto.

A **todos**, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos.....	19
3. LITERATURA.....	20
3.1 Materiais biológicos.....	21
3.2 Materiais sintéticos.....	24
3.3 Biopolímeros.....	25
3.4 Biopolímero da cana-de-açúcar.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 População e local do estudo.....	28
4.2 Tipo do estudo.....	28
4.3 Procedimentos.....	29
4.3.1 Ambiente.....	29

4.3.2 Anestesia.....	29
4.3.3 Procedimento cirúrgico.....	29
4.4 Preparo histológico.....	32
4.5 Análise histológica.....	33
4.6 Análise estatística.....	35
4.7 Considerações éticas.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Resultados qualitativos.....	38
5.1.1 Grupo controle.....	38
5.1.2 Grupo experimental.....	39
5.2 Resultados quantitativos.....	42
6. DISCUSSÃO.....	53
6.1 Importância do tema.....	53
6.2 Materiais.....	53
6.3 Métodos.....	56
6.4 Resultados.....	57
6.4.1 Resultados qualitativos.....	57
6.4.2 Resultados quantitativos.....	63
6.5 Considerações finais.....	66
7. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

ANEXOS.....	78
Anexo 1. Aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação.....	78
Anexo 2. Dados da espessura da mucosa e da membrana timpânica por ouvido.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BP	Biopolímero da cana-de-açúcar
bFGF	Fator de crescimento básico do fibroblasto
CAE	Canal auditivo externo
CCB	Centro de Ciências Biológicas
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epitelial
HE	Hematoxilina-eosina
LB	Luz da bula timpânica
MT	Membrana timpânica
n	Número da amostra
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
p	Probabilidade de erro
PDGF-AA	Fator AA de crescimento derivado de plaquetas
PSR	Picrosirius Red
PTFE	Politetrafluoretileno
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da intensidade da atividade inflamatória segundo o tipo de material	41
Tabela 2	Avaliação do grau de absorção segundo o tipo de material	42
Tabela 3	Média, desvio padrão e mediana da medida da espessura da mucosa da bula timpânica, em micrômetros, por tempo de avaliação em cada material	43
Tabela 4	Avaliação do grau de espessura da mucosa, em micrômetros, em cada material	43
Tabela 5	Média, desvio padrão e mediana da espessura da MT, em micrômetros, por tempo de avaliação em cada material	44
Tabela 6	Avaliação do grau da espessura da MT, em micrômetros, em cada material	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exposição da fáscia abdominal. Rato em decúbito dorsal.....	30
Figura 2	Cirurgia otológica com inoculação do material através da membrana timpânica.....	31
Figura 3	Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar na parte superior da fotografia e a fáscia abdominal abaixo.....	31
Figura 4	Fotomicrografia da superfície mucosa da bula timpânica da orelha esquerda. Epitélio ciliado normal. HE (aumento 400x).....	45
Figura 5	Fotomicrografia de pólipos inflamatórios observados na mucosa da orelha esquerda do rato 13. Observa-se infiltrado inflamatório na submucosa e dilatação vascular provocando espessamento moderado. HE (aumento 100x).....	45
Figura 6	Fotomicrografia da membrana timpânica normal da orelha esquerda do rato 23. Observa-se fáscia aderida ao promontório e a mucosa com espessamento leve. HE (aumento 40x).....	46
Figura 7	Fotomicrografia evidenciando miringoesclerose com fibrose e espessamento intenso MT da orelha esquerda do rato 16. HE (aumento 40x).....	46
Figura 8	Fotomicrografia da fáscia circundada por fina camada fibrosa na orelha esquerda do rato 15, aderida à mucosa da bula timpânica. HE (aumento 100x).....	47
Figura 9	Fotomicrografia da fáscia invadida por células inflamatórias. Nota-se o	

	exsudato intenso na bula e o espessamento da mucosa em contato com fásia. Orelha esquerda do rato 8. HE (aumento 100x).....	47
Figura 10	Fotomicrografia do exsudato subagudo moderado na orelha direita do rato 2. HE (aumento de 100x).....	48
Figura 11	Fotomicrografia da reação inflamatória crônica na orelha direita do rato 5. Observa-se infiltrado monocítico leve circundado o biopolímero, com trave de fibrose ligando o mesmo a mucosa da bula timpânica. Essa se apresenta espessada com edema e infiltração celular. HE (aumento de 100x).....	48
Figura 12	Detalhe da figura 14 evidenciando células gigantes englobando fragmento do biopolímero da cana-de-açúcar. HE (aumento de 1000x).....	49
Figura 13	Fotomicrografia do biopolímero incorporado à membrana timpânica da orelha direita do rato 10. HE (aumento de 100x).....	49
Figura 14	Fotomicrografia do biopolímero na bula timpânica da orelha direita do rato 17. HE (aumento de 40x).....	50
Figura 15	Fotomicrografia da bula timpânica direita do rato 9. Observar espessamento intenso da mucosa. A coloração do PSR evidencia o colágeno nas cores vermelho e verde. PSR (aumento de 40x)	50
Figura 16	Fotomicrografia evidenciando mirringoesclerose com infiltrado inflamatório mononuclear na membrana timpânica da orelha direita do rato 7 causando espessamento intenso. HE (aumento 400x)	51
Figura 17	Fotomicrografia da membrana timpânica espessada na sua porção em contato com o biopolímero. Exsudato moderado apenas ao redor do biopolímero. HE (aumento 40x)	51
Figura 18	Fotomicrografia da infiltração celular entre as fibras do biopolímero	

observada na bula timpânica direita do rato 7. HE (aumento de 100x)..... 52

Figura 19 Fotomicrografia da desorganização estrutural do biopolímero e sua absorção parcial, observadas na bula timpânica direita do rato 12. HE (aumento de 40x)..... 52

RESUMO

Introdução: A membrana de biopolímero da cana-de-açúcar tem sido utilizada experimentalmente em diversas áreas. Na Otologia existe a possibilidade da mesma ser utilizada como enxerto, na substituição da fáscia do músculo temporal. **Objetivos:** Analisar os resultados da interação da membrana de biopolímero da cana-de-açúcar com a bula timpânica do rato, comparada com a fáscia autóloga. **Materiais e Métodos:** Foi realizado estudo experimental, prospectivo, pareado com 24 ratos Wistar. Na orelha direita foi inoculada a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar, e na orelha esquerda, a fáscia autóloga. Os ratos foram sacrificados com 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia. As bulas timpânicas foram submetidas à análise histológica descritiva e histomorfométrica. O índice de absorção dos materiais foi analisado. **Resultados:** A análise histomorfométrica obtida através das médias das mensurações da membrana timpânica e da espessura da mucosa foi semelhante em ambas as orelhas. A análise descritiva evidenciou que o biopolímero causou mais exsudato que a fáscia precocemente, porém após 12 semanas, não havia mais reação inflamatória. Houve absorção total do biopolímero em três casos ao final do experimento. **Conclusão:** O biopolímero tem a capacidade de produzir exsudato precocemente, comparado com a fáscia, mas isso não influenciou o resultado final. O biopolímero é biocompatível, sendo absorvido completamente na bula timpânica. A membrana do biopolímero da cana-de-açúcar apresentou características que a capacitam como enxerto futuro na cirurgia otológica.

Descritores: Biopolímero, Timpanoplastia, Materiais biocompatíveis, Orelha média, Fáscia

Introduction: Biopolymer sugar cane membrane has been used experimentally on several areas. It is possible that it can be used as otological graft instead of temporalis fascia.

Objective: This study analyzed the interaction results of the biopolymer sugar cane membrane with rat tympanic bulla. **Materials and Methods:** It was performed an experimental, prospective, paired study with 24 Wistar rats. The biopolymer sugar cane membrane was inoculated inside right ear and inside left ear, autograft fascia. Rats were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after surgery. Tympanic bulla was analyzed by histological descriptive and histomorphometric assay. **Results:** The histomorphometric assay obtained by tympanic membrane and bulla cavity mucosa thickness averages measurements were the same on both ears. The descriptive assay shows that the biopolymer caused more exudate than fascia early, but after 12 weeks there was no inflammatory reaction. There was total absorption of the biopolymer in three cases at the end of the experiment. **Conclusion:** The biopolymer is able to produce exsudate early, but it is not important to the final result. The biopolymer membrane is biocompatible and can be completely absorbed inside tympanic bulla. The biopolymer membrane showed features that made it enable to be used as future graft in otologic surgery procedures.

Keywords: Biopolymer, Tympanoplasty, Biocompatible materials, Middle ear, Fascia

INTRODUÇÃO

A inflamação é fundamentalmente uma reação protetora e seu objetivo final é livrar o organismo de algo que esteja causando lesão celular e das conseqüências dessa lesão (células e tecido necrótico), sem a mesma, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam e os órgãos danificados poderiam tornar-se chagas ulceradas permanentes.¹ Contudo, a inflamação e a reparação são potencialmente lesivas. Um dano à mucosa da fenda auditiva pode desencadear respostas inflamatórias de grau variado em sua intensidade e celularidade.

A fenda auditiva é dividida anatomicamente em caixa timpânica ou orelha média e cavidade mastóidea.² A distribuição do epitélio de revestimento da orelha não é uniforme em toda sua extensão. Sua porção anterior é uma extensão da mucosa da nasofaringe via tuba auditiva.³ Na região do hipotímpano, 80% do epitélio é ciliado com glândulas submucosas e à medida que se caminha na direção da cavidade mastóide, essas células tornam-se mais escassas.^{2,3}

O limite lateral da orelha média é a membrana timpânica (MT). A MT é composta por três camadas: epidérmica (externa), mesodérmica (média) e mucosa (interna).² A proliferação epitelial e sua renovação ocorrem de forma centrífuga, ou seja, do *umbus* para o ânulo timpânico.⁴ Uma lesão que resulta na perfuração da MT acelera o processo de proliferação epitelial em toda a extensão da membrana; a cicatrização, então, inicia-se por correntes migratórias epiteliais na direção das bordas da perfuração.⁴

A perfuração crônica da MT pode implicar na diminuição da acuidade auditiva e infecções recorrentes na orelha média. A cirurgia para sua correção é a miringoplastia, que consiste no reavivamento das bordas da perfuração e na colocação de um enxerto na

superfície danificada.⁵ O termo timpanoplastia é utilizado quando há manipulação da cadeia ossicular, além da correção da MT perfurada; timpanoplastia com mastoidectomia, quando o espaço da mastóide precisa ser explorado ou aerado.⁵ Materiais de suporte também são utilizados na cirurgia, como o Gelfoam[®] (membrana porosa de gelatina proveniente de proteínas extraídas da pele do porco), em contato com a mucosa da orelha média e com a face medial do remanescente timpânico.⁵

Durante a cirurgia, nem sempre a quantidade e maleabilidade de tecido do próprio indivíduo são suficientes para sua utilização como enxerto. Desta forma, o desenvolvimento de enxertos biocompatíveis tem sido motivo de estudo. São estudadas membranas e próteses desenvolvidas a partir de materiais biológicos (gordura, pericôndrio e peritônio de ovelhas), e materiais não-biológicos (cerâmicas e plásticos).⁶⁻

⁸ Materiais semi-sintéticos acelulares obtidos da derme e o látex também estão sendo testados.^{9,10}

Dentro deste contexto de desenvolvimento de novos biomateriais, um exopolissacarídeo produzido por síntese da bactéria *Zoogloea sp*, a partir do melaço de cana-de-açúcar, foi criado no laboratório de Microbiologia Industrial da Estação Experimental da Cana-de-Açúcar de Carpina/Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, a partir de 1990.¹¹ As membranas formadas a partir deste biopolímero foram processadas e testadas laboratorialmente quanto a sua flexibilidade, toxicidade e resistência.¹²

O estudo das reações dos materiais na mucosa da bula timpânica dos ratos é importante, pois permite prever o comportamento da mucosa da orelha média dos seres humanos frente às diversas substâncias. Sabe-se que esta mucosa apresenta resposta inflamatória intensa à maioria dos agentes agressores. Um estudo foi feito inoculando-se substâncias inertes, bactérias patogênicas e não-patogênicas na orelha média dos ratos,

sem encontrar diferenças importantes da intensidade da resposta inflamatória em relação a cada substância, exceto quando havia uma bactéria viva.¹³ Concluiu-se que independente do tipo de substância em contato com a mucosa da bula timpânica do rato, esta é altamente reativa, existindo a possibilidade de se produzir uma otite média.¹³

O processo de produção do biopolímero a partir do melão da cana-de-açúcar apresenta uma alta taxa de conversão, o que viabiliza sua extensa aplicação a um custo financeiro mais acessível, quando comparado aos outros materiais sintéticos tradicionais. O uso do biopolímero da cana-de-açúcar na Cirurgia Otológica requer estudos que analisem a reação inflamatória da mucosa da orelha média frente a este material.

OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a resposta inflamatória da mucosa da orelha média de ratos em contato com membrana do biopolímero da cana-de-açúcar.

2.2 Específicos

- Analisar qualitativamente o processo reacional na bula timpânica dos animais, na presença do biopolímero da cana-de-açúcar em comparação com a fáscia abdominal. De acordo com:
 - O tipo e a intensidade da atividade inflamatória;
 - A presença de fibrose;
 - As alterações morfológicas da membrana timpânica;
 - As alterações morfológicas da mucosa da bula timpânica.
- Analisar quantitativamente o processo reacional na bula timpânica dos animais, na presença do biopolímero da cana-de-açúcar em comparação com a fáscia abdominal. De acordo com:
 - A espessura da MT;
 - A espessura da mucosa da bula timpânica.
- Comparar o índice de absorção da membrana de biopolímero da cana-de-açúcar com o da fáscia abdominal

LITERATURA

A perfuração timpânica é comum na prática otorrinolaringológica. Existem diversas apresentações clínicas e alterações histopatológicas dessa condição que podem ser agrupadas em otite média crônica colesteatomatosa e não-colesteatomatosa. Na perfuração permanente não-colesteatomatosa, a otorréia relaciona-se a infecções das vias aéreas superiores e banhos de imersão.^{5,14} A perda auditiva, predominantemente do tipo condutiva, e o risco de complicações infecciosas da otite média crônica ainda somam-se ao sofrimento pessoal e familiar causado pelas restrições sociais impostas pela doença.¹⁴

O tratamento da otite média crônica é cirúrgico. Apesar da técnica empregada, os principais objetivos da cirurgia são a erradicação da doença, com consequente obtenção de uma orelha média seca; uma membrana timpânica intacta; preservação ou reconstrução do complexo da orelha média/externa e restauração dos mecanismos que conduzem o som.⁵

Há relatos de que as primeiras cirurgias que visavam o fechamento das perfurações da MT foram realizadas por Toynbee em 1853, por Kessel em 1878, e por Stacke em 1893.¹⁵ A falta de microscópio cirúrgico e dos antibióticos determinou o abandono dessas cirurgias de modo precoce. Essas foram retomadas graças aos trabalhos de Wullstein em 1956¹⁶ e Zollner em 1957¹⁷, os quais lançaram as bases da timpanoplastia moderna. Na década de 60 divulgou-se o uso de veia como enxerto¹⁸. O uso da cartilagem do tragus também se iniciou nessa década e atualmente pode-se usá-la com ou sem pericôndrio, ou o pericôndrio isolado.^{15,19} Storrs foi o primeiro a usar fásia autóloga em 1961.²⁰ O enxerto, independente do material, funciona como um substituto

do extrato córneo sobre o qual deslizam correntes de migração epitelial, a fim de reparar a perfuração; pode ser posicionado lateral ou medial ao remanescente timpânico.^{5,14}

As principais cirurgias em otologia que necessitam de biomateriais são aquelas para reparo da perfuração da MT e para reconstrução da cadeia ossicular. Os materiais podem ser biológicos ou sintéticos segundo a sua origem orgânica ou não.²¹

Os materiais biológicos utilizados na cirurgia podem ser classificados como:

- 1) Autólogo - material retirado do próprio indivíduo. Ex. fâscia abdominal;
- 2) Homólogo - material retirado de outro indivíduo. Ex. tecido de cadáveres humanos;
- 3) Heterólogo - material retirado de outra espécie animal. Ex. pericárdio bovino.

