



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Pós-Graduação em Cirurgia**

---

**DÉBORA LOPES BUNZEN MAYER**

**MATERIAIS DE SUPORTE NA ORELHA MÉDIA:  
COMPARAÇÃO ENTRE A ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL E A ESPONJA  
DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR EM RATOS**

---

**RECIFE**  
**2014**

**DÉBORA LOPES BUNZEN MAYER**

**MATERIAIS DE SUPORTE NA ORELHA MÉDIA: COMPARAÇÃO ENTRE A  
ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL E A ESPONJA DO BIOPOLÍMERO DA  
CANA-DE-AÇÚCAR EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Cirurgia.

Linha de Pesquisa: Biopolímero da cana-de-açúcar

Orientador

Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto

**RECIFE**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 N° 1010

M468m Mayer, Débora Lopes Bunzen.  
Materiais de suporte na orelha média: comparação entre a esponja de gelatina absorvível e a esponja do biopolímero da cana-de-açúcar em ratos / Débora Lopes Bunzen Mayer.– Recife: O autor, 2014.  
44 f.: il. ; tab. ; 30 cm.

Orientador: Sílvia da Silva Caldas Neto.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2014.  
Inclui referências e apêndices.

1. Esponja de gelatina absorvível. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Biopolímeros. 4. Timpanoplastia.. I. Caldas Neto, Sílvia da Silva (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-100)

**DÉBORA LOPES BUNZEN MAYER**

**MATERIAIS DE SUPORTE NA ORELHA MÉDIA: COMPARAÇÃO ENTRE A  
ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL E A ESPONJA DO BIOPOLÍMERO DA  
CANA-DE-AÇÚCAR EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Cirurgia.

Linha de Pesquisa: Biopolímero da cana-de-açúcar.

Aprovado em: 21/02/ 2014

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto

---

Álvaro Antônio Bandeira Ferraz  
Centro de Ciências da Saúde/UFPE

---

Josemberg Marins Campos  
Centro de Ciências da Saúde/UFPE

---

Salvador Vilar Correia Lima  
Centro de Ciências da Saúde/UFPE

---

Mariana de Carvalho Leal  
Centro de Ciências da Saúde/UFPE

---

Antônio Antunes Melo  
Centro de Ciências da Saúde/UFPE

# **Universidade Federal de Pernambuco**

## **REITOR**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

## **VICE-REITOR**

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

## **PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Francisco de Sousa Ramos

## **CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

### **DIRETOR**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

#### **DIRETOR SUPERINTENDENTE**

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

### **DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

#### **CHEFE**

Prof. Saulo Monteiro dos Santos

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

### **NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

#### **COORDENADOR**

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

#### **VICE-COORDENADOR**

Prof. Josemberg Marins Campos

#### **CORPO DOCENTE**

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvia Caldas Neto

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

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

A minha filha, **Rebeca**,  
pela alegria nos momentos difíceis.

A **Marileide José de Santana (Leide)**  
pelo suporte na minha vida pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Criador de todo o Universo, que, através da fé, esteve comigo para concluir esse trabalho mesmo em meio a dificuldades pessoais e profissionais.

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

À **Profa. Mariana Lira** por sua delicadeza e precisão, contribuindo de maneira inestimável no estudo histopatológico.

À **Camila Sarteschi** pela ajuda no entendimento da análise estatística, transformando números em fatos.

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

À **Nathália Lins**, pela ajuda voluntária no início desse estudo.

Aos **colegas de classe do Doutorado**, pela companhia nessa caminhada.

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

## RESUMO

Existem diversos biomateriais que podem ser utilizados na cirurgia otológica para preencher a cavidade da orelha média ou dar suporte a enxertos. A esponja de gelatina absorvível é a mais utilizada, mas pode provocar fibrose e prejudicar a ventilação da orelha média. O biopolímero da cana-de-açúcar é um biomaterial, em forma de esponja, produzido na Estação Experimental da Cana-de-açúcar da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Investigar os efeitos da reação inflamatória provocada pela esponja do biopolímero da cana-de-açúcar (BP) comparada a esponja de gelatina absorvível (EGA) na mucosa da orelha média de ratos. Estudo experimental prospectivo. A esponja do BP foi implantada na orelha direita e a EGA na orelha esquerda de 30 ratos Wistar fêmeas. Os animais foram sacrificados com 4 e 12 semanas após o procedimento. Avaliação histológica qualitativa foi realizada para verificar a reação inflamatória na bula timpânica. A esponja do BP provocou exsudato inflamatório mais intenso e persistente que a EGA. Foi encontrado exsudato polimorfonuclear e linfomononuclear nas bulas em contato com o BP que persistiram na luz da bula até 12 semanas, o que caracterizou uma reação inflamatória crônica com sinais de agudização. No grupo da EGA, o exsudato foi linfomononuclear, leve, mas com observação de traves de fibrose. A EGA foi, em grande parte, absorvido ao final do experimento. O BP não foi absorvido durante o tempo de observação. Houve espessamento da mucosa e neoangiogênese no grupo da EGA, o que provavelmente está envolvido com o processo de fibrose. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao grau de fibrose entre os biomateriais. O BP apresentou reação inflamatória mais intensa que a EGA, no entanto, provocou menos neoangiogênese. O presente experimento evidenciou que a esponja do BP não apresentou as características necessárias para o uso como material de suporte dentro da bula timpânica, em contato direto com a mucosa. Contudo, é possível que essa esponja possa ser utilizada em contato com a face epidérmica da membrana timpânica e com o conduto auditivo externo, pois se comportou como um material de preenchimento não-absorvível a curto prazo.