3.1 Materiais Biológicos

Os materiais biológicos autólogos são substitutos biológicos cuja fonte é o próprio indivíduo. Sua vantagem é a ausência de reações adversas e o fácil acesso durante o ato cirúrgico. A desvantagem é que nem sempre suas características biomecânicas são compatíveis com o elemento a ser substituído, além da limitação tecidual tanto na extensão quanto na quantidade do enxerto.²¹

Na Cirurgia Otológica os materiais autólogos podem ser gordura, pericôndrio, cartilagem, dura-máter, periósteo do osso temporal, fâscia do músculo reto abdominal e fâscia do músculo temporal.^{6,15,21} Um dos enxertos autólogos mais utilizados é a fâscia do músculo temporal.²² Apesar da facilidade de acesso, a morbidade relacionada a este enxerto deve ser considerada, como o aumento do tempo cirúrgico e o trauma aos

tecidos retroauriculares. Outro fator limitante no uso da fásia é a impossibilidade de ser usada em cirurgias revisionais.²¹ O sucesso cirúrgico com melhora auditiva e fechamento da perfuração timpânica relatado na literatura varia de 53 a 97%, pois há discrepância no acesso, na técnica do posicionamento do enxerto, do tipo de material empregado e na população estudada.⁵ Um levantamento brasileiro, em serviço de residência médica, apontou sucesso no fechamento da perfuração da MT em 80,4% nas miringoplastias realizadas no Hospital das Clínicas da UFPE. Neste estudo utilizou-se a fásia autóloga como enxerto pela técnica medial, na maioria dos casos.²³ Um outro estudo, também realizado em um serviço de residência médica, apresentou 65% de sucesso cirúrgico na Faculdade de Medicina do ABC²⁴. Este utilizou fásia na técnica medial ou cartilagem *inlay*. Estima-se que nos centros de Otologia há uma taxa de 10% a 20% de reoperação, sem contabilizar aqueles pacientes em que a cirurgia revisional já é programada (*second look*).²² Nas cirurgias revisionais há necessidade do otologista dispor de outros tipos de enxertos. Já nas cirurgias de mastoidectomias abertas com canalplastia a área exposta é grande e um enxerto amplo é necessário.^{25,26,27}

Os enxertos homólogos mais utilizados são a própria fásia e a dura-máter, neste caso, retiradas de cadáver humano. Foram analisadas as propriedades biomecânicas de três diferentes tipos de materiais homólogos: fásia temporal, fásia lata e dura-máter. Nesse estudo, os autores concluíram que a fásia lata (Tutoplast Fascia Lata[®]) obteve o melhor desempenho vibratório *in vitro*.²⁸ Outro trabalho, comparou a fásia autóloga com membrana amniótica homóloga sem diferença entre os resultados cirúrgicos.²⁹ Contudo, esse tipo de material biológico é pouco utilizado pelo risco de transmissão de vírus e príons. Há relato da doença de Creutzfeldt-Jakob adquirida provavelmente através de um enxerto cadavérico da dura-máter utilizado na cirurgia otológica.^{30,31}

Os xeno-enxertos, ou enxertos heterólogos também são pouco utilizados. Estudo

utilizando Zenoderm[®], uma membrana de colágeno da derme suína, obteve sucesso cirúrgico na timpanoplastia em apenas 40% dos casos.³² Já no uso do Alloderm[®], em chinchilas, obteve-se 90% de fechamento da perfuração timpânica.³³

O Epidisc[®] e o Epifilm[®] são membranas confeccionadas a partir de um éster do ácido hialurônico. É relatado o uso do Epifilm[®], com reabsorção do mesmo após duas semanas, mas com permanência da perfuração timpânica. Os autores não recomendam seu uso na miringoplastia.³⁴ Há ainda relato de peritônio de ovelhas, pericárdio bovino, papel de arroz associado ao ácido hialurônico, membrana acelular do intestino do porco, dentre outros.^{7,35,36}

Substâncias desenvolvidas através da biologia molecular estão sendo estudadas também. Autores obtiveram 80% de fechamento da perfuração utilizando Gelfoam[®] embebido em fator de crescimento epitelial (EGF) na miringoplastia experimental.³⁷ Existe avanço no uso tópico dos fatores de crescimento presentes na fase inflamatória da cicatrização da MT. Os mais promissores são o EGF, o fator de crescimento básico do fibroblasto (bFGF) e o fator AA de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA).³⁸

Paralelamente ao desenvolvimento de novos materiais para enxerto na cirurgia otológica, novos materiais que possam ser usados como suporte para o próprio enxerto, também estão sendo desenvolvidos. O Gelfoam[®], amplamente empregado como material hemostático e de suporte, vem sendo questionado pelo seu potencial de causar fibroses extensas na orelha média. Estudos revelam alta incidência de fibrose na orelha média dos ratos em contato com Gelfoam[®] comparado a outros materiais.^{39,40} Alguns estudos sugerem o uso de corticóide tópico ou uma membrana de Gelfim[®] (membrana não-porosa de gelatina) associado ao Gelfoam[®] a fim de prevenir fibrose.^{41,42} Um material para ancoragem deve apresentar boa resistência, baixa toxicidade, elasticidade e produzir o menor dano possível à mucosa da orelha média.

3.2 Materiais sintéticos

Os materiais sintéticos são produzidos a partir de substâncias não-orgânicas. A vantagem dessas próteses observa-se principalmente na cirurgia de reconstrução da cadeia ossicular, onde se faz necessário um material resistente. Plásticos como Dacron[®] (polietileno tereftalato) e Teflon[®] (politetrafluoretileno), além de metais como titânio, platina e o Plastipore[®] podem ser utilizados. São considerados semibiológicos as cerâmicas como ceravital e hidroxiapatita.^{5,8} Um levantamento sobre materiais na cirurgia otológica mostrou que 82% dos otologistas americanos utilizam próteses de hidroxapatita seguida pelos ossos autólogos ou homólogos, na reconstrução da cadeia ossicular.⁴³

Com o propósito de reduzir a incidência de extrusão, pode ser realizada a interposição da cartilagem às próteses sintéticas. Contudo, histologicamente, com o tempo, tendem a desenvolver condromalácia, com perda do formato e tendência a reabsorção.²¹

A prótese sintética ideal não sofre modificações da sua estrutura com o passar do tempo, é quimicamente inerte e biocompatível. Esta prótese ainda é capaz de resistir às diferentes forças mecânicas de tensão e vibração, no caso da transmissão sonora na orelha média. Vários estudos ainda são realizados a fim de se produzir a prótese ideal. O alto custo do material sintético dificulta seu uso no serviço público, principalmente nos países em desenvolvimento,^{5,8}

3.3 Biopolímeros

Um polímero é uma macromolécula composta por dezenas de milhares de unidades (monômeros), que são unidas por ligação química covalente.⁴⁴ O termo biopolímero pode ser aplicado para diferentes tipos de polímeros. São considerados biopolímeros: os polímeros que são biologicamente ativos (como as proteínas) e os sintéticos biocompatíveis, que são utilizados em aplicações biomédicas (como o silicone e o teflon).⁴⁴

Diferentes tipos de biopolímeros podem ser produzidos por bactérias, independente das mesmas se propagarem em culturas de suspensão ou biofilme. Os polímeros bacterianos, quase que exclusivamente polissacarídeos, podem ser intracelulares ou extracelulares.¹¹ Os polímeros extracelulares ou exopolissacarídeos bacterianos tem sido o foco de muitas pesquisas pelo interesse industrial, pois apresentam potencial para substituir os polímeros produzidos por algas marinhas e plantas (gomas).^{45,46}

Os polímeros derivados de óleos vegetais, também são denominados biopolímeros. Neste campo tem destaque o biopolímero de mamona e o látex da seringueira, aquele tem sido testado para reconstrução de falhas ósseas, enquanto este tem sido utilizado nas cirurgias abdominais, cirurgias esofagianas e mais recentemente na cirurgia otológica.^{47,48,49}

Foi realizado um estudo com a membrana de biopolímero de látex da seringueira com polilisina a 0,1% em pacientes submetidos à miringoplastias. A membrana de látex, que serviu como suporte, foi colocada na face externa dos bordos da perfuração da MT, em contato com a fáscia temporal. Foram 200 orelhas operadas com fechamento da MT em 181 orelhas.¹⁰ Em outro estudo, utilizaram a membrana de látex natural para forrar a neocavidade na cirurgia da timpanomastoidectomia com cavidade aberta. Concluiu-se

que a utilização da biomembrana de látex revelou-se método eficaz no revestimento da neocavidade, facilitando a remoção do tampão e a epitelização da mesma.⁵⁰

3.4 Biopolímero da cana-de-açúcar

A *Zoogloea ramifera* 115, uma bactéria Gram negativa, foi primeiramente isolada por Friedman & Dugan em 1968.⁵¹ Essa bactéria produziu um exopolissacarídeo altamente ramificado, inicialmente denominado *Zoogloean*, que apresentava um comportamento reológico peculiar, com afinidade para íons metálicos e aminoácidos.⁵² Posteriormente, o microorganismos *Zoogloea sp* foi isolado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar em Carpina – UFRPE e identificado no Departamento de Antibióticos da UFPE.¹¹

Cultivada em um meio rico em carboidratos, no caso, o melaço da cana-de-açúcar, a *Zoogloea sp* produziu, por processo de fermentação, um exopolissacarídeo (biopolímero) com taxa de conversão de 50%.⁵³ A composição química deste material foi definida como um polissacarídeo celulósico, composto por diferentes bases monoméricas, sendo as principais: glicose 87,6%, xilose 8,6%, ribose 1,7%, ácido glucurônico 0,8%, manose 0,8%, arabinose 0,4%, galactose 0,1%.^{11,53}

O biopolímero *in natura*, com açúcares residuais, foi utilizado como curativos no tratamento de feridas acidentais em cães. Os curativos promoveram o aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização.⁵⁴

Este biopolímero *in natura* foi purificado e tratado, resultando em um tecido homogêneo, estável, biocompatível, com baixa toxicidade e com características físicas e químicas que atendem às especificidades morfofuncionais de diferentes tecidos. Castro et al, comprovaram sua histocompatibilidade e baixa citotoxicidade *in vitro*.¹²

Estudos experimentais desenvolvidos no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE com o biopolímero da cana-de-açúcar em forma de membrana foram realizados em diversas áreas médicas, como urologia, cirurgia vascular, neurocirurgia e otorrinolaringologia.⁵⁵⁻⁵⁹

Foi comprovado que a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar na reconstrução ureteral em cães é capaz de substituir tecidos biológicos com boa tolerabilidade e pequeno grau de reação inflamatória.⁵⁵ Ainda na Urologia, um estudo em ratas avaliou o emprego do biopolímero como tratamento para incontinência urinária. Nesse estudo observou-se que a membrana de biopolímero mostrou-se adequada como *sling* pubo vaginal.⁵⁶

Na cirurgia vascular, a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar foi comparada ao e-PTEF, como remendo em arterioplastias femorais em cães. O estudo entretanto, não observou diferença significativa entre os dois materiais concluindo que a membrana pode ser utilizada como remendo arterial.⁵⁷

Na neurocirurgia, a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar foi utilizada como enxerto substitutivo da dura-máter com resultados semelhantes ao material controle.⁵⁸

Na otologia, foi estudada a perfuração crônica produzida por eletrocautério na MT da *Chinchilla laniger*, onde foi observada cicatrização no grupo experimental semelhante ao grupo com a fâscia.⁵⁹

A partir desses trabalhos, desenvolveu-se o presente estudo. O objetivo foi analisar o comportamento do biopolímero da cana-de-açúcar em contato com a face medial da MT e com a mucosa da orelha média. O estudo primou por avaliar e ampliar a possível utilidade do biopolímero como material de enxerto ou suporte nas cirurgias otológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População e local do estudo

No presente estudo foram utilizados 46 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, sadios, da linhagem Wistar, pesando de 335 a 440g (média de 392g), com cerca de quatro meses de idade. Os animais foram adquiridos no Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Como critério de exclusão foi considerado qualquer alteração na orelha média ou alteração na membrana timpânica (perfuração ou miringosclerose). Nove ratos apresentaram otite média aguda ou otite média com efusão, e um rato apresentou miringosclerose que comprometia toda a extensão da membrana timpânica. Foram, então, excluídos dez ratos do estudo.

Os 36 animais incluídos no estudo foram operados e acompanhados no NCE do Departamento de Cirurgia da UFPE. O experimento ocorreu no período de junho a setembro de 2008. A preparação inicial das lâminas foi feita no Laboratório de Citologia e Histologia Quantitativa do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A análise histológica e o preparo da segunda coloração foram feitas no Laboratório do Mestrado em Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da UFPE. E as microfotografias das lâminas, no setor de Morfometria e Análise de Imagem do mesmo Departamento.

4.2 Tipo de estudo

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

4.3 Procedimentos

4.3.1 Ambiente

Os animais foram mantidos no biotério, com refrigeração constante a 22°C(+/- 2°C), em gaiolas coletivas com cinco animais antes do experimento, com piso de serragem e gaiolas individuais após o experimento. O local oferecia iluminação programada a cada 12 horas. Foram alimentados com ração industrializada do tipo Labina[®] *ad libitum*.

4.3.2 Anestesia

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

4.3.3 Procedimento cirúrgico

O total de 72 orelhas de ratos foi subdividido em dois grupos:

- ❖ **Grupo controle - fáscia:** 36 orelhas esquerdas
- ❖ **Grupo experimental - biopolímero:** 36 orelhas direitas

Todos os animais foram submetidos à otomicroscopia com microscópio cirúrgico (marca D.F. Vasconcelos[®] de coluna, modelo MC-M31), com luz fria, equipado com cinco prismas de magnificação de 6, 10, 16, 25 e 40 aumentos, lente ocular com aumento de

12,5x e lente objetiva com 250 mm de distância focal. Após a otomicroscopia com aumento de 10x, os ratos incluídos foram submetidos à cirurgia otológica e abdominal.

Cirurgia abdominal: Em todos os ratos incluídos foi realizada incisão cutânea abdominal com cerca de 1 cm, após tricotomia e antisepsia com Povidine®. Utilizando pinças delicadas, houve o afastamento por planos com dissecação da fáscia abdominal superficial. Foi retirado 0,5 cm x 0,5 cm da fáscia (figura 1). A pele foi suturada com fio de Nylon 4-0. A fáscia retirada foi desidratada sob foco de luz direta. Em seguida, houve o ajustamento dos bordos e das dimensões da mesma, a fim de ser utilizada no grupo controle.



Figura 1 - Exposição da fáscia abdominal. Animal em decúbito dorsal.

Cirurgia otológica: Nas orelhas do grupo experimental, a MT foi perfurada utilizando-se um estilete cirúrgico na sua parte tensa, com auxílio do microscópio cirúrgico descrito. Em seguida foi introduzida uma fita da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar de 3mm de comprimento e 1mm de espessura. A fita de biopolímero foi posicionada tocando a face medial da MT em uma extremidade e tocando a mucosa do promontório na outra extremidade. Nas orelhas do grupo controle, foi introduzida a fáscia

abdominal autóloga, retirada previamente com as mesmas dimensões da membrana do biopolímero (figuras 2 e 3).



Figura 2 - Cirurgia otológica com inoculação do material através da membrana timpânica.

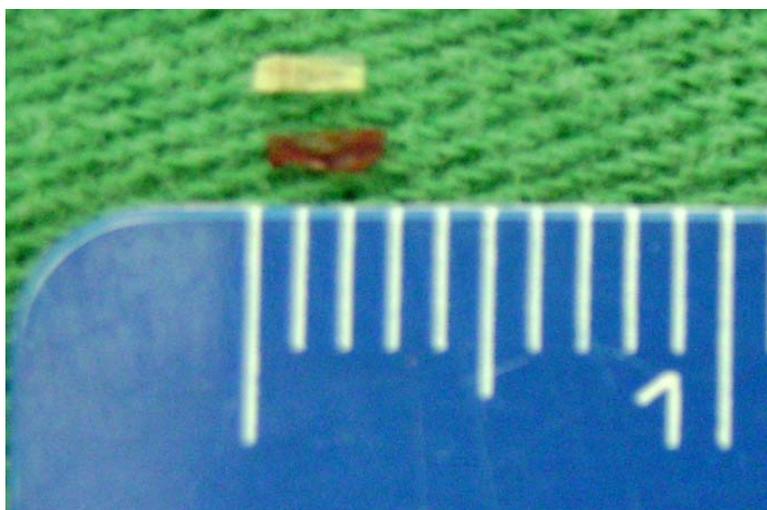


Figura 3 - Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar na parte superior da foto e a fâscia abdominal logo abaixo.

Após o experimento os animais foram subdivididos aleatoriamente, através de sorteio, em três grupos: t1 (sacrifício após quatro semanas da cirurgia), t2 (sacrifício após oito semanas da cirurgia) e t3 (sacrifício após doze semanas da cirurgia). Cada grupo

contou com 12 ratos, contudo houve um óbito logo após o procedimento em um caso do grupo t1. Este subgrupo ficou com 11 animais.

Ao final de cada tempo específico, todos foram sacrificados sob anestesia geral. Foi administrado, por via intraperitoneal, o tiopental sódico, seguido da dose letal deste barbitúrico por injeção intra-cardíaca. Após o sacrifício, foram removidas suas bulas timpânicas para estudo.

4.4 Preparo histológico

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 24h. A fim de se obter melhor fixação, foi feita uma abertura de 5mm 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, submetido a processo de clarificação em xilol e incluídos em parafina. Já incluídas em blocos de parafinas, as peças foram levadas para corte de 5 μ m de espessura em micrótomo (Spencer AO) com intervalo de 10 μ m. Os cortes foram feitos em plano transversal ao da MT.

O material foi, por fim, submetido a coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Em algumas lâminas, foi feita, além da HE, outra coloração utilizando a solução Sirius red e Pícrico aquoso pelo método de rotina do Pícosirius Red (PSR).

4.5 Análise histológica

Após todas as lâminas serem processadas, foram selecionadas aquelas cujo corte situava-se na altura do final do cabo do martelo, juntamente com as lâminas 2 cortes acima e abaixo deste ponto. Os cortes selecionados foram submetidos à análise qualitativa por um patologista experiente, com a participação do pesquisador. Na análise, foram observadas a morfologia da mucosa e da membrana timpânica das bulas, o tipo e a intensidade da reação inflamatória, a presença de fibrose e o comportamento do biopolímero comparado com a fâscia autóloga.

O tipo de reação inflamatório foi dividido em agudo, subagudo e crônico. O padrão histológico agudo caracteriza-se por exsudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e a emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. O padrão crônico é caracterizado pela presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. O tipo subagudo é definido como a reação inflamatória com componentes do padrão agudo e crônico simultaneamente.

Alguns critérios semi-quantitativos foram adotados. A intensidade do processo inflamatório foi descrita da partir da observação da celularidade no exsudato, da extensão do processo pela cavidade da bula timpânica e pela presença de necrose celular. 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, ausência de necrose; moderada – exsudato com infiltração celular em quantidade moderada, reação envolvendo entre 1/3 e 2/3 da luz da bula, presença de pouca necrose; intensa – exsudato com infiltração celular em grande quantidade, reação envolvendo mais que 2/3 da luz da bula, necrose intensa.

A fibrose caracterizou-se pela presença de fibroblastos e deposição de colágeno na matriz extracelular. A fim de confirmar a presença da fibrose, em algumas lâminas selecionadas pelo patologista, além da coloração HE, também foi utilizada a coloração PSR. O PSR cora o colágeno em tons de verde ao vermelho. Na luz polarizada há como distinguir o colágeno tipo I, imaturo (verde) do colágeno tipo II, maduro (vermelho). Contudo fazer essa diferenciação não foi o objetivo desse estudo. A fibrose subepitelial da bula foi classificada em leve, moderada e intensa, conforme critérios do patologista.

Na avaliação do grau de absorção do material na bula timpânica foi considerado: nulo- presença do material sem sinais de absorção; absorção leve- fragmentação periférica com infiltração celular do material; absorção moderada- fragmentação central com infiltrado celular; absorção intensa- total fragmentação do material; absorção completa- ausência do material.

Para análise morfométrica, as lâminas histológicas foram digitalizadas. Utilizou-se para esse fim, um microscópio Opton TBN-04T-PL binocular de lente ocular com aumento de 10x (WF 10x/20), acoplado a câmera Moticam 1000 de 1.3 megapixel e placa de captura de imagens associada ao software Motic Image Plus versão 2.0.

Foram realizadas microfotografias de dois pontos da MT: anterior e posterior ao cabo do martelo e microfotografia de três pontos da mucosa: no promontório, na parede anterior e posterior da bula. A análise morfométrica foi realizada por meio do software de computação gráfica IMAGE J 9.1, calibrado com régua em micrômetros da marca Carl Zeiss[®]. Foram executadas cinco mensurações, duas da MT e três da mucosa da bula, em cada lâmina selecionada. Foram calculadas as médias das mensurações em cada orelha.

As médias finais, correspondentes à espessura da MT e da mucosa, foram classificadas pelo critério usado por Melo⁶⁰. É importante ressaltar que, na maioria dos estudos analisados na literatura, não há menção à quantificação da atividade inflamatória

pela mensuração da espessura da mucosa da bula ou da membrana timpânica. Comumente, os estudos fazem uma análise apenas semiquantitativa, estabelecendo critérios visuais arbitrários para definir o grau da inflamação daquelas estruturas.

A espessura da mucosa das bulas timpânicas dos ratos Wistar foi classificada como normal ($\leq 15\mu\text{m}$), leve (> 15 e $\leq 50\mu\text{m}$), moderada (> 50 e $\leq 100\mu\text{m}$) ou intensa ($> 100\mu\text{m}$); a espessura da MT foi classificada como normal ($\leq 15\mu\text{m}$), leve ($> 15 \leq 20\mu\text{m}$) e moderada ($> 20\mu\text{m} \leq 30$).⁶⁰ No presente estudo, foi acrescentado o critério para espessamento intenso da MT ($> 30\mu\text{m}$).

4.6 Análise estatística

Na análise estatística foi verificado se existe ou não diferença significativa entre o grupo experimental e o grupo controle. Para cada um dos grupos, foi verificado se existe ou não diferença significativa entre os tempos de avaliação.

Na análise dos dados foram obtidas as medidas estatísticas descritivas: média, mediana e desvio padrão. Foram utilizados os testes estatísticos Wilcoxon para dados pareados e Kruskal-Wallis com comparações pareadas do referido teste. Também foi utilizado o teste de McNemar-Bower e o teste Exato de Fisher. Ressalta-se que a escolha dos testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis, foi devido ao pequeno número de casos em cada semana e da variabilidade que se mostrou elevada em algumas avaliações.

A digitação dos dados foi realizada na planilha EXCEL e os cálculos estatísticos, através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) na versão 15. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi 5,0%.

4.7 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 em Experimentação Animal do CCB da UFPE, no qual está registrado sob o protocolo nº 23076.019069/2008-11. 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 (Anexo I). 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 NCE durante o experimento.

RESULTADOS

Os resultados apresentados foram divididos em resultados qualitativos e quantitativos. Foram comparadas para fins de análise a orelha esquerda e direita em amostra pareada dos dois grupos, assim como foram comparados os tempos de evolução do experimento, t1 (quatro semanas), t2 (oito semanas) e t3 (12 semanas). Todos os ratos sobreviveram ao procedimento exceto um pertencente ao grupo T1 que veio a óbito provavelmente por complicações anestésicas. A cicatrização da ferida abdominal ocorreu sem intercorrência e similar entre os grupos. Foram excluídos 11 animais do total dos 36 operados. No grupo t1: um rato por contaminação por queratina na orelha média e dois por contaminação bacteriana. No grupo t2: um rato pela penetração de pêlo na bula timpânica, dois por contaminação bacteriana e um rato por problemas técnicos ligados ao processamento histoquímico da bula timpânica que impediram a leitura acurada da lâmina. No grupo t3: três ratos por problemas histotécnicos e um rato foi excluído porque apresentou valores aberrantes na orelha direita, incompatíveis com seu grupo. Como este estudo usa metodologia de amostra pareada, a contaminação de apenas uma orelha excluía os ratos de ambos os grupos. Ao final do experimento restaram 24 animais assim distribuídos: 8 ratos no grupo t1, oito no grupo t2 e 8 no grupo t3 para fins de análise dos resultados. Um banco de dados de todos os 24 animais encontra-se no Anexo II. Podem ser observadas fotomicrografias dos animais dos grupos controle (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11,12) e experimental (Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

5.1 Resultados qualitativos

5.1.1 Grupo controle

O epitélio ciliado da mucosa estava preservado nas bulas timpânicas do grupo controle (figura 6). Na maioria dos casos foi observado edema leve da mesma e ausência de sinais inflamatórios intensos. No entanto, em duas orelhas no grupo t1 e quatro no grupo t2 encontrou-se um edema subepitelial com características de reação inflamatória inespecífica. Nesses seis casos, a lâmina própria apresentava-se aumentada de volume em um grau moderado a intenso com infiltrado monocítico e dilatação capilar. Houve formação de pólipos epitelial inflamatório em dois casos, nos ratos 16 e 13, ambos do tempo t2 (figuras 7). Não foram observadas fibrose ou metaplasia epitelial.

A MT encontrava-se histologicamente com padrão normal na maioria dos casos ou com espessamento leve da camada intermediária (figura 8). Sinais de miringoesclerose em diversas fases, foram vistos em seis orelhas. Em um caso havia hialinização, com colágeno organizado em toda a extensão da MT e ausência de fibroblastos (figuras 9). A fase de calcificação da miringoesclerose também foi observada em uma pequena parte da porção anterior da MT esquerda do rato 1 (figura 10). Nesses seis casos houve espessamento moderado a intenso da MT. Não foi observada perfuração timpânica residual.

Foi encontrado exsudato em apenas um caso, o rato 8, classificado como reação inflamatória de intensidade moderada segundo os critérios histológicos semi-quantitativos do item 4.5. A fâscia foi encontrada em apenas quatro orelhas, duas em t1 e uma em cada um dos outros tempos. Na bula do rato 23 havia células monocíticas em pequena quantidade, com infiltrado no local onde a fâscia entrava em contato com a MT (figura 8). A fâscia estava em contato com a MT no rato 1 (figura 10). No rato 15 não havia células inflamatórias na bula timpânica esquerda, apenas fina camada de tecido fibroso circundava

a fásia (figura 11). No rato número 8, a fásia estava circundada por células inflamatórias, neutrófilos e monócitos (figura 12). Não foi encontrada fibrose no grupo controle

5.1.2 Grupo experimental

Os achados microscópicos grupo experimental foram de processo inflamatório da mucosa da bula timpânica, com características de reação subaguda e crônica. A maioria dos casos, 13 dos 24 estudados, apresentou reação inflamatória leve ou reação ausente.

O processo inflamatório do tipo subagudo foi observado em 11 orelhas com biopolímero da cana-de-açúcar. Todas as orelhas eram dos tempos t1 e t2, com cinco casos em t1 e seis casos em t2. Nesse processo havia grande quantidade de neutrófilos, além de, em algumas lâminas, verificar-se a presença de necrose celular ao redor da membrana de biopolímero. Também se observou macrófagos e infiltrado mononuclear com linfócitos e plasmócitos (figura 13). Não foi encontrada alteração que indicasse processo inflamatório exclusivamente agudo. A intensidade da reação subaguda foi descrita como leve em três casos, moderada em cinco casos e intensa em três casos, segundo os critérios semi-quantitativos adotados no item 4.5.

O processo inflamatório crônico foi observado em seis orelhas com biopolímero da cana-de-açúcar e caracterizou-se pela presença de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, fibroblastos e células gigantes. A presença de células gigantes caracterizou essa reação como tipo corpo estranho (figuras 14 e 15). Neste processo crônico observou-se uma fina camada de fibrose ao redor da membrana do biopolímero. Essa reação foi vista em todos os tempos estudados, com três casos em t1, um caso em t2 e dois casos em t3. A intensidade da reação crônica foi descrita como leve em todos os casos, segundo os critérios semi-quantitativos adotados no item 4.5.

Não foi encontrado exsudato, com reação inflamatória nula, em sete bulas timpânicas. Dessas, três não havia biopolímero. As quatro bulas com biopolímero visualizado, mas sem células inflamatórias ao redor do mesmo, foram as bulas 10 (t2), 17 (t3), 18 (t3) e 23 (t3). No rato 10, o biopolímero encontrava-se incorporado à MT (figura 16) e nos outros três ratos de t3, estava na bula timpânica (figura 17).

O epitélio colunar ciliado estava preservado na maioria das bulas timpânicas das orelhas do grupo experimental. As alterações da mucosa foram localizadas e não se estendiam a todo o espaço aéreo da bula timpânica, no entanto, o ponto em contato direto com o material apresentava maior reatividade. Espessamento subepitelial de grau moderado a intenso foi observado em oito orelhas. Nessas havia perda dos cílios e importante infiltrado polimorfonuclear ou mononuclear na lâmina própria com dilatação difusa dos capilares. Nas três orelhas sem biopolímero visível, a mucosa da bula timpânica encontrava-se com epitélio ciliado preservado e espaço subepitelial normal. Não houve metaplasia epitelial em nenhum dos casos estudados.

Em relação a fibrose, foi observado atividade fibroblástica, com deposição de colágeno. A maioria dos casos foi classificada histologicamente como fibrose leve. A fibrose causou um espessamento mais acentuado da mucosa em apenas duas orelhas, nos ratos 7 (t1) e 9 (t2). Nessas orelhas houve deposição de colágeno em grande quantidade, observado na coloração PSR (figura 18).

A membrana timpânica permaneceu normal ou com espessamento leve na maioria das orelhas. Em onze casos, apresentou-se com espessamento moderado a intenso. As alterações histológicas observadas foram: deposição de colágeno na camada intermediária com presença de fibroblastos, fibrose (muitas vezes contígua com a fibrose ao redor do biopolímero) e infiltrado polimorfonuclear entre as camadas da MT (figura 19). Essas alterações são compatíveis com miringoesclerose de grau variado. Muitas vezes alterações

diferentes estavam presentes na mesma MT. Na maioria dos casos a MT era normal, mas vista com espessamento importante na porção em contato com a reação inflamatória provocada pelo biopolímero (figura 20). Nos três casos em que não foi encontrado o biopolímero a MT apresentava-se delgada, mas com infiltrado inflamatório e deposição de colágeno na camada intermediária. Houve preservação da integridade anatômica da MT, com ausência de perfuração em todas as orelhas.

Durante o curso do experimento notou-se que a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar foi se degradando aos poucos. Houve infiltração celular da mesma com sinais focais de absorção na periferia da membrana em algumas orelhas em t1 e t2 (figura 21). A fragmentação da membrana com absorção quase total foi observada nas orelhas 11 e 12, ambas do tempo t2, na presença de reação inflamatória intensa (figura 22). Em três casos do tempo t3, ratos 17, 18 e 23, a membrana do biopolímero foi encapsulada, rodeada de uma fina camada de fibrose com ausência de celularidade (figura 17). Nos ratos 20, 21 e 22, do tempo t3, a membrana do biopolímero não foi encontrada em nenhum dos cortes seriados da orelha direita.

Os resultados qualitativos foram agrupados em tabelas, para fins de análise estatística. Na tabela 1 comparam-se os dados da intensidade do exsudato da bula com biopolímero e fásia, com diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 1 - Avaliação da intensidade da atividade inflamatória segundo o tipo de material.

Atividade inflamatória	Grupos		Total	Valor de <i>p</i>
	Fásia	Biopolímero		
	n	n		
Nula	23	7	30	
Leve	-	9	9	
Moderada	1	5	6	$p^{(1)} < 0,001^*$
Intensa	-	3	3	
Total	24	24	48	

(*): Diferença significativa a 5,0%. (1): Através do teste Exato de Fisher.

Na tabela 2 são apresentados os resultados do grau de absorção dos materiais com resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Avaliação do grau de absorção segundo o tipo de material.

Classificação do grau de absorção	Grupos		Total n	Valor de p
	Fáscia	Biopolímero		
	n	n		
Nula ou leve	4	15	19	$p^{(1)} < 0,001^*$
Moderada	-	4	4	
Intensa	-	2	2	
Completa	20	3	23	
Total	24	24	48	

(*): Diferença significativa a 5,0%. (1): Através do teste Exato de Fisher.

5.2. Resultados quantitativos

A média geral da espessura da mucosa foi 64,0 μ m e 42,3 μ m na bula timpânica com biopolímero e com fáscia, respectivamente. O valor máximo encontrado foi 293,6 μ m e o mínimo foi 8,2 μ m com biopolímero. No grupo com a fáscia o valor máximo foi 148,8 μ m e o mínimo 5,03 μ m (Anexo II). Nas orelhas do lado direito sem biopolímero visível as médias foram: 28,6 μ m, 15 μ m e 11,2 μ m. Na tabela 3 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa da espessura da mucosa entre as orelhas com biopolímero ou fáscia. Observa-se que nas orelhas com biopolímero houve diferença significativa entre os tempos estudados.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e mediana da medida da espessura da mucosa da bula timpânica, em micrômetros, por tempo de avaliação em cada material.