**Palavras-chave:** Esponja de Gelatina Absorvível. Materiais Biocompatíveis. Biopolímeros. Timpanoplastia.

## ABSTRACT

Several biomaterials can be used in ear surgery to pack the middle ear or support the graft. The absorbable gelatin sponge is the most widely used, but it may produce fibrosis and impair ventilation of the middle ear. The sugar cane biopolymer is a biomaterial, with a sponge shape, manufactured by Estação Experimental da Cana-de-açúcar of the Universidade Federal Rural de Pernambuco. This experimental study aimed to investigate the inflammatory effects of the sugarcane biopolymer sponge (BP) in the rat middle ear compared with absorbable gelatin sponge (AGS). Prospective experimental study design. Thirty adult female Wistar rats were allocated to receive the BP sponge into the right ear and AGS into the left ear. Animals were randomly killed at 4 and 12 weeks post-procedure. Qualitative histological assessments were performed to evaluate the inflammatory reaction in the tympanic bullae. The BP sponge caused more intense and persistent inflammatory exudate than the AGS. Polymorphonuclear and lymphocytic exudate was found into the tympanic bullae with BP. They persisted in bullae within 12 weeks. It featured a chronic inflammatory reaction with acute signs. In the AGS group there was lymphocytic mild exudate, although with fibrosis observation. The AGF was largely absorbed by the end of the experiment. The BP was not absorbed during the time of observation. There was thickening of the mucosa and neoangiogenesis in the AGF group, which is probably involved in the fibrosis process. There was no statistically significant difference in the degree of fibrosis between biomaterials. The sponge BP produced more inflammation than the AGS, however it caused less neoangiogenesis. This study design shows that the sponge BP was not compatible with an absorbable biomaterial into the tympanic bullae, especially in direct contact to mucosal. However, it is possible that this sponge may be used in contact with the tympanic membrane epidermical surface and the external auditory canal; therefore, it behaved as a non-absorbable short-term fill material.