Tempo de avaliação	Grupos		Valor de <i>p</i>
	Fáscia	Biopolímero	
	Média ± DP ⁽¹⁾ (Mediana)	Média ± DP ⁽¹⁾ (Mediana)	
t1	41,0 ± 41,4 (21,6)	77,5 ± 62,9 (69,9) ^(A)	<i>p</i> ⁽²⁾ = 0,109
t2	66,0 ± 48,3 (56,3)	96,8 ± 109,4 (34,8) ^(A)	<i>p</i> ⁽²⁾ = 0,844
t3	20,4 ± 10,3 (21,4)	18,4 ± 10,0 (16,2) ^(B)	<i>p</i> ⁽²⁾ = 0,461
Valor de <i>p</i>	<i>p</i> ⁽³⁾ = 0,061	<i>p</i> ⁽³⁾ = 0,022*	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): DP = Desvio padrão; (2): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados. (3): Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs.: Se nenhuma letra entre parêntesis é igual comprova-se diferença significativa entre os períodos correspondentes por orelha através das comparações pareadas de Kruskal-Wallis.

Os resultados das medidas da espessura da mucosa da bula timpânica foram agrupados em categorias: normal, leve, moderado e intenso, segundo critérios estabelecidos no item 4.5. Na tabela 4 não se comprova diferença significativa entre os diversos graus de espessura da mucosa nas orelhas com biopolímero ou fáscia ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Avaliação do grau de espessura da mucosa, em micrômetros, em cada material.

Grupos	Grau de espessura da mucosa				Total	Valor de <i>p</i>
	Normal	Leve	Moderada	Intensa		
	n	n	n	n	n	
Fáscia	4	14	3	3	24	<i>p</i> ⁽¹⁾ = 0,929
Biopolímero	4	12	3	5	24	

(1): Através do teste McNemar Bower.

A média geral da espessura da MT foi de 27,3 μ m e 20,1 μ m, no grupo com biopolímero e fáscia, respectivamente. Os valores mínimos e máximos do grupo controle foram 7,43 μ m e 82,46 μ m; do grupo experimental foram 4,05 μ m e 104 μ m (Anexo II).

Nas três orelhas direitas em que não foi encontrada a membrana de biopolímero a espessura da MT foi 40,4 μ m, 29,8 μ m e 10,4 μ m. Na tabela 5 apresenta os resultados da espessura da MT por tempo de avaliação e para cada material estudado. Nesta tabela

observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados estudados ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Média, desvio padrão e mediana da espessura da MT, em micrômetros, por tempo de avaliação em cada material.

Tempo de avaliação	Grupos		Valor de p
	Fáscia Média \pm DP ⁽¹⁾ (Mediana)	Biopolímero Média \pm DP ⁽¹⁾ (Mediana)	
t1	15,6 \pm 7,5 (15,2)	26,8 \pm 21,1 (16,7)	$p^{(2)} = 0,148$
t2	24,9 \pm 23,7 (17,7)	39,1 \pm 33,8 (26,0)	$p^{(2)} = 0,195$
t3	20,2 \pm 8,8 (18,0)	15,8 \pm 12,8 (10,9)	$p^{(2)} = 0,547$
Valor de p	$p^{(3)} = 0,608$	$p^{(3)} = 0,076$	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): DP = Desvio padrão; (2): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados.(3): Através do teste de Kruskal-Wallis.

Conforme estabelecido no item 4.5, os valores da espessura da MT foram agrupados em normal, leve, moderado e intenso. A tabela 6 expõe esses resultados. Não há diferença significativa entre as orelhas em relação à classificação da espessura da membrana timpânica ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Avaliação do grau da espessura da MT, em micrômetros, em cada material estudado.

Grupos	Grau da espessura da MT				Total n	Valor de p
	Normal n	Leve n	Moderada n	Intensa n		
Fáscia	10	8	4	2	24	$p^{(1)} = 0,291$
Biopolímero	9	4	5	6	24	

(1): Através do teste McNemar Bower.

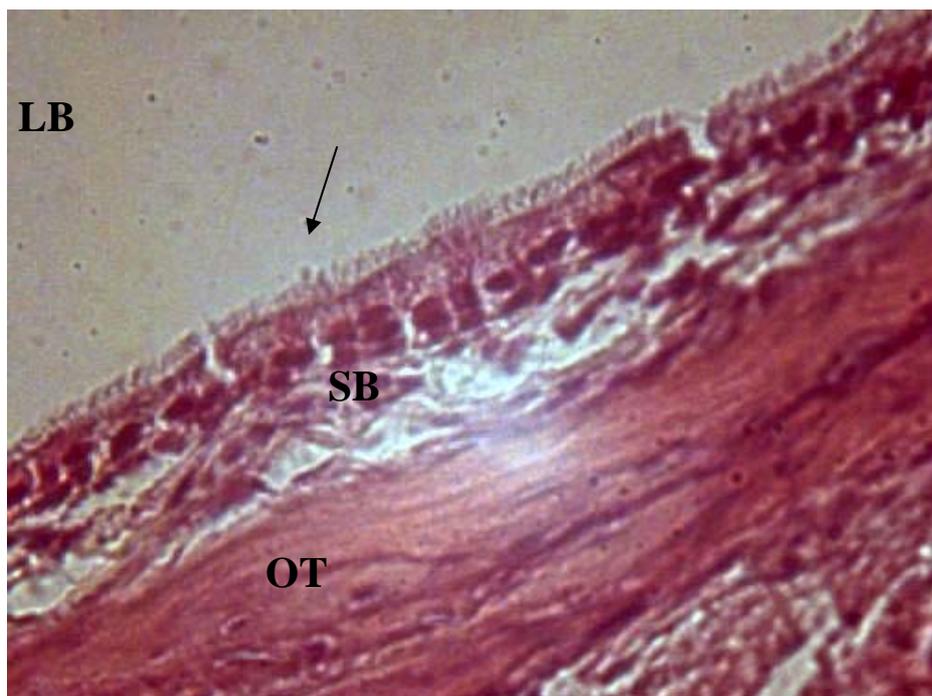


Figura 4 - Fotomicrografia da superfície mucosa da bula timpânica da orelha esquerda. Epitélio ciliado normal. LB =Luz da bula; SB= submucosa; seta fina= epitélio ciliado; OT=osso temporal. HE(aumento 400x).

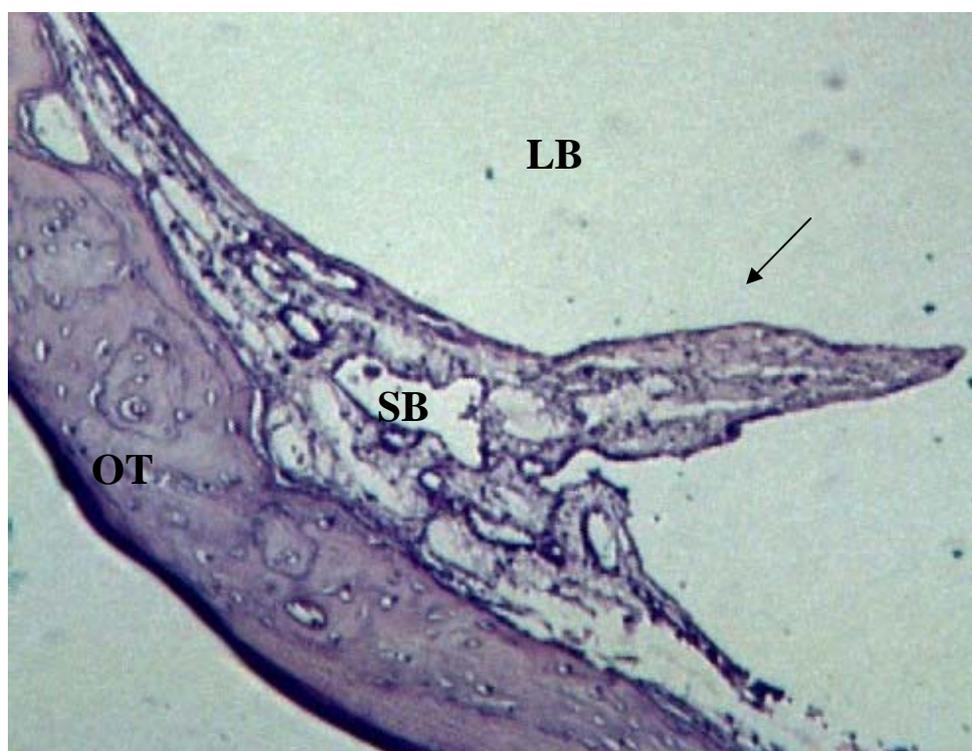


Figura 5 – Fotomicrografia de pólipio inflamatório observado na mucosa da orelha esquerda do rato 13. Observar infiltrado inflamatório na submucosa e dilatação vascular provocando espessamento moderado. LB= Luz da bula; SB= submucosa; OT=Osso temporal; seta fina= pólipio. HE (aumento 100x).

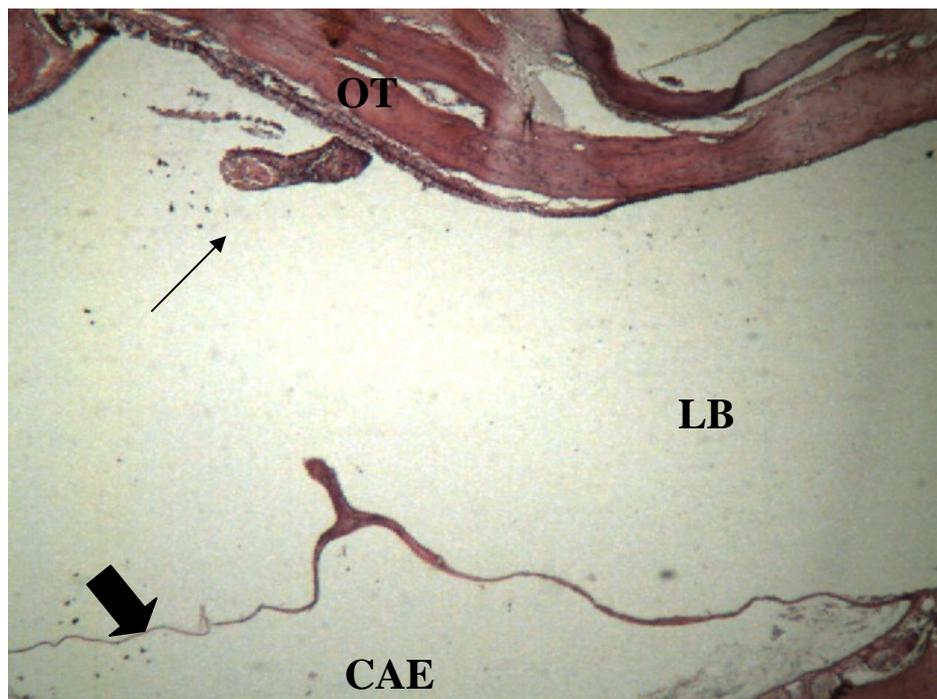


Figura 6 - Fotomicrografia da membrana timpânica normal da orelha esquerda do rato 23. Observar fâscia aderida ao promontório e a mucosa com espessamento leve. LB =Luz da bula; CAE= canal auditivo externo; seta grossa= membrana timpânica; seta fina= fâscia; OT=osso temporal. HE(aumento 40x).

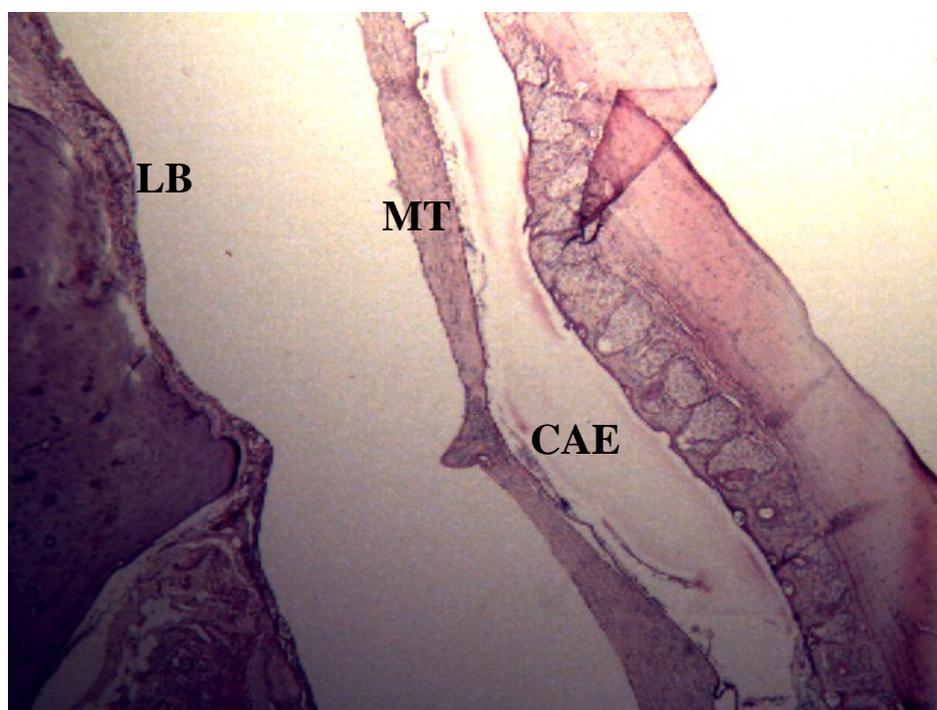


Figura 7 – Fotomicrografia evidenciando miringoesclerose com fibrose e espessamento intenso MT da orelha esquerda do rato 16. LB= Luz da bula; MT= Membrana timpânica; CAE= Canal auditivo externo. HE (aumento 40x).

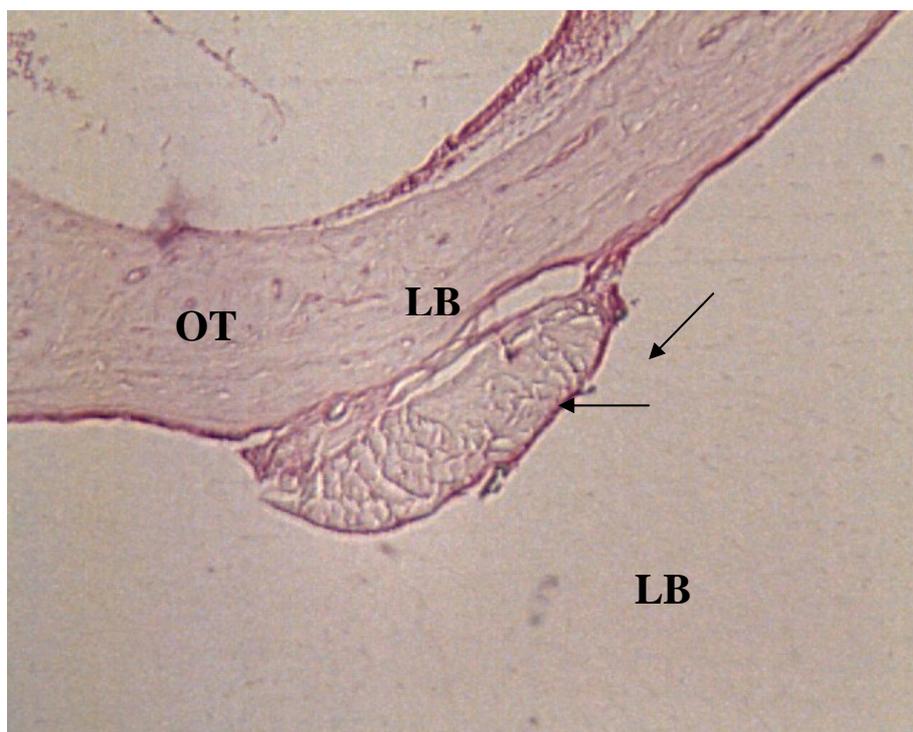


Figura 8 - Fotomicrografia da fásia circundada por fina camada fibrosa na orelha esquerda do rato 15, aderida à mucosa da bula timpânica. LB= luz da bula; OT = Osso temporal; seta fina= fásia. HE(aumento 100x).