**Keywords:** Biopolymers. Otologic Surgical Procedures. Biocompatible polymers. Sponge Absorbable.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Rato Wistar em decúbito lateral. Incisão cirúrgica na região retroauricular da orelha esquerda.                                                     | 23 |
| <b>Figura 2</b> - Exposição do local onde situa-se a bula timpânica, profundamente à musculatura cervical no lado esquerdo do rato.                                   | 23 |
| <b>Figura 3</b> - Materiais estudados.                                                                                                                                | 24 |
| <b>Figura 4</b> - Fotomicrografia da bula timpânica esquerda do rato com esponja de gelatina absorvível em seu interior. Nota-se exsudato leve com traves de fibrose. | 31 |
| <b>Figura 5</b> - Fotomicrografia da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar envolvido em reação inflamatória leve na bula timpânica direita do rato.                | 32 |
| <b>Figura 6</b> - Fotomicrografia da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar envolvido em reação inflamatória intensa na bula timpânica direita do rato.             | 32 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês (T1) da inoculação da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar.               | 27 |
| <b>Tabela 2</b> - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês (T1) da inoculação da esponja de gelatina absorvível.                         | 28 |
| <b>Tabela 3</b> - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses (T2) da inoculação da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar.           | 28 |
| <b>Tabela 4</b> - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses (T2) da inoculação da esponja de gelatina absorvível.                     | 28 |
| <b>Tabela 5</b> – Comparação dos grupos de biomateriais em relação aos achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês de experimento (T1).     | 29 |
| <b>Tabela 6</b> – Comparação dos grupos de biomateriais em relação aos achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses de experimento (T2). | 29 |
| <b>Tabela 7</b> – Comparação dos momentos T1 e T2 no grupo BP em relação a cada parâmetro estudado.                                                          | 30 |
| <b>Tabela 8</b> – Comparação dos momentos T1 e T2 no grupo GF em relação a cada parâmetro estudado.                                                          | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                 |
|-----------------|-------------------------------------------------|
| <b>AH</b>       | Ácido hialurônico                               |
| <b>BP</b>       | Biopolímero da cana-de-açúcar                   |
| <b>CAE</b>      | Conduto auditivo externo                        |
| <b>DP</b>       | Desvio padrão                                   |
| <b>E.Mu</b>     | Espessamento da mucosa da bula timpânica        |
| <b>E.MT</b>     | Espessamento da Membrana Timpânica              |
| <b>F</b>        | Fibrose                                         |
| <b>GF</b>       | Gelfoam®                                        |
| <b>HE</b>       | Hematoxilina-eosina                             |
| <b>LB</b>       | Luz da Bula timpânica                           |
| <b>LMN</b>      | Infiltrado Linfomonoplasmocitário               |
| <b>M</b>        | Martelo                                         |
| <b>MT</b>       | Membrana timpânica                              |
| <b>n</b>        | Número da amostra                               |
| <b>NCE</b>      | Núcleo de Cirurgia Experimental                 |
| <b>Neoangio</b> | Neoangiogênese                                  |
| <b>p</b>        | Probabilidade de erro                           |
| <b>PEATE</b>    | Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico |
| <b>PMN</b>      | Infiltrado Polimorfonuclear                     |
| <b>T1</b>       | Tempo 1 do experimento                          |
| <b>T2</b>       | Tempo 2 do experimento                          |
| <b>UFPE</b>     | Universidade Federal de Pernambuco              |
| <b>UFRPE</b>    | Universidade Federal Rural de Pernambuco        |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                              | 12 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                                                                                                               | 14 |
| 2.1 GERAL                                                                                                                                        | 14 |
| 2.2 ESPECÍFICOS                                                                                                                                  | 14 |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                                                   | 15 |
| 3.1 MATERIAIS NÃO-ABSORVÍVEIS                                                                                                                    | 15 |
| 3.2 MATERIAIS ABSORVÍVEIS                                                                                                                        | 16 |
| 3.3 ESPONJA HEMOSTÁTICA DE GELATINA ABSORVÍVEL: BREVE HISTÓRICO E ESTADO ATUAL                                                                   | 17 |
| 3.4 BIOPOLÍMEROS                                                                                                                                 | 19 |
| 3.5 BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR                                                                                                                | 19 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                     | 22 |
| 4.1 CASUÍSTICA                                                                                                                                   | 22 |
| 4.2 LOCAL DO ESTUDO                                                                                                                              | 22 |
| 4.3 TIPO DE ESTUDO                                                                                                                               | 22 |
| 4.4 PERÍODO DA COLETA                                                                                                                            | 22 |
| 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO                                                                                                                       | 23 |
| 4.5.1 Cirurgia otológica                                                                                                                         | 23 |
| 4.6 PROCEDIMENTO HISTOTÉCNICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA                                                                                          | 25 |
| 4.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS                                                                                                                     | 27 |
| 4.8 PROCEDIMENTOS ÉTICOS                                                                                                                         | 27 |
| <b>5 RESULTADOS</b>                                                                                                                              | 28 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b>                                                                                                                               | 34 |
| <b>7 CONCLUSÃO</b>                                                                                                                               | 40 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                               | 41 |
| <b>APÊNDICE</b> - Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats | 46 |
| <b>APÊNDICE</b> - Parecer do comitê de ética                                                                                                     | 54 |

## 1 INTRODUÇÃO

As cirurgias otológicas são comuns na prática diária do otorrinolaringologista, e as timpanoplastias e timpanomastoidectomias são aquelas em que geralmente se usam biomateriais. Na grande maioria das técnicas empregadas, faz-se necessário, além de um material de enxerto para o fechamento da perfuração da membrana timpânica (MT), outro material para suporte ou preenchimento da cavidade da orelha média<sup>1</sup>. O material de suporte deve ser inócuo para o paciente, biocompatível e provocar mínima reação da mucosa para não comprometer a ventilação da orelha média<sup>2</sup>. Idealmente, deve ser moldável à cavidade timpânica e manter o enxerto estável a médio prazo<sup>2</sup>. O material pode ser absorvido ou não pelo organismo após a cicatrização.

Vários tipos de materiais de suporte podem ser usados na timpanoplastia e timpanomastoidectomia. Há materiais não absorvíveis que necessitam de uma cirurgia revisional para removê-los, como o silicone. Os materiais absorvíveis podem ser produzidos a partir do ácido hialurônico, materiais sintéticos, materiais alternativos (plantas) ou gelatina. Em todo o mundo, o material mais usado para oferecer estabilidade ao enxerto timpânico é a esponja hemostática de gelatina absorvível, derivada da derme do porco (Gelita-Spon<sup>®</sup>, Surgifoam<sup>®</sup>, Gelfoam<sup>®</sup> e etc.). No entanto, trabalhos na literatura surgem questionando seu uso na Otologia, com evidências de fibrose e espessamento subepitelial<sup>3-5</sup>.

A mucosa da orelha média é muito reativa Tonnaer et al.<sup>6</sup> inocularam várias substâncias, por via transtimpânica (bactéria, hemocianina, carvão ativo ou soro fisiológico), na bula timpânica dos ratos. Os autores<sup>6</sup> concluíram que com qualquer das substâncias testadas (exceto o soro fisiológico), é possível provocar otite média aguda. A dificuldade em se conseguir um material biocompatível com o mínimo de dano a mucosa impulsiona o desenvolvimento de novos biomateriais.

O biopolímero da cana-de-açúcar é uma macromolécula produzida pela bactéria *Zoogloea sp* quando cultivada em um meio de cultura rico em melaço da cana-de-açúcar<sup>7</sup>.

Este polímero tem-se mostrado biocompatível em forma de membranas em alguns estudos publicados em diferentes áreas<sup>8-12</sup>.

A membrana do biopolímero da cana-de-açúcar é uma estrutura laminar não-porosa que foi testada experimentalmente com o objetivo de substituir ou fixar o enxerto na cirurgia para fechamento da perfuração da MT<sup>11,12</sup>. Já a esponja do biopolímero da cana-de-açúcar é um material poroso e denso. Em contato com a água, apresenta pouca expansibilidade, tornando-se friável. Esse tipo de material poderia ser usado como suporte para o enxerto ou mesmo como preenchimento da cavidade timpânica e canal auditivo externo. Este estudo pretende avaliar a reação inflamatória precoce e tardia, causada pelo biopolímero da cana-de-açúcar em forma de esponja em contato com a mucosa da orelha média, comparado a esponja de gelatina absorvível.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a possibilidade, de acordo com a resposta inflamatória, do uso da esponja de biopolímero da cana-de-açúcar como material de suporte na cirurgia da orelha média.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Analisar qualitativamente, através de estudo histológico, a reação inflamatória na bula timpânica dos animais, na presença da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar em comparação com esponja de gelatina absorvível.

Avaliar a resposta inflamatória precoce e tardia, através dos seguintes parâmetros:

- a) As alterações morfológicas da membrana timpânica;
- b) As alterações morfológicas da mucosa da bula timpânica;
- c) O tipo de inflamação e a caracterização da celularidade do processo;
- d) A intensidade da atividade inflamatória;
- e) Presença de fibrose ou neoangiogênese;
- f) Comparar os parâmetros acima avaliados entre os biomateriais;
- g) Comparar a resposta inflamatória precoce e a resposta tardia, de cada material;
- h) Avaliar a absorção dos materiais pelo organismo do rato ao longo do experimento.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de biomateriais na cirurgia otológica é uma prática comum na Otorrinolaringologia. Após a introdução por Zollner<sup>13</sup> e Wullstein<sup>14</sup> dos materiais de preenchimento na cavidade timpânica, o uso dos biomateriais têm-se expandido. Os materiais de suporte e preenchimento são indicados na maioria das timpanoplastias e mastoidectomias.

A timpanoplastia é a cirurgia indicada para corrigir uma perfuração crônica na MT. Os principais objetivos dessa cirurgia são a obtenção de uma orelha média seca; uma MT intacta; preservação ou reconstrução do complexo da orelha média/externa e restauração dos mecanismos que conduzem o som<sup>1</sup>. Durante a reconstrução da MT, usa-se um suporte para o enxerto no local da perfuração. Duas técnicas podem ser empregadas, a timpanoplastia *underlay* e *overlay*. Na timpanoplastia *underlay* o enxerto fica em contato com a face medial da MT e o material de suporte é colocado, em sua maioria, dentro da cavidade da orelha média<sup>1</sup>. Na técnica *overlay*, o enxerto situa-se lateralmente ao remanescente timpânico, e o material de suporte fica em contato com a face epidérmica da MT e no conduto auditivo externo (CAE)<sup>1</sup>. Em ambas as técnicas, esse suporte deve permanecer firme até a completa cicatrização e formação de um neotímpano, por volta de 2 a 3 meses de pós-operatório<sup>1</sup>.

#### 3.1 MATERIAIS NÃO-ABSORVÍVEIS

Os materiais usados como suporte podem ser classificados em biológicos e sintéticos. Os materiais biológicos podem ser absorvíveis ou não absorvíveis. O material não absorvível mais utilizado nas cirurgias otológicas é o silicone. A partir do silicone são produzidos tubos de ventilação para MT<sup>15</sup>, tubos de ventilação para tuba auditiva<sup>16</sup>, enxertos para pequenas perfurações na MT<sup>17</sup> e stents para canal auditivo externo<sup>18,19</sup>, além de material de suporte<sup>20-22</sup>. A fita de Silastic® pode ser colocada na mucosa da orelha média ou na região da janela oval e evita o contato direto do enxerto com o promontório. Essa barreira melhora a aeração do mesotímpano e evita a retração da MT<sup>20-22</sup>.