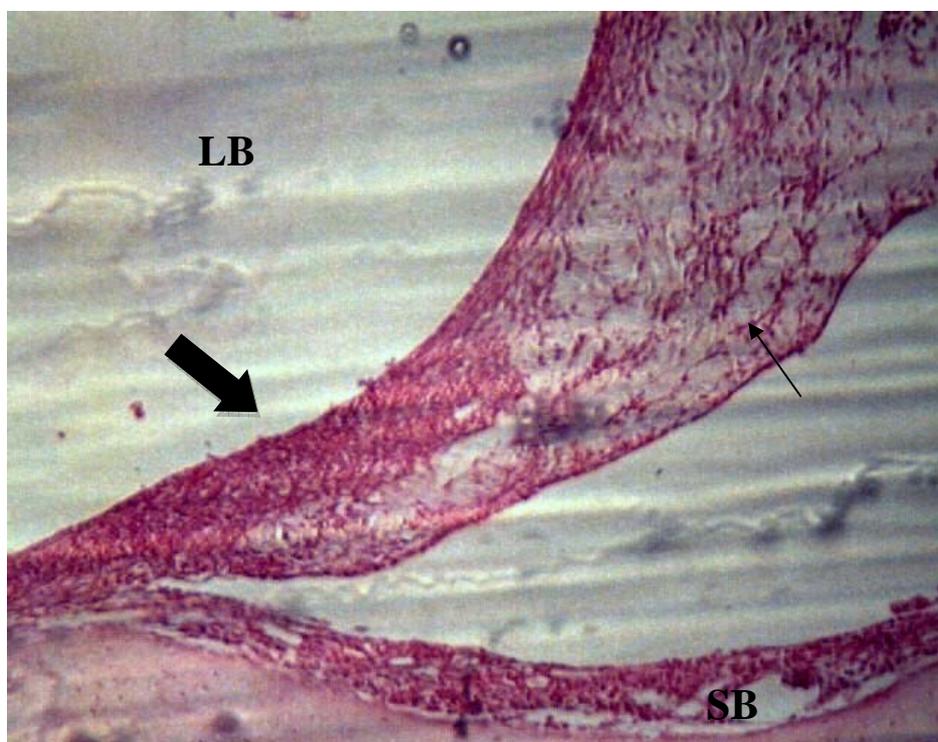


Figura 9 - Fotomicrografia da fásia invadida por células inflamatórias. Notar o exsudato intenso na bula e o espessamento da mucosa em contato com fásia. Orelha esquerda do rato 8. LB= luz da bula; SB = Submucosa; seta fina= fásia; seta larga=exsudato. HE(aumento 100x).

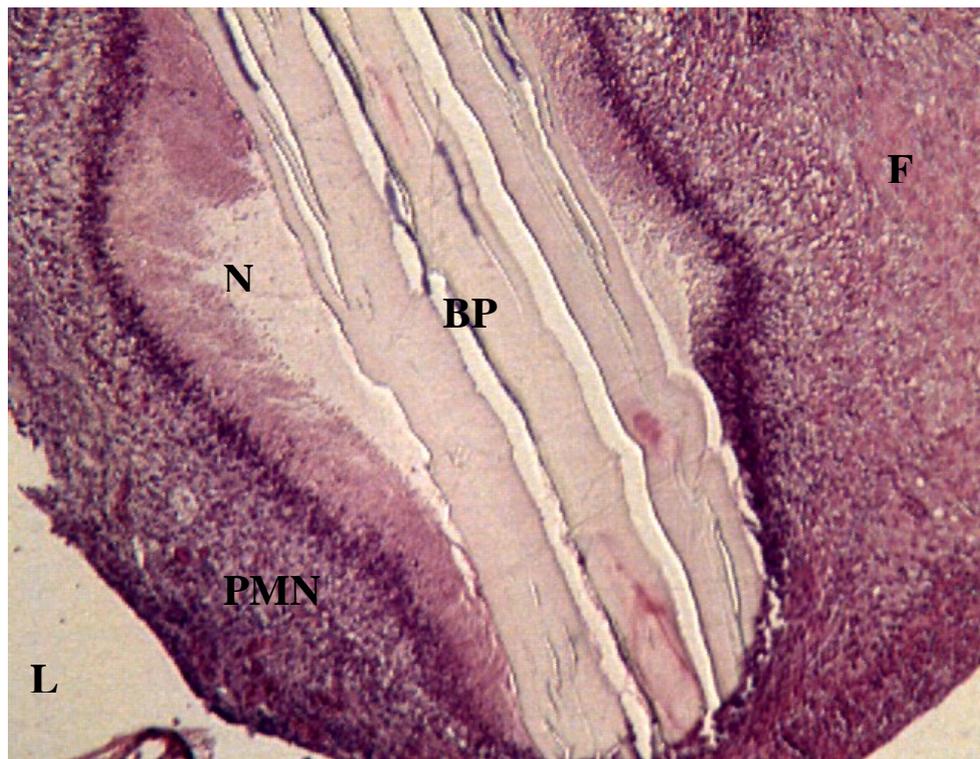


Figura 10 - Fotomicrografia do exsudato subagudo moderado na orelha direita do rato 2. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar. LB= luz da bula. N= necrose celular. PMN= polimorfonucleares. F=fibrose com deposição de colágeno. HE(aumento de 100x)

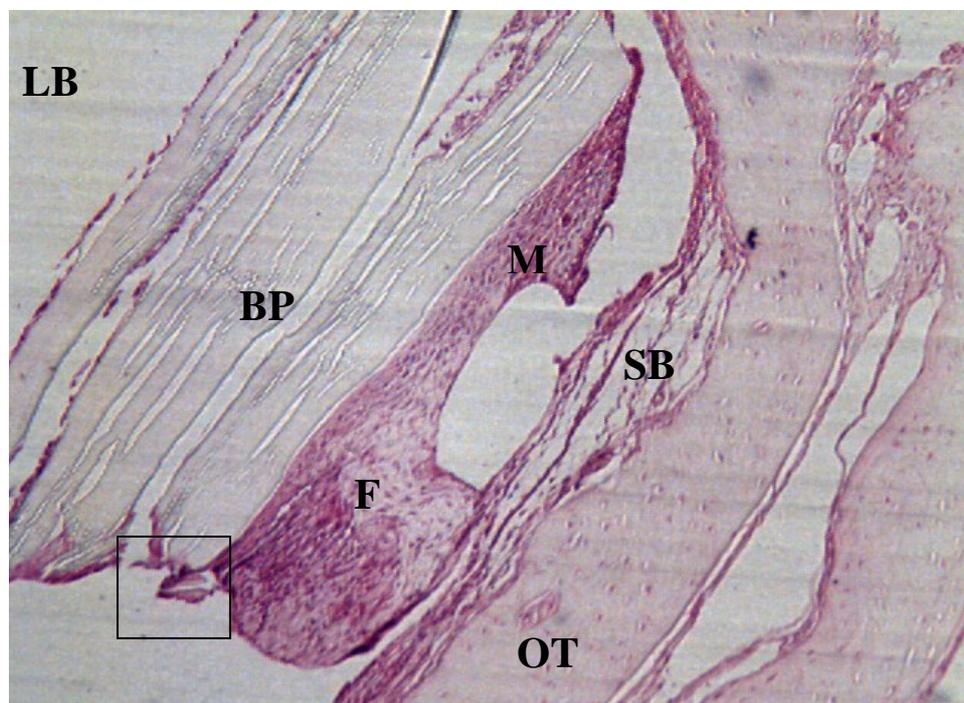


Figura 11 - Fotomicrografia da reação inflamatória crônica na orelha direita do rato 5. Observa-se infiltrado monocítico leve circundado o biopolímero, com trave de fibrose ligando o mesmo a mucosa da bula timpânica. Essa se apresenta espessada com edema e infiltração celular. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar. LB= luz da bula. M=infiltrado monocítico. F= fibrose. SB= submucosa. OT= osso temporal. Retângulo= detalhe visto na figura 15. HE (aumento de 100x).

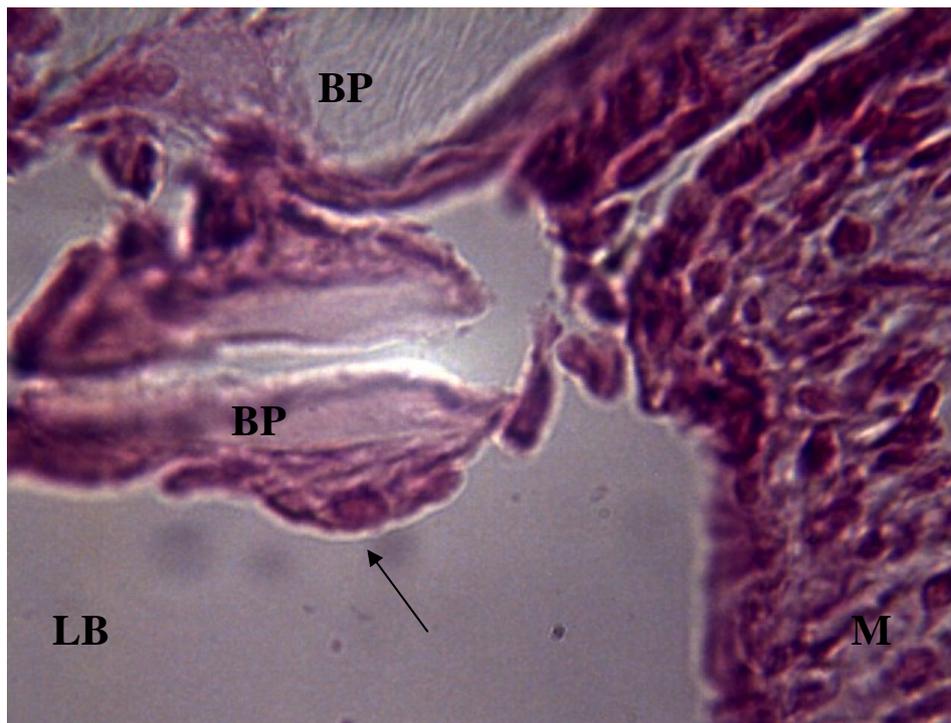


Figura 12 - Detalhe da figura 14 evidenciando células gigantes englobando fragmento parte do biopolímero da cana-de-açúcar. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar. LB= luz da bula. M=infiltrado monocítico. Seta fina=célula gigante. HE(aumento de 1000x).

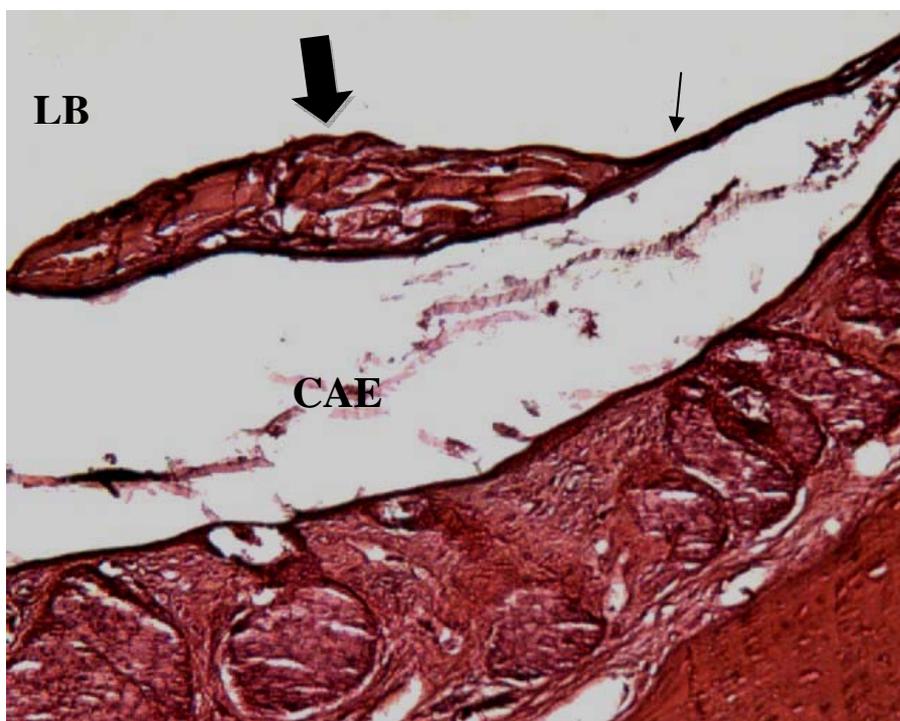


Figura 13 - Fotomicrografia do biopolímero incorporado á membrana timpânica da orelha direita do rato 10. LB= luz da bula ; CAE= canal auditivo externo; seta fina= membrana timpânica; seta larga= biopolímero da cana-de-açúcar. HE(aumento de 100x).

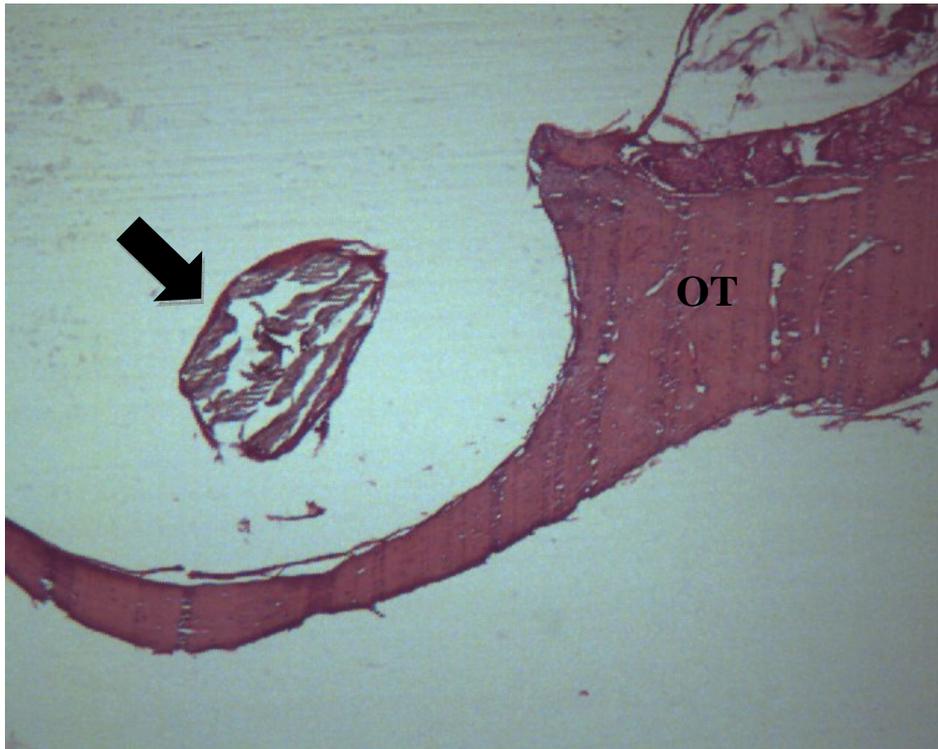


Figura 14 - Fotomicrografia do biopolímero na bula timpânica da orelha direita do rato 17. Notar ausência de reação inflamatória. OT= osso temporal; seta larga= biopolímero da cana-de-açúcar. HE(aumento de 40x).

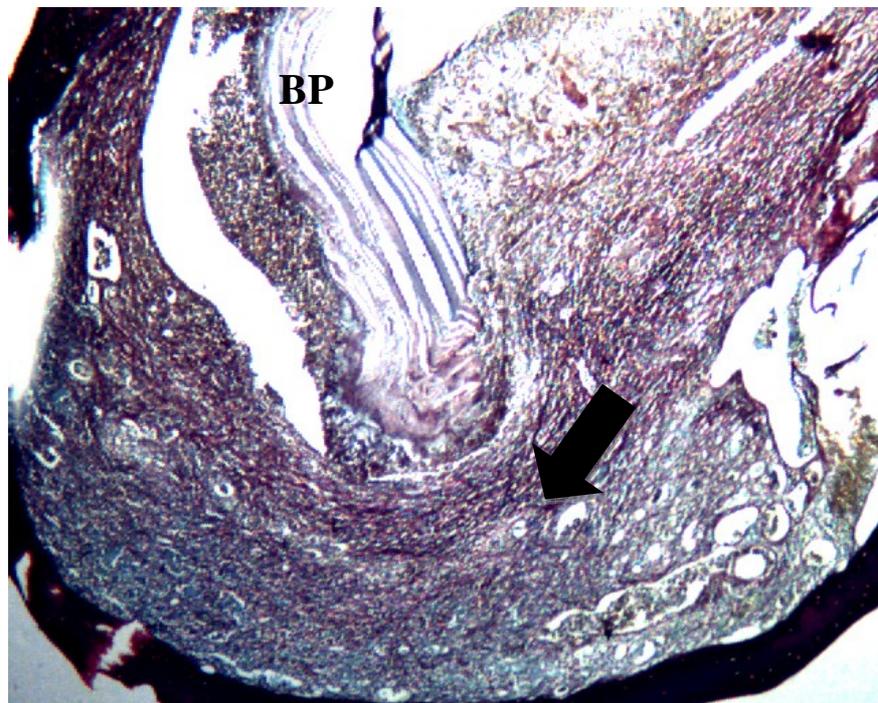


Figura 15 - Fotomicrografia da bula timpânica direita do rato 9. Observar espessamento intenso da mucosa. A coloração do PSR evidencia o colágeno nas cores vermelho e verde. BP=Biopolímero; seta larga= colágeno. PSR (aumento de 40x).