Elmorsy et al.<sup>23</sup> através de um estudo retrospectivo observaram pacientes com aderências na orelha média que se submeteram a cirurgia de timpanoplastia em que foi utilizada a fita de Silastic® comparada a um grupo de pacientes sem o uso da mesma. Após um ano, o resultado audiométrico dos casos com uso do Silastic® mostrou-se melhor do que

naqueles sem o silicone<sup>23</sup>. A membrana de Silastic® foi objeto de um estudo histológico a longo prazo em seis ossos temporais no House Ear Institute<sup>20</sup>. Em dois casos, houve fibrose importante da submucosa e em outros dois, fibrose leve<sup>20</sup>.

O silicone é biocompatível, evita sinéquia, induz pouca fibrose, mas não se expande<sup>20</sup>. Ele geralmente é usado como suporte na cirurgia de reconstrução da cadeia ossicular<sup>24</sup>. A desvantagem é que esse material, não-absorvível, necessita de uma segunda cirurgia para ser removido, caso contrário pode ser extruído através da MT, o que prejudica o resultado cirúrgico<sup>2</sup>. Nas mastoidectomia com revisão cirúrgica já programada, a chamada *second-look*, é comum o uso do Silastic® e remoção no segundo tempo cirúrgico<sup>21,22</sup>.

### 3.2 MATERIAIS ABSORVÍVEIS

Os materiais que são degradados e absorvidos pela mucosa são usados principalmente como suporte temporário para enxertos e como material hemostático. Esses materiais são produzidos principalmente a partir do ácido hialurônico e da gelatina da derme do porco. Há ainda os materiais alternativos, produzidos sinteticamente a partir de polímeros da celulose e poliuretano.

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo de alto peso molecular encontrado no corpo humano, principalmente na matriz extracelular, que apresenta ação antiinflamatória e propriedades viscoelásticas. O AH é amplamente utilizado na ortopedia e oftalmologia. Na Otologia, o AH pode ser empregado como suporte ao enxerto ou como material de preenchimento da cavidade da orelha média<sup>25</sup>. Ele está disponível na forma líquida<sup>26</sup>, gel<sup>27</sup>, como membrana<sup>28</sup> ou esponja<sup>29,30</sup>.

O Merogel® é o AH esterificado em forma de esponja absorvível, expansível quando em contato com líquidos, utilizado em cirurgias nasais. Em estudos experimentais o Merogel® foi comparado com o Gelfoam®(GF)<sup>29</sup>. Krupala et al.<sup>29</sup> realizaram timpanoplastia em cobaias com esse objetivo. Os parâmetros utilizados foram a absorção do material, a neoformação óssea, o espessamento da MT, o espessamento da mucosa e a presença de aderências. Os autores encontraram inflamação e aderências semelhantes entre os materiais, e relatam que os resultados do AH em forma de esponja diferem daqueles encontrado no AH na forma líquida, pois a esponja provocou reação inflamatória intensa<sup>29</sup>. Outros estudos compararam o Merogel® ao GF e utilizaram o PEATE (Potencial evocado auditivo do tronco encefálico) como avaliação pós-operatória, além da análise histológica<sup>30</sup>. Após 6 semanas não

houve diferença em relação aos dados do PEATE<sup>30</sup>. Histologicamente, em ambos os materiais foi encontrada células inflamatórias, mas no GF o exsudato foi mais intenso e houve neoformação óssea<sup>30</sup>.

O Carbilan-SX também é um AH modificado em forma de esponja. Park et al.<sup>31</sup> compararam-no ao GF e ao Merogel® em um estudo experimental. O grau de osteoneogênese foi similar nos três grupos de materiais, mas a fibrose foi mais acentuada no grupo do GF, após 2 semanas<sup>31</sup>.

O Nasopore® é um Poliuretano, considerado um material alternativo. É sintético, em forma de esponja, normalmente usado como tampão nas cirurgias nasais. Esse material também foi testado na orelha média como material de suporte. Apesar de provocar pouca reação inflamatória, o Nasopore® é pouco expansível e causa fibrose<sup>4</sup>. Um estudo experimental comparou o Nasopore®, o GF e o Sepragel® (AH em forma de gel)<sup>4</sup>. Após 20 dias, não houve diferença estatística entre os materiais de acordo com os parâmetros utilizados (espessamento da mucosa, fibrose e atividade inflamatória), contudo os autores comentaram a ocorrência de traves de fibrose na orelha média nos casos com o GF<sup>4</sup>. Já, em outro estudo, em ratos, os autores relataram que o Nasopore® provocava menos fibrose que o GF após 3 meses de observação e ambos foram absorvidos pelo organismo<sup>32</sup>.

### 3.3 ESPONJA HEMOSTÁTICA DE GELATINA ABSORVÍVEL: BREVE HISTÓRICO E ESTADO ATUAL

O material absorvível mais utilizado é a esponja de gelatina derivada da derme do porco, comercialmente, o Gelfoam®. Inicialmente, essa esponja absorvível foi usada como agente hemostático na neurocirurgia<sup>5</sup>. A capacidade de expansão do material em contato com fluidos e sua absorção pelo organismo em médio prazo o fizeram ganhar espaço em várias áreas cirúrgicas. Em 1951 foi publicado seu uso não apenas como agente hemostático, mas também como substituto de tecidos destruídos<sup>33</sup>.

Na Otorrinolaringologia, vários autores como Booth<sup>34</sup>, Donald e Baker<sup>35</sup> não encontraram anormalidades no uso do GF na orelha média<sup>5</sup>. Klein citado em Hellstrom et al.<sup>5</sup> relatou que o GF era completamente absorvido na orelha de cães dentro de 2 semanas. Doyle-Kelly<sup>36</sup> também encontrou completa absorção em coelhos após 9 semanas. Ao longo dos anos essa esponja hemostática foi utilizada em diferentes situações principalmente, onde o cirurgião necessitava de um material maleável e poroso.

Uma das primeiras publicações que levantou a hipótese de que o GF não era totalmente inócuo foi de Schuknecht<sup>37</sup>, em 1962. O autor atribuiu ao GF, falha na cirurgia de estapedectomia de uma paciente em que esse biomaterial foi utilizado para fechar a janela oval. Em ratos, Fenestra e Fenestra, citados em Hellstrom et al.<sup>5</sup>, encontraram espessamento do enxerto, fibrose e neoformação óssea quando utilizaram essa esponja como suporte do enxerto em timpanoplastias experimentais<sup>5</sup>.

Na década de 80, otologistas na Suécia encontraram aderências com traves de tecido conjuntivo na orelha média em reoperações de timpanoplastia e nas cirurgias programadas de revisão de mastoidectomias – *second look*<sup>5</sup>. Houve a suspeita de que a esponja de gelatina absorvível utilizada como suporte, poderia ser a causa dessas alterações. Em cirurgia experimental com ratos, esses mesmos autores, encontraram retração da MT com sinéquias e fibrose na orelha média na presença do GF após 2 meses<sup>5</sup>. Também observaram neoformação óssea e espessamento submucoso tanto no promontório quanto no hipotímpano decorridos 3 meses do experimento. Hellstrom et al.<sup>5</sup> concluíram que o GF poderia estar envolvido no insucesso de algumas cirurgias otológicas.

Na literatura são encontrados estudos experimentais com diferentes substâncias, em que o GF provocou maior taxa de fibrose que as demais testadas<sup>3,4</sup>. Há descrição de espessamento subepitelial e deslocamento da cadeia ossicular secundário às traves de fibrose<sup>3</sup>.

Além de material de suporte, existem, atualmente, outras aplicações do GF na Otologia. Nos casos de perfuração da MT, uma alternativa à técnica clássica da timpanoplastia é a colocação de *plugs* nas perfurações pequenas e centrais. O *plug* de vedação pode ser confeccionado no transoperatório a partir da cartilagem do tragus ou da gordura do lóbulo do pavilhão auricular. Mas o cirurgião também pode fazer uso de um *plug* de GF, com bons resultados descritos na literatura<sup>38</sup>. Justamente por induzir fibrose local o GF auxilia na cicatrização desse tipo de lesão timpânica. Outra possibilidade seria embeber o GF em fatores de crescimento para auxiliar no fechamento da perfuração timpânica, como propõe alguns autores<sup>39,40</sup>.

Algumas pesquisas apontam a esponja de gelatina absorvível como carreadora de substâncias na orelha interna ou média. Jang et al.<sup>41</sup>, assim como Baylancicek et al.<sup>42</sup>, utilizaram pequenos fragmentos de GF embebidos em solução de antibiótico e anti-fúgico, respectivamente, para testar ototoxicidade tópica na janela redonda de cobaias. Havenith et al.<sup>43</sup> testaram o GF posicionado na janela redonda como um possível método de liberação de substâncias neurotróficas em pacientes que foram submetidos a cirurgia de implante coclear,

mas observaram que houve penetração limitada da substância em comparação com métodos tradicionais intracocleares.

A esponja de gelatina absorvível também é amplamente utilizada como micropartícula para embolização em procedimentos de Hemodinâmica, por causar fibrose endotelial<sup>44</sup>. Apesar das controvérsias, essa esponja hemostática ainda é o material mais usado na prática dos Otorrinolaringologistas. Na realidade, ainda não existe um material ideal para ser usado nas cirurgias otológicas.