Figura 16 - Fotomicrografia evidenciando miringoesclerose com infiltrado inflamatório mononuclear na membrana timpânica da orelha direita do rato 7 causando espessamento intenso da mesma. MT= Membrana timpânica. HE (aumento 400x).

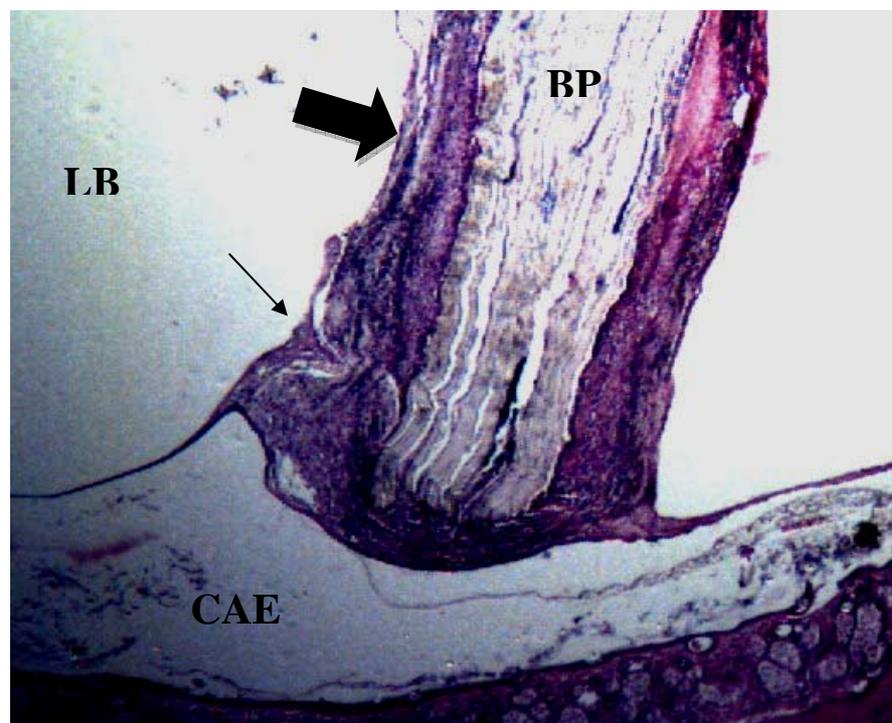


Figura 17 - Fotomicrografia da membrana timpânica espessada na sua porção em contato com o biopolímero. Exsudato moderado apenas ao redor do biopolímero. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar; LB= Luz da bula; CAE= canal auditivo externo; seta grossa= reação inflamatória; seta fina=martelo. HE(aumento 40x).

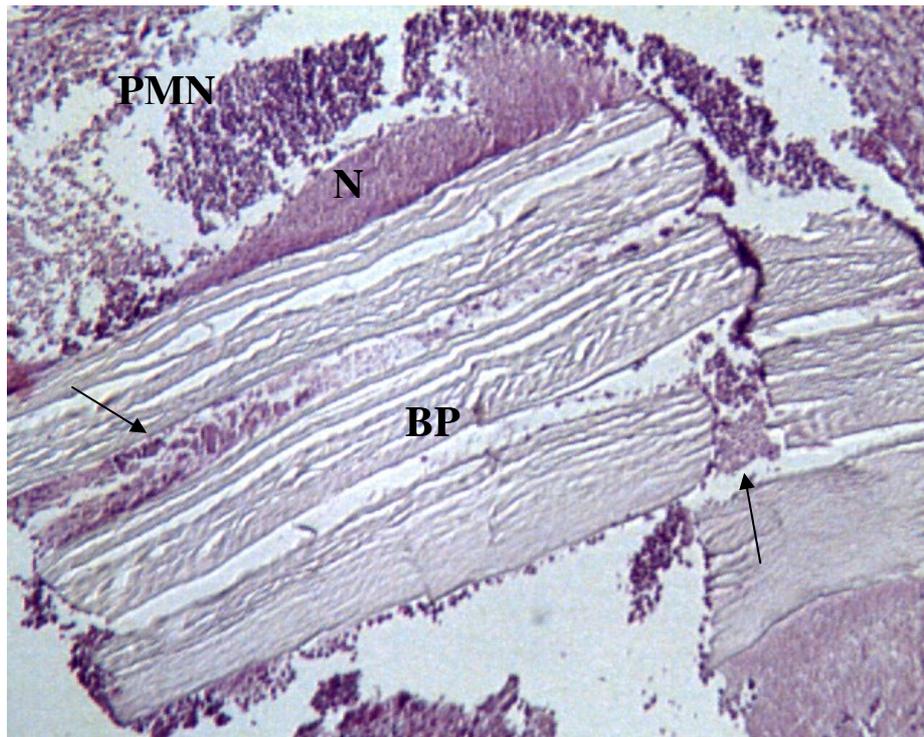


Figura 18 – Fotomicrografia da infiltração celular entre as fibras do biopolímero observada na bula timpânica direita do rato 7. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar; N= necrose celular; PMN= polimorfonucleares; seta fina= infiltração celular. HE (aumento de 100x)

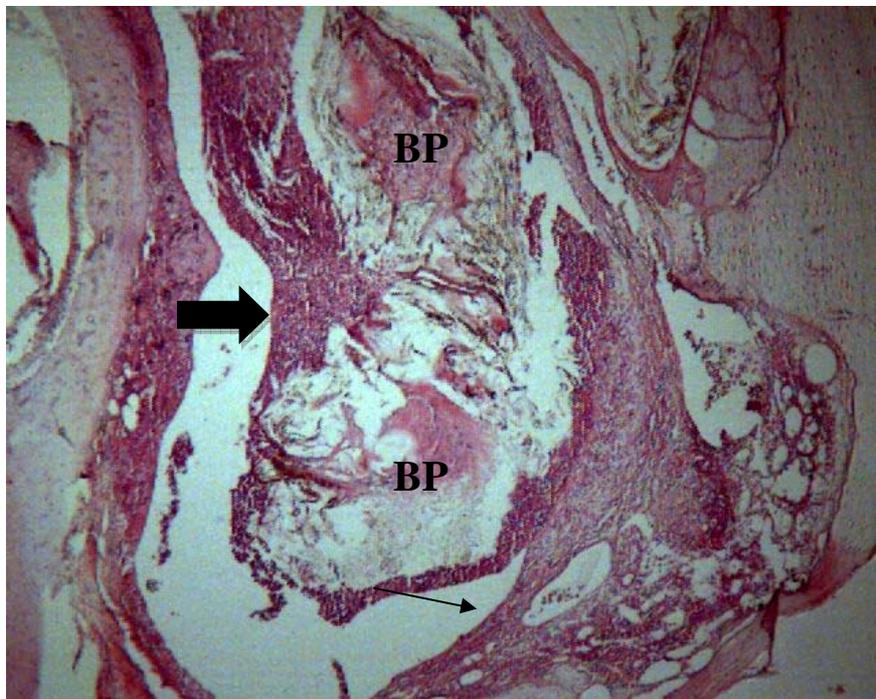


Figura 19 – Fotomicrografia da desorganização estrutural do biopolímero e sua absorção parcial, observadas na bula timpânica direita do rato 12. BP= Biopolímero da cana-de-açúcar; seta larga= exsudato inflamatório; seta fina= mucosa com espessamento intenso. HE (aumento de 40x)

6.1 Importância do tema

O enxerto é essencial na cicatrização da perfuração timpânica. A cicatrização da MT é única, pois a epitelização ocorre antes do avanço do tecido fibroso. Após o estímulo do reavivamento das bordas da perfuração, a migração epitelial inicia-se centripetamente.^{4,61} A fâscia é o enxerto mais comumente usado, apesar da dificuldade em utilizá-la em reoperações e extensas áreas cruentas.²¹

Materiais de suporte também são utilizados na timpanoplastia, tanto na técnica medial quanto lateral. O material pode ficar dentro da cavidade timpânica, ajudando no posicionamento do enxerto ou pode ser colocado no canal auditivo externo, neste caso servindo como curativo compressivo. Os materiais disponíveis são esponjas hemostáticas como o Gelfoam[®], o Gelfim[®], o Nasopore[®] e o Instat[®], e fitas de silicone como o Silastic[®].^{40,41}

Se um novo material de baixo custo, biocompatível e principalmente com boa resposta inflamatória na orelha média fosse apresentado, significaria um passo importante na cirurgia otológica.

6.2 Materiais

A cana-de-açúcar é considerada um dos principais tipos de biomassa energética, e base para todo o agronegócio sucroalcooleiro.⁶² A história do Estado de Pernambuco está estritamente ligada à cultura canavieira, desde o início do ciclo da cana-de-açúcar no período colonial até os dias de hoje.⁶² No seu processo de industrialização obtém-se

como produtos o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), o vinhoto e o bagaço.⁶³ A possibilidade de síntese de um novo produto da cana-de-açúcar, agora para ser empregado na Medicina, constitui-se um novo horizonte nas pesquisas médico-científicas.

Nos primeiros experimentos em que o biopolímero da cana-de-açúcar foi utilizado, era empregado *in natura*, ainda com açúcares residuais. Posteriormente foi desenvolvido um processo de tratamento para redução dos açúcares, resultando em um produto livre de impurezas, constituído de açúcares e ácido glicurônico polimerizados.

A apresentação do biopolímero em forma de membranas vem sendo utilizada em diferentes projetos de pesquisa nas áreas de urologia, cirurgia vascular, neurologia, otorrinolaringologia e cirurgia abdominal no NCE da UFPE.^{56,57,58,59,64} É relevante analisar um material que é desenvolvido em uma instituição regional, a partir de um produto agrícola de baixo custo e integrado na realidade socioeconômica local.

A eficácia dos novos materiais é inicialmente experimentada em animais de laboratório. Para esses estudos buscam-se animais em que os órgãos envolvidos assemelhem-se aos dos seres humanos. A maior parte da pesquisa na área de educação médica utiliza animais de pequeno porte, que correspondem a 90% do total das espécies utilizadas. No caso da cirurgia otológica são utilizados chinchilas, cobaias, gerbilos e ratos.^{42,59,65,66}

Para a escolha do rato como animal de experimentação foi considerado a facilidade de aquisição, a possibilidade de empregar um número adequado de espécimes, a resistência às infecções generalizadas, o baixo custo de obtenção, a homogeneidade genética, e a similaridade de exposição a agravos. O ciclo de vida dos ratos Wistar é de aproximadamente 36 meses, o que permite estudos em menor período de tempo.

A *Chinchila laniger* foi utilizada em pesquisa com o biopolímero da cana-de-açúcar, na área da otorrinolaringologia.⁵⁹ É um animal que precisa de cuidados especiais de nutrição e ambiente, além de elevados custos de obtenção, quando comparado ao rato. Para o estudo das alterações da MT, recomenda-se este roedor, pois a área de extensão da sua membrana é próxima à dos humanos. Contudo, o canal auditivo não permite visualizar toda a MT, sendo necessário fraturar uma proeminência óssea anterior para este fim.^{59,67}

Um estudo comparou o uso da cobaia (*Cavia porcellus* – linhagem Inglesa) com o rato (*Rattus norvegicus* – linhagem Wistar) e foi observado que a estrutura anatômica da orelha média desse último é mais semelhante à orelha dos seres humanos que a das cobaias.⁶⁸ O canal auditivo do rato é mais amplo e permite visualização de toda a MT e cadeia ossicular. Isso facilitou a inoculação do material. Contudo, sua bula timpânica é mais frágil quando comparada à bula da cobaia.⁶⁸ Talvez por este motivo durante o experimento houve perda de sete bulas por problemas técnicos (manipulação e histoquímica).

A mucosa da bula timpânica do rato é semelhante histologicamente à mucosa da orelha média humana. Apesar de ser uma cavidade única, a bula apresenta algumas células superiores agrupadas no recesso epitimpânico onde se encontram a cabeça do martelo e o corpo da bigorna. A distribuição topográfica do epitélio ciliado é bem definida, concentrando-se no terço inferior das paredes laterais, no assoalho e na porção anterior próximo a abertura da tuba auditiva. Epitélio com células planas, associado à função ventilatória é encontrado no teto da bula timpânica. Tal arquitetura facilita a inferência da reação inflamatória da mucosa da bula do rato em relação à mucosa humana.^{69,70}

O rato apresenta maior facilidade para desenvolver otite espontânea na orelha média. Há uma abertura para o meio externo na MT superiormente, entre a bigorna e o martelo. Essa abertura, segundo Albuquerque et al, poderia ser a causa da ocorrência de otite média nesses animais.⁶⁸ A ocorrência de otite espontânea em ratos Wistar apresenta uma incidência de 20% em gaiolas convencionais coletivas e 5% em gaiolas individuais.⁷¹ Sabe-se que fatores como manipulação e condições do ambiente devem ser estritamente controlados a fim de minimizar perdas de amostras. A taxa de otite espontânea nos animais antes do início do experimento foi 19,5%, ou seja, nove de 46 animais. Após o experimento, em gaiolas individuais, observou-se otite média aguda de provável causa bacteriana em 11,1%, ou seja, quatro dos 36 da amostra. Supõe-se que a frequência da otite foi superior á literatura por fatores externos ou por alguma contaminação durante o procedimento.

6.3 Métodos

Com o objetivo de estudar o material em contato com a orelha média optou-se por um método seguro, sem danos teciduais excessivos ao animal, de fácil execução e com tempo cirúrgico mínimo. O método empregado foi a perfuração da MT com estilete e introdução da substância dentro da cavidade da orelha média. As perfurações traumáticas, na ausência de infecção, cicatrizam-se em torno de 12 dias.^{61,72} Não houve nenhuma MT com perfuração residual decorrente do método utilizado.

No entanto, dois ratos foram excluídos por problemas metodológicos. No momento em que foi implantado o material através da perfuração, um pêlo do canal auditivo também foi inoculado na orelha média. Em outro rato, queratina foi encontrada na mucosa, que provavelmente também foi implantada durante o experimento. Alguns autores advogam o acesso a bula timpânica por trefinação da mesma na região retroauricular, a fim de evitar tais infortúnios.⁴⁰ A vantagem desse método é a ausência de manipulação da MT. As desvantagens são: o aumento do tempo cirúrgico, o risco de lesão de vasos com

sangramento e a possibilidade de dano ao perióstio da bula e sob descuido, à própria mucosa. Na inoculação de substâncias na forma de suspensão, utiliza-se uma agulha para perfuração transtimpânica.^{6,60} Não há como implantar um material na luz da bula timpânica na ausência completa de lesão tecidual.

A retirada da fásia abdominal seguiu metodologia já padronizada no local onde foi realizado o estudo, já descrita no item 4.3.3. Não houve casos de infecção de ferida operatória ou deiscência. O procedimento otológico e o abdominal eram realizados no mesmo tempo cirúrgico, evitando, assim sucessivas manipulações do animal. Dois ratos nos primeiros experimentos apresentaram hérnia abdominal no pós-operatório tardio, mas foram excluídos do estudo por motivos otológicos.

6.4 Resultados

6.4.1. Resultados qualitativos

A inflamação é de suma importância para a reparação da lesão tecidual. O processo básico inflamatório sofre influências de muitas variáveis, incluindo a natureza e intensidade da lesão, o local e tecido afetados e a responsividade do hospedeiro.¹

Em geral, os resultados da inflamação aguda podem ser: a) resolução completa com restauração do tecido ao seu estado normal; b) abscesso; c) cura por fibrose com perda parcial ou total da função; d) progressão da resposta tecidual para a inflamação crônica.¹ A inflamação, por sua vez, pode ser crônica desde o início da lesão, apresentando-se de forma insidiosa, como uma resposta de baixo grau e latente.¹

No grupo controle, foi observado estrutura normal da mucosa da bula timpânica e da MT. Em alguns poucos casos, houve edema subepitelial com pólipos na mucosa e miringoesclerose na MT.

A fásia estava presente em quatro amostras: 1 (t1), 8 (t1), 15 (t2) e 23 (t3). A bula esquerda do rato 8 foi a única com exsudato. Possivelmente, o exsudato encontrado foi secundário à condição imunológica do hospedeiro. A fásia, em um local que não lhe é próprio, pode ter desencadeado reação inflamatória com infiltrado de polimorfonucleares entre suas fibras. Contudo, nas outras três orelhas, a fásia não provocou exsudato, apenas uma fina camada de fibrose circundava-a. Também há a possibilidade de contaminação da fásia, durante sua manipulação, na cirurgia do rato 8.

A membrana de biopolímero da cana-de-açúcar induziu uma resposta inflamatória subaguda em 52,3% dos casos, ou seja, 11 das 21 bulas com biopolímero visualizado. O exsudato subagudo foi considerado moderado a intenso, em oito casos. Como substituto vascular, o biopolímero induziu reação inflamatória com presença de neutrófilos e linfócitos.⁵⁷ No tecido subaponeurótico, intensa reação inflamatória subaguda com presença de polimorfonucleares e células gigantes ao redor do biopolímero, foi encontrada; o que condiz com nosso estudo.⁵⁶

A membrana de biopolímero da cana-de-açúcar induziu uma resposta inflamatória crônica tipo corpo estranho. Houve exsudato com presença de linfócitos, macrófagos e células gigantes em 28,5% dos casos, ou seja, em seis bulas timpânicas das 21 em que foi visualizado o biopolímero. Já a fásia, como é um material autólogo, não provocou reação tipo corpo estranho.

Um estudo realizado no NCE da UFPE apresentou a reação celular do biopolímero em contato com o tecido cerebral e com a aracnóide em ratos.⁵⁸ Ele encontrou macrófagos, células gigantes e granuloma em 50% dos casos. No presente trabalho, na bula timpânica, não foi encontrado granuloma e a celularidade dos macrófagos e monócitos foi proporcionalmente menor que o encontrado neste trabalho, para o tecido neural. Talvez o tecido neural seja imunogenicamente mais ativo que a

mucosa da bula timpânica. Na superfície vascular, não foi encontrado macrófagos com uso do biopolímero; e segundo o autor, isso confirma o baixo teor antigênico do material nas artérias de cães.⁵⁷ Logo, a presença de reação tipo corpo estranho depende do tecido no qual o biopolímero estiver em contato.

Ao avaliar o comportamento do biopolímero no decorrer do tempo do experimento, observa-se que com 4 semanas já havia reação inflamatória crônica tipo corpo estranho em três casos. A reação crônica correspondeu, aproximadamente, a 30% da amostra e esteve presente em todos os tempos do experimento, e não apenas em t3. Não há como afirmar se tal reação foi resultado de um processo agudo prévio, curto, ou se os ratos apresentaram uma resposta de baixo grau e insidiosa desde o início do experimento.

O exsudato inflamatório subagudo observado nos tempos iniciais não é encontrado no tempo tardio. Encontra-se em t3, duas bulas com exsudato crônico considerado leve e três bulas com biopolímero encapsulado e sem nenhuma reação inflamatória. Através desses dados conclui-se que a quantidade de orelhas com exsudato inflamatório na presença no biopolímero, diminui com o tempo.

A maioria dos estudos feitos até então, com biopolímero, apresentam resultados em um único tempo. Ao contrário, o presente estudo, desenhou uma linha de tempo (t1-4 semanas, t2-8 semanas e t3-12 semanas) a fim de observar melhor a evolução da reação inflamatória. Para fins de comparação, um trabalho destaca-se com esta metodologia. Lucena⁵⁶ ao comparar o biopolímero da cana-de-açúcar com o polipropileno, dividiu os animais em dois grupos de 30 e 90 dias. Como resultado, o autor encontrou, através da análise histológica qualitativa, reação inflamatória intensa com 30 dias e reação inflamatória mais leve com 90 dias. Tais dados são semelhantes ao

presente estudo, onde a partir de 12 semanas (90 dias) foi observada a diminuição da atividade inflamatória.

A fibrose encontrada na bula timpânica foi leve. O trabalho desenvolvido com a membrana do biopolímero como *sling* pubovaginal evidenciou fibrose no tempo de 90 dias.⁵⁶ Contudo, não houve diferença estatística entre a deposição de colágeno entre a o biopolímero e a tela de polipropileno. No tecido cerebral houve maior frequência de calcificação e ossificação que mesmo de fibrose, no que o autor denominou de reação de contenção do biopolímero pelo tecido.⁵⁸ Encontrou-se fibrose com deposição de colágeno no seu uso nas arterioplastias femorais, o que, segundo o autor era esperado em um material para remendo vascular.⁵⁷

Um material para enxerto ou para suporte na cirurgia otológica não deve causar fibrose. O biopolímero aparentemente causou menos fibrose que o relatado nos materiais de suporte tipo Gelfoam[®].³⁹⁻⁴² O Silastic[®] é geralmente utilizado para evitar aderência da MT em cirurgias de timpanomastoidectomia. A longo prazo, demonstrou-se em estudos de ossos temporais de cadáveres, que não há aderências ou fibrose na orelha média após uso do Silastic[®].⁷³ As fitas de Silastic[®] são pouco moldáveis e não-esponjosas. Novas formas de apresentação do silicone, como por exemplo, em forma de membrana, confeccionada nas dimensões da cavidade mastóide, estão sendo testadas.²⁷ O material de suporte ideal é moldável á cavidade timpânica e necessariamente não causa nenhum tipo de reação fibroblástica que resulte em aderências e limite a ventilação da orelha média.

Esses achados de escassa fibrose, aliados a maleabilidade inerente do biopolímero, parecem credenciá-lo como material para suporte na timpanoplastia. Isso, contudo, exige estudos especificamente dirigidos para esse fim.

Na tabela 1 há diferença estatisticamente significativa entre o exsudato, seja subagudo ou crônico, produzido pela bula em contato com biopolímero e o exsudato produzido com a fásia. O exsudato encontrado na luz da bula do grupo experimental das orelhas direitas provavelmente deve-se ao fato da membrana de biopolímero da cana-de-açúcar, apesar de ser um material biocompatível, não é próprio dos seres vivos e provoca uma reação inflamatória importante.

A quantidade de bulas com a fásia visível foi pequena, pois a mesma foi absorvida precocemente. Deste modo, só houve observação de quatro fásia e um exsudato. A fim de elucidar se houve ou não mais casos de exsudato no grupo controle, dever-se-ia sacrificar ratos em intervalos mais curtos. Entretanto, tal situação implicaria em questões éticas, pois o número de animais utilizados seria maior.

Outros trabalhos que compararam o biopolímero com e-PTFE e polipropileno também evidenciaram que este provocava reação inflamatória mais intensa que os materiais de controle, mas nenhum apresentou diferença estatística.^{56,57,58} Isso provavelmente ocorreu porque o controle, em todos os casos levantados, foi um material sintético. O material sintético, apesar de ser amplamente difundido na prática médica, provoca reação inflamatória, mesmo que seja em intensidade leve. Neste estudo, o material comparado ao biopolímero foi a fásia autóloga, que praticamente não provocou reação inflamatória, por isso a diferença estatística com o biopolímero.

Silva et al⁵⁹ realizaram pesquisa com o biopolímero como enxerto timpânico lateral sem relato de exsudato. Na sua metodologia a membrana do biopolímero era fixada com Gelfoam[®] na área cruenta das bordas da perfuração, na face epidérmica da MT. Talvez esta localização, sem contato direto com a mucosa da orelha média tenha sido determinante para seu resultado.

Na tabela 2 evidencia-se o grau de absorção de cada material na bula timpânica. Desta tabela destaca-se que a fásia foi absorvida muito mais facilmente que o biopolímero, sendo esta diferença é estatisticamente significativa.

A fásia abdominal autóloga foi escolhida por se tratar de uma membrana de fácil acesso nesses animais, além de representar bem a fásia temporal utilizada nas cirurgias de timpanoplastia como descrita no item 3.1. A fásia não foi encontrada nas lâminas da maioria das orelhas estudadas, provavelmente, porque é um tecido vivo, e necessita de nutrição para manter-se. Na luz da bula não encontrou condições ideais para manter-se, possivelmente necrosou e foi absorvida.

A membrana de biopolímero é um material inerte, que não necessita de nutrição para manter-se íntegro. Na maioria dos casos, o biopolímero permaneceu sem grandes alterações em sua estrutura. Nas arterioplastias experimentais, a membrana de biopolímero não apresentou focos de absorção e não perdeu sua integridade, após 180 dias.⁵⁷ Ao contrário do que ocorre com veias e artérias autógenas utilizadas como remendos arteriais. Segundo o autor, essa característica conferiu ao biopolímero capacidade de se tornar um remendo viável.⁵⁷ Após 90 dias, também não foi observado nenhum sinal de reabsorção da membrana do biopolímero quando utilizada como *sling* pubovaginal.⁵⁶

Todavia, Lima⁵⁸ afirmou que o biopolímero na substituição da dura-máter tem a tendência de ser absorvido a longo prazo. Na sua avaliação do grau de absorção do biopolímero, na maioria dos casos houve absorção moderada. Em um caso houve sinais de absorção comprometendo a porção central da membrana do biopolímero e um caso com desarranjo da arquitetura original e substituição da mesma por fibrose. No presente estudo o rato 12 do tempo T2 (figura 22), apresentou o mesmo desarranjo e tendência à absorção citado por este autor.⁵⁸

No presente estudo, a ausência do biopolímero em três bulas timpânicas sugere que a mesma foi completamente absorvida em 12 semanas, visto que, no tempo precoce, o biopolímero estava presente em todas as bulas. O estudo de Lima⁵⁸ aliado aos resultados aqui apresentados comprova a hipótese de que a membrana do biopolímero, sendo biocompatível, pode ser absorvida com o passar do tempo.

6.4.2. Resultados quantitativos

A média geral da espessura da mucosa foi 42,3 μ m e 64 μ m nos grupos controle e experimental, respectivamente. Melo⁶⁰ encontrou uma média de 27,24 μ m de espessamento da mucosa quando em contato com propilenoglicol e 205,60 μ m no grupo da mitomicina C.

Inicialmente não há como comparar os resultados de Melo,⁶⁰ apesar de ser um estudo histomorfométrico, pois tal estudo durou 10 semanas. No entanto, na escassez de trabalhos com desenho de estudo semelhante ao atual, pode-se comparar apenas o grupo t3 (12 semanas) com esses valores. Dessa forma nota-se que tanto o biopolímero quanto a fásia não induziram um espessamento subepitelial de grande monta, ao contrário, apresentaram espessuras de 18 μ m e 20 μ m, respectivamente.

Conforme se observa na tabela 3 apesar da média da espessura da mucosa ser maior na orelha direita, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados pareados. Também não se comprova diferença significativa entre as duas orelhas para cada um dos tempos de avaliação. Isso ocorreu, provavelmente, devido à grande variabilidade de medidas como pode ser visto nos valores do desvio-padrão.

O espessamento da mucosa relaciona-se à agressão sofrida na orelha média. Interessante notar que entre 4 e 8 semanas a reação inflamatória aparenta forte

intensidade em ambas as orelhas, para com 12 semanas reduzir-se consideravelmente. No grupo experimental essa diminuição foi estatisticamente significativa quando comparamos t3 com t2 e t3 com t1. Observando apenas a mediana, a espessura da mucosa na orelha direita é reduzida quase que a metade a cada tempo estudado ($70\mu\text{m} \times 35\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$). No tempo mais tardio, o processo inflamatório dá indícios de resolução, com valores semelhantes no grupo controle e experimental. A partir desses dados presume-se que, provavelmente, com 12 semanas essa mucosa já se restabeleceu voltando a sua espessura normal em ambas as orelhas estudadas.

Na tabela 4 estudam-se as diferentes categorias em que foram classificadas as medidas da mucosa da bula timpânica. Apresentaram espessamento normal ou leve 66,6% dos casos, ou seja, 16 das 24 bulas do grupo experimental e 75% do grupo controle, ou seja, 18 do total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A avaliação da espessura da MT faz-se necessária visto que a sua camada interna está em contigüidade com a mucosa da bula timpânica e reage às mesmas agressões na orelha média. A média geral da espessura da MT foi de $20,1\mu\text{m}$ e $27,3\mu\text{m}$, nos grupos controle e experimental, respectivamente. No estudo de Melo⁶⁰, as substâncias eram injetadas na bula timpânica através de punção com agulha fina, causando mínimo dano à estrutura da MT. No presente estudo, houve uma perfuração com perda de aproximadamente 30% da área da MT a fim de inocular-se o material. Tal lesão trouxe alterações inflamatórias denominadas miringoesclerose, tanto na MT da orelha direita quanto na MT da orelha esquerda, já descritas nos resultados qualitativos. A miringoesclerose influenciou na medida da espessura da MT de ambos os grupos.

Na tabela 5 destaca-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da espessura da MT entre os grupos estudados. Também não houve

diferença entre os tempos. A variabilidade de valores, assim como nas médias da mucosa da bula, também ocorreu nas médias da MT, com desvio-padrão alto. Existiu uma tendência do espessamento da MT diminuir na fase tardia do estudo para valores próximos ao normal (15,8 μ m e 20,2 μ m) em ambas as orelhas.

Na tabela 6 a espessura da MT é classificada a partir de diferentes categorias. Foram classificadas com espessura normal ou leve 54,1%, ou seja, 13 das 24 MTs do grupo experimental e 75% ou 18 do total do grupo controle. Aparentemente o biopolímero pode ter induzido maior espessamento, mas não houve diferença estatística.

Apesar da maior frequência de casos com exsudato inflamatório na luz da bula do grupo experimental na análise qualitativa, isso não influenciou o resultado quantitativo, já que não houve diferença nas médias da espessura da mucosa e da MT entre os grupos. Levanta-se a hipótese que, embora a luz da bula estivesse normal no grupo controle, as alterações dos valores das mensurações podem indicar processo inflamatório pregresso neste grupo. Provavelmente, neste caso, apenas a manipulação da bula timpânica pode ter provocado o espessamento da mucosa e da MT. Já no grupo experimental, a presença do exsudato e da manipulação cirúrgica não alterou significativamente a espessura dos pontos estudados, a ponto do biopolímero comportar-se como a fásia na análise histomorfométrica.

É relevante o fato de ambos os grupos terem sido submetidos à mesma manipulação cirúrgica. Tal manipulação pode ter causado uma reação inflamatória que se somou a presença dos materiais. Apesar disso, o grau de inflamação não se mostrou exuberante na maioria das orelhas estudadas. Talvez se houvesse um terceiro grupo submetido apenas à manipulação cirúrgica, mas sem inoculação de material, poderíamos identificar melhor as alterações resultantes exclusivas de cada agressão, em cada grupo.

6.5. Considerações finais

O tipo de reação provocada pela membrana do biopolímero da cana-de-açúcar foi subaguda em aproximadamente 50% dos casos. Cerca de 30% foi reação inflamatória crônica e em 20% da amostra não foi encontrado sinais de inflamação. A reação apresentou-se de leve intensidade na maioria dos casos, tanto nos critérios qualitativos quanto quantitativos. No início do estudo, o biopolímero induziu atividade inflamatória importante. Contudo, ao final do experimento, notou-se que o exsudato desapareceu e os valores da mucosa e da MT voltaram ao normal, com resultado semelhante à fásia.

Há a sugestão que outros estudos devam ser feitos com a membrana do biopolímero em contato com a face epitelial da MT, como enxerto lateral. Sem contato com a mucosa, pode ser que o biopolímero da cana-de-açúcar não provoque reação exsudativa. Na técnica lateral da timpanoplastia, é preferível que o enxerto permaneça viável por um longo período de tempo e a membrana do biopolímero apresenta possível absorção em longo prazo.

Como enxerto medial, sugere-se estudos futuros que comparem a membrana de biopolímero com materiais sintéticos e semi-sintéticos. Nesta relação, é possível que o biopolímero destaque-se visto sua baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade.

O presente trabalho conclui que existe a possibilidade do biopolímero ser utilizado como substituto da fásia autóloga, nos casos em que a mesma não pode ser utilizada e um material sintético faz-se necessário. As evidências para essa possibilidade são que a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tempo tardio não provoca inflamação na orelha média, há mínima fibrose e que a membrana apresenta tendência

de absorção, o que é interessante, já que o enxerto na timpanoplastia é apenas uma ponte para as correntes de migração epitelial.