### 3.4 BIOPOLÍMEROS

Um polímero é uma macromolécula composta por dezenas de milhares de unidades (monômeros), que são unidas por ligação química covalente. A membrana do látex da seringueira é um exemplo de biopolímero derivado de óleos vegetais. Uma membrana deste tipo, desenvolvida no laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), foi utilizada em pacientes submetidos a miringoplastias<sup>45</sup>. A membrana do látex, que serviu como suporte, foi colocada na face externa dos bordos da perfuração da MT, em contato com a fáscia temporal. Foram 200 pacientes operados com fechamento da MT em 181 orelhas<sup>45</sup>. Em outro estudo, foi utilizada a membrana do látex para forrar a neocavidade na cirurgia da timpanomastoidectomia com cavidade aberta<sup>46</sup>. Segundo os autores, a biomembrana do látex revelou-se método eficaz no revestimento da neocavidade, facilitando a remoção do tampão e a epitelização da mesma<sup>46</sup>.

A membrana do látex da seringueira assemelha-se muito mais a membrana de silicone que a esponja hemostática de gelatina, visto que ela não é absorvida, não se integra ao tecido e pode ser expelida do organismo a depender do local em que é utilizada. Quando utilizada para correção de inguinoplastia, ela sofre encistamento e não é recomendada<sup>47</sup>.

### 3.5 BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O biopolímero produzido por materiais provenientes da cultura da cana-de-açúcar via microorganismo *Zooglea sp*, com objetivo de utilização nas áreas de química e bioquímica: fio cirúrgico e membranas biodegradáveis foi patenteado pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial, com número da patente PI9603700-8 em 2001, pelo pesquisador

Francisco Assis Dutra da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)<sup>48</sup>. Desde então, foi criado um grupo de pesquisa do Biopolímero da cana-de-açúcar (BP) no CNPq, a fim de estudar a aplicabilidade desse biomaterial na área médica.

Para a produção do BP o melaço da cana entra em contato com bactérias Gram negativas<sup>7</sup>. Esse meio de cultura produz um exopolissacarídeo através do processo de fermentação do açúcar, inicialmente denominado Zooglean, que foi isolado na UFRPE e identificado no Departamento de Antibióticos da UFPE. O biopolímero *in natura*, com açúcares residuais, foi utilizado como curativos para o tratamento de feridas em cães<sup>8</sup>. Os curativos promoveram o aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização<sup>8</sup>.

Após um processo de purificação, o BP foi transformado 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.<sup>49</sup> em 2004, estudaram a sua histocompatibilidade e citotoxicidade *in vitro*. Nesse estudo foi observado 95,3% de viabilidade das células expostas às membranas de biopolímero.

Estudos em animais de laboratório desenvolvidos no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE com o BP em forma de membrana ou gel foram realizados em diversas áreas médicas com publicações científicas em áreas como Cirurgia Vascular, Urologia, Ortopedia e Oftalmologia<sup>9,10,50-53</sup>.

Na cirurgia otorrinolaringológica a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar foi testada como substituta da fáscia temporal como enxerto na miringoplastia. No estudo de Silva et al.<sup>11</sup>, o modelo experimental utilizado foi a perfuração crônica produzida por eletrocautério na MT do chinchila. A membrana do biopolímero era fixada com GF na área cruenta das bordas da perfuração, na face epidérmica da MT. Não houve exsudato e houve fechamento da perfuração semelhante ao grupo controle com a fáscia. Segundo os autores<sup>11</sup>, a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar não foi incorporada ao remanescente timpânico, provavelmente porque não é porosa. Foi sugerido que a mesma serviu como condutora para a formação de elementos responsáveis pela cicatrização da MT.

No estudo de Mayer et al.<sup>12</sup> foi inoculado um fragmento da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar na bula timpânica de ratos Wistar. Foi observado que a membrana do biopolímero, em contato com a mucosa e face medial da MT, tem tendência à absorção e

causa exsudato na luz da bula. O exsudato regride com o tempo (90 dias) e resulta em pouca fibrose<sup>12</sup>.

Desse modo, pode-se observar a importância e a variedade de aplicações práticas que, por ventura podem surgir, se houvesse a disponibilidade de um novo material biocompatível. Ao estudar qual a interação do biopolímero da cana-de-açúcar na mucosa da orelha média poderia ser verificado se há possibilidade da esponja do biopolímero ser utilizada em cirurgias otológicas em contato direto com o remanescente timpânico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

No presente estudo foram utilizados 34 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas, sadias, da linhagem Wistar, pesando de 211 a 290g (média de 247.25g), com cerca de quatro meses de idade. Como critério de exclusão foi considerado qualquer alteração na orelha média ou alteração na membrana timpânica (perfuração, abaulamento com secreção ou miringosclerose extensa). Foram excluídos 4 ratos na otomicroscopia inicial.

Os animais incluídos no estudo foram operados e acompanhados no NCE do Departamento de Cirurgia da UFPE. Eles foram mantidos no biotério, com refrigeração constante com temperatura ambiente controlada de 22°C (+/- 2°C), em gaiolas coletivas com piso de serragem com cinco animais antes do experimento, e gaiolas individuais após o experimento. O local oferecia iluminação programada a cada 12 horas. Foram alimentados com ração industrializada do tipo Labina<sup>®</sup> *ad libitum*.