Por certo, o presente estudo dificilmente encerra a questão sobre os materiais usados na cirurgia otológica, pelo contrário, apenas inicia uma linha de pesquisa a ser seguida e aprofundada futuramente.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com uma margem de 95% de segurança permite concluir que a membrana do biopolímero sintetizada pela *Zoogloea sp* a partir do melaço da cana-de-açúcar provocou reação inflamatória na mucosa da bula timpânica dos ratos Wistar.

A partir da análise histopatológica qualitativa e quantitativa concluiu-se que a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar apresentou resultado semelhante à fásia autóloga no tempo tardio do experimento, tornando-se um material potencialmente viável como enxerto na cirurgia otológica.

REFERÊNCIAS

1. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins SL, T Collins, V Kuman, Cotran RS, editores. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44–78.
2. Nóbrega M. Anatomia e fisiologia da orelha média. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. Tratado de Otorrinolaringologia – Técnicas cirúrgicas. 1ª ed. São Paulo: Rocca; 2002. p. 377–81.
3. Zorzeto NL. Anatomia do ouvido. In: Costa SS, Cruz OLM, Oliveira JAA, editores. Otorrinolaringologia princípios e prática. 1ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1994. p. 15–50.
4. Koba R. Epidermal cell migration and healing of the tympanic membrane: an immunohistochemical study of cell proliferation using bromodeoxyuridine labeling. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:218–225.
5. Tomita S, Kos AOA, Rodrigues FA. Timpanoplastia e reconstrução da cadeia ossicular. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. Tratado de Otorrinolaringologia – Técnicas cirúrgicas. 1ª ed. São Paulo: Rocca; 2002. p. 45–63.
6. Dursun E, Dogru S, Gungor A, Cincik H, Poyrazoglu E, Ozdemir T. Comparison of paper-patch, fat, and perichondrium myringoplasty in repair of small tympanic membrane perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138:353–356.
7. Ensari S, Selampinar F, Akalin Y, Kara CO, Dagli S, Ergin A, Ozdem, C. The use of molded tympanic heterograft (lamb peritoneum). *Ear Nose Throat J* 1995;74:487–489.

8. Caldas N, Caldas Neto SS. Reconstrução ossicular do ouvido médio - custos versus resultados. *Rev Bras Otorrinolaringol* 1989;55:127–132.
9. Deng Z, Wu J, Qiu J, Wang J, Tian Y, Li Y, Jin Y. Comparison of porcine acellular dermis and dura mater as natural scaffolds for bioengineering tympanic membranes. *Tissue Eng Part A* 2009 [Not available-, ahead of print. doi:10.1089/ten.tea.2008.0460].
10. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Coutinho Netto J, Mrue F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003;69:649–655.
11. Melo FAD. Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea sp* em melação de cana-de-açúcar [Dissertação Mestrado]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2003.
12. Castro CMMB, Andrade JL, Melo FAD, Silva WTF. Citotoxicidade do biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2004;49:119–123.
13. Tonnaer EL, Ingels KJ, Rijkers GT, Curfs JH. Antigenic as well as nonantigenic stimuli induce similar middle ear responses in the rat. *Laryngoscope* 2003;113:322–327.
14. Costa SS, Souza LCA. Otite média crônica não-colesteatomatosa. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. *Tratado de Otorrinolaringologia – Técnicas cirúrgicas*. 1ª ed. São Paulo: Rocca; 2002. p. 72–92.
15. Testa JRG; Teixeira MS; Ribeiro KMX; Pizarro GU; Millas I. Cartilagem tragal com pericôndrio na Timpanoplastia. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002;68:54–56.
16. Wullstein H. The restoration of function of the middle ear in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1956; 65:2020–2041.

17. Zollner F. The prognosis of the operative improvement of hearing in chronic middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1957;66:907–917.
18. Austin DF, Shea JJ Jr. A new system of tympanoplasty using vein graft. *Laryngoscope* 1961;71:596–611.
19. Jansen C. Cartilage-tympanoplasty. *Laryngoscope* 1963;73:1288–12301.
20. Storrs LA. Myringoplasty with the use of fascia graft. *Arch. Otolaryng* 1961;74:45–47.
21. Kato M, Costa KS, Almeida CR. Avaliação de técnicas de fechamento de perfuração timpânica simples. *Acta ORL Téc Otorrinol* 2006;24:126–133.
22. Kotecha B, Fowler S, Topham J. Myringoplasty: a prospective audit study. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1999;24:126–129.
23. Bunzen D, Campos A, Sperandio F, Caldas Neto SS. Influência dos achados intra-operatórios no resultado anatômico das miringoplastias. *Arq Int Otorrinolaringol* 2006;10:284–288.
24. Fukuchi I, Cechiari DP, Garcia E, Rezende CEB, Rapoport PB. Timpanoplastias: resultados cirúrgicos e análise dos fatores que podem interferir no seu sucesso. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72:261–266.
25. Lee DH, Jun BC, Jung SH, Song CE. Deep temporal fascial-periosteal flap for canal wall down mastoidectomy. *Laryngoscope* 2006;116:2229–2231.
26. Jackson CG, Schall DG, Glasscock ME, III, Macias JD, Widick MH, Touma BJ. A surgical solution for the difficult chronic ear. *Am J Otol* 1996;17:7–14.
27. Kazama K, Takahashi H, Kaieda S, et al. Effect of a large-sized silicone sheet upon recovery of mastoid aeration after mastoidectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138:738–742.

28. Okten F, Toprak M, Yener M, Bozdog E, Sunbuloglu E, Toprak T. Vibration characteristics of grafts for the tympanic membrane. *Adv Ther* 2007;24:81–90.
29. Harvinder S, Hassan S, Sidek DS, Hamzah M, Samsudin AR, Philip R. Underlay myringoplasty: comparison of human amniotic membrane to temporalis fascia graft. *Med J Malaysia* 2005;60:585–589.
30. Thadani V, Penar PL, Partington J, et al. Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J Neurosurg* 1988;69:766–769.
31. Yetiser S, Tosun F, Satar B. Revision myringoplasty with solvent-dehydrated human dura mater (Tutoplast). *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:518–521.
32. Callanan VP, Curran AJ, Gormley PK. Xenograft versus autograft in tympanoplasty. *J Laryngol Otol* 1993;107:892–894.
33. Downey TJ, Champeaux AL, Silva AB. AlloDerm tympanoplasty of tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol* 2003;24:6–13.
34. Prior M, Gibbins N, John G, Rhys-Williams S, Scott P. Hyaluronic acid ester in myringoplasty. *J Laryngol Otol* 2008;122:e3.
35. Laurent C, Soderberg O, Anniko M, Hartwig S. Repair of chronic tympanic membrane perforations using applications of hyaluronan or rice paper prostheses. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1991;53:37–40.
36. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol* 2005;26:563–566.
37. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM, Scott NM. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol* 1994;15:10–8.

38. Ma Y, Zhao H, Zhou X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol* 2002;122:586–599.
39. 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;116:454–457.
40. Dogru S, Haholu A, Gungor A, Kucukodaci Z, Cincik H, Ozdemir T, Sen H. Histologic analysis of the effects of three different support materials within rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;140:177–182.
41. 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.
42. 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;20:712–716.
43. Goldenberg RA, Emmet JR. Current use of implants in middle ear surgery. *Otol Neurotol* 2001;22:145–152.
44. Canevarolo Jr SV, editor. Introdução geral. *Ciência dos polímeros*. 2^a ed. São Paulo: Artliber Editora; 2006. p.5-8.
45. Sutherland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol* 1998;16:41–46.
46. Klemm D, Schumann D, Udhart U, Marsch S. Bacterial synthesised cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 2001;26:1561-1603.
47. Leonel ECF, Porciúncula HF, Andrade Sobrinho J, Ramalho LTO, Mangili PD, Rapoport A. A ação do polímero da mamona durante a neoformação óssea. *Acta Cir Bras* 2004;19:342–350.

48. Mrue F. Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex - estudo experimental em cães. [Tese Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996.
49. Paulo NM, Lima FG, Siqueira-Júnior JT. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. *Acta Cir Bras* 2005;20:300–305.
50. Souza LCA, Piza MRT, Coutinho Netto J, Ruiz DB, Schmidt VB. Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomias. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2007;73:331–336.
51. Friedman BA, Dugan PR. Identification of *Zoogloea* species and the relationship to *Zoogloea* matrix and floc formation. *J Bacteriol* 1968;95:1903–1909.
52. Troyano E, Lee S-P, Rha CK, Sinskey AJ. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. *Carbohydrate Polymers* 1996;31:35–40.
53. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd L.L, Medeiros V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers* 2000;42:375–383.
54. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota R, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirur Bras* 2002;17:1–7.
55. Chagas HM, Aguiar JLA, Andrade RT, Montoro M, Vilar FO, Lima SVC. Uso da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar na reconstrução ureteral. *Anais do 30º Congresso Brasileiro de Urologia*; 2005 Oct 22; Brasília. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005.

56. Lucena RG. Utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como novo material para sling pubovaginal: análise estereológica [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde; 2007.
57. Lins EM. Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo em arterioplastias femorais em cães. [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde; 2007.
58. Lima FMT. Membrana de biopolímero da cana-de-açúcar como substituto de dura-máter em ratos Wistar [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde; 2008.
59. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Meringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. *An Fac Med Univ Fed Pernambuco*. 2006; 51:45-51.
60. Melo AA. Efeito da mitomicina C intratimpânica no desenvolvimento do colesteatoma e da otite média em ratos. [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde; 2007.
61. Stenfeldt K, Johansson C, Hellstrom S. The collagen structure of the tympanic membrane: collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:293–308.
62. Cesnik R. Melhoramento da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. internet 2007 [acessado em 12/08/2009]; Disponível em:http://www.cnpma.embrapa.br/down_hp.
63. Infoener. Cana-de-açúcar no Brasil. internet homepage 2001 [acessado em 12/08/2009];Disponível em: http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp.

64. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior MD, Lima FTM, Aguiar JLA. Resposta inflamatória à membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno implantadas no peritônio parietal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2005;50:37–40.
65. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Act Cir Bras* 2004;19:441–447.
66. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas Neto SS, Rosas STP. Achados otomicroscópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos: estudo crítico de um modelo experimental. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2005;71:668–674.
67. Amoils CP, Jackler RK, Milezuk H, Kelly KE, Cao K. An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;106:47–55.
68. Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA, Hyppolito MA. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2009;75:43–49.
69. Scarano E, Paludetti G, Frusoni F, Deli R, Maurizi M. Morphological distribution of middle-ear epithelium in the Wistar rat: a functional hypothesis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1997;59:166–169.
70. Wysocki J. Topographical anatomy and measurements of selected parameters of the rat temporal bone. *Folia Morphol* 2008;67:111–119.
71. Verdaguer JM, Trinidad A, González-García JA, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Spontaneous otitis media in Wistar rats: an overlooked pathology in otological research. *Lab Anim* 2006;35:40–44.

72. Rahman A, Hulcrantz M, Dirckx J, Margolin G, von UM. Fresh tympanic membrane perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol* 2005;26:1100–1106.
73. Ng M, Linthicum FH Jr. Long-term effects of Silastic sheeting in the middle ear. *Laryngoscope* 1992;102:1097–1102.

ANEXOS

Anexo I

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 29 de maio de 2008

Ofício nº 37/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Silvio da Silva Caldas Neto**
Departamento de Cirurgia - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.019069/2008-11

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Modelo Experimental de Colesteatoma utilizando o Biopolímero de Cana-de Açúcar”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Anexo II

Dados da espessura da mucosa e da membrana timpânica por ouvido

Ratos	Tempo	Valor	Mucosa da bula timpânica				Membrana timpânica		
			Orelha direita		Orelha esquerda		Orelha direita		Orelha esquerda
			Classificação	Valor	Classificação	Valor	Classificação	Valor	Classificação
1	T1	213,5	Intensa	19,1	Leve	69,1	Intensa	18,8	Leve
2	T1	66,1	Moderada	43,3	Leve	16,3	Leve	11,4	Normal
3	T1	37,7	Leve	22,0	Leve	50,8	Intensa	19,5	Leve
4	T1	8,2	Normal	6,5	Leve	17,1	Leve	18,8	Leve
5	T1	33,4	Leve	10,8	Leve	13,6	Normal	7,8	Normal
6	T1	82,9	Moderada	21,2	Leve	15,0	Normal	7,4	Normal
7	T1	104,1	Intensa	79,8	Moderada	20,2	Moderada	11,6	Normal
8	T1	73,7	Moderada	125,6	Intensa	12,6	Normal	29,6	Moderada
9	T2	293,7	Intensa	27,3	Leve	104,0	Intensa	17,4	Leve
10	T2	21,0	Leve	148,8	Intensa	9,7	Normal	11,1	Normal
11	T2	40,5	Leve	16,3	Leve	20,0	Moderada	14,7	Normal
12	T2	238,4	Intensa	37,3	Leve	79,3	Intensa	25,1	Moderada
13	T2	29,0	Leve	75,2	Moderada	24,4	Moderada	17,9	Leve
14	T2	17,1	Leve	27,0	Leve	27,6	Moderada	10,7	Normal
15	T2	26,2	Leve	120,3	Intensa	32,3	Intensa	19,5	Leve
16	T2	108,6	Intensa	76,1	Moderada	15,7	Leve	82,5	Intensa
17	T3	18,3	Leve	24,9	Leve	5,6	Normal	35,0	Intensa
18	T3	10,2	Normal	5,0	Leve	15,5	Leve	14,8	Normal
19	T3	17,2	Leve	22,7	Leve	40,4	Intensa	28,5	Moderada
20	T3	28,7	Leve	38,5	Leve	11,4	Normal	10,0	Normal
21	T3	15,1	Leve	20,1	Leve	29,9	Moderada	16,4	Leve
22	T3	11,2	Normal	10,2	Leve	10,4	Normal	11,6	Normal
23	T3	9,0	Normal	16,1	Leve	8,7	Normal	25,6	Moderada
24	T3	37,8	Leve	25,6	Leve	4,1	Normal	19,5	Leve

Classificação da espessura da membrana da mucosa: Normal: Até 15; Leve: 15 a 50; Moderada: > 50 a 100; Intensa:> 100.

Classificação da espessura da membrana timpânica: Normal: Até 15; Leve: 15 a 20; Moderada: > 20 a 30; Intensa:> 30.

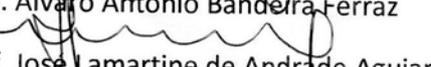
Tempo: T1-4 semanas, T2- 8 semanas, T3- 12 semanas

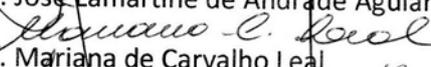
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

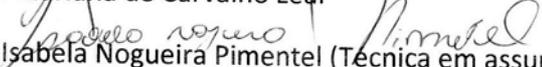
Relatório da Defesa de Dissertação da Dr.^a Débora Lopes Bunzen, Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia nove de outubro de dois mil e nove no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de tese da Dr.^a Débora Lopes Bunzen, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr.^a. MARIANA DE CARVALHO LEAL, Doutora do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: CARLOS TEIXEIRA BRANDT, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, finalmente, externo, Dr.^a. FABIANA FLORES SPERANDIO, Doutora do Departamento de Cirurgia; tendo, como orientador interno, o Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pela Dr.^a Débora Lopes Bunzen versou sobre “**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA MEMBRANA DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR NA BULA TIMPÂNICA DO RATO**”. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos, Pela candidata, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com data show, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, Prof. Dr.^a. MARIANA DE CARVALHO LEAL; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ (Presidente da Banca Examinadora), menção “APROVADA”, Prof. Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, menção “Aprovado”, Prof. Dr.^a. MARIANA DE CARVALHO LEAL, menção “_____”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em assuntos Educacionais, assinado depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 09 de Outubro de 2009.


Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz


Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar


Prof. Mariana de Carvalho Leal


Sra. Isabela Nogueira Pimentel (Técnica em assuntos educacionais)

Mayer, Débora Lopes Bunzen

Avaliação da resposta inflamatória da bula timpânica do biopolímero da cana-de-açúcar / Débora Lopes Bunzen Mayer. – Recife: O Autor, 2009.

xv, 79 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biopolímero da cana-de-açúcar. 2.
Timpanostlastia. I. Título.

616.285
617.85

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-164