### 4.2 LOCAL DO ESTUDO

O preparo histotécnico e a análise histológica foram feitos no Laboratório do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPE. E as microfotografias das lâminas, no setor de Morfometria e Análise de Imagem do mesmo Departamento de Patologia da UFPE.

### 4.3 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo é experimental, controlado, analítico e prospectivo.

### 4.4 PERÍODO DA COLETA

Março de 2011 a março de 2012.

#### 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Todos os trinta ratos, selecionados na otomicroscopia inicial, foram operados, em ambas as orelhas, com avaliação final de 60 orelhas. 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. A antibioticoprofilaxia foi feita com cefalotina (1,3mg/100g de peso) via intramuscular, dose única.

##### 4.5.1 Cirurgia otológica

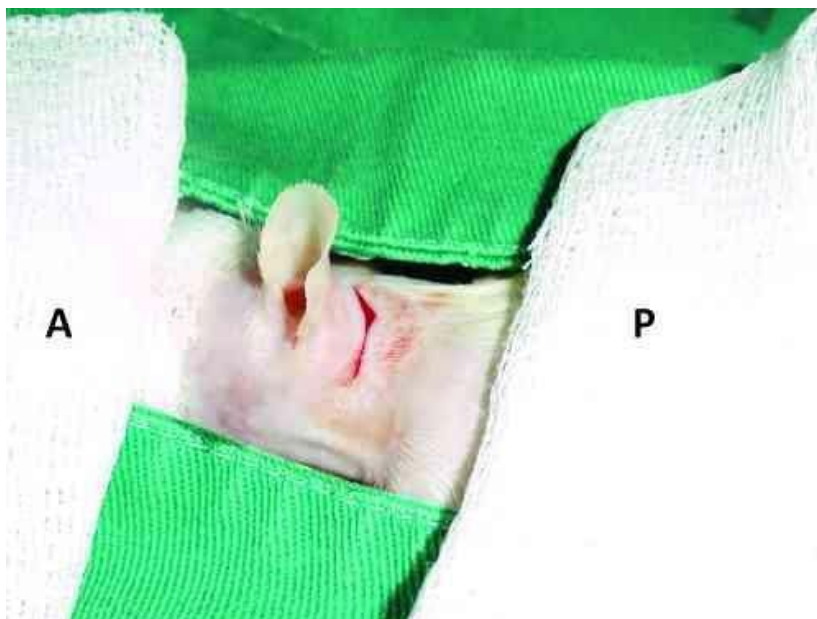
O procedimento cirúrgico foi realizado com microscópio cirúrgico (marca D.F. Vasconcelos® de coluna, modelo MC-M31), em bancada apropriada, com os devidos cuidados de assepsia e antissepsia. A técnica cirúrgica empregada para inoculação de material retrobular foi baseada na descrição dos autores Dogru et al.<sup>4</sup>.

Após anestesia e tricotomia da região retroauricular e cervical, foi feita uma incisão ventrolateral de 2 cm com bisturi frio de lâmina nº 15 distante 0,5 cm da implantação da orelha externa (Figura 1). Afastou-se, então, o plano muscular para evitar traumas desnecessários, visualizando-se, assim, o tendão de inserção do músculo digástrico na base do crânio. Nesta posição, profundamente, situa-se a porção posterior da bula timpânica (Figura 2). Após a exposição retroauricular, a bula timpânica foi perfurada delicadamente com a ponta da agulha 40 x 1,20 mm. Em seguida, com a micropinça tipo jacaré, houve a introdução do material correspondente. Em cada rato, foi colocado na orelha direita, o biopolímero e na orelha esquerdo, o Gelfoam®, de tamanhos padronizados em 5 mm de comprimento e 1 mm de espessura (Figura 3). Assim, todas as bulas do lado direito eram do grupo do BP e todas as bulas do lado esquerdo eram do grupo do GF.

A esponja do BP foi fabricada e fornecida pela Estação Experimental da Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de Pernambuco. O Gelfoam® é um produto fabricado por Pharmacia & UpJonh Co. Após a introdução dos materiais, o plano muscular foi reposicionado e a pele foi suturada com fio nylon 4-0. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo pesquisador para evitar variações da técnica. Após 15 dias a pele do rato expulsa naturalmente o fio de sutura, não sendo necessário removê-lo.

Os animais operados, agrupados aleatoriamente por sorteio, foram subdivididos em dois subgrupos de 15 ratos (30 orelhas): Tempo T1 - sacrificados com 4 semanas e Tempo T2 – sacrificados com 12 semanas após a cirurgia. No tempo estipulado os animais foram submetidos a eutanásia de maneira indolor, através da administração intraperitoneal de tiopental sódico seguido de dose letal deste barbitúrico por injeção intracárdica. Após a eutanásia foram removidas suas bulas timpânicas para estudo.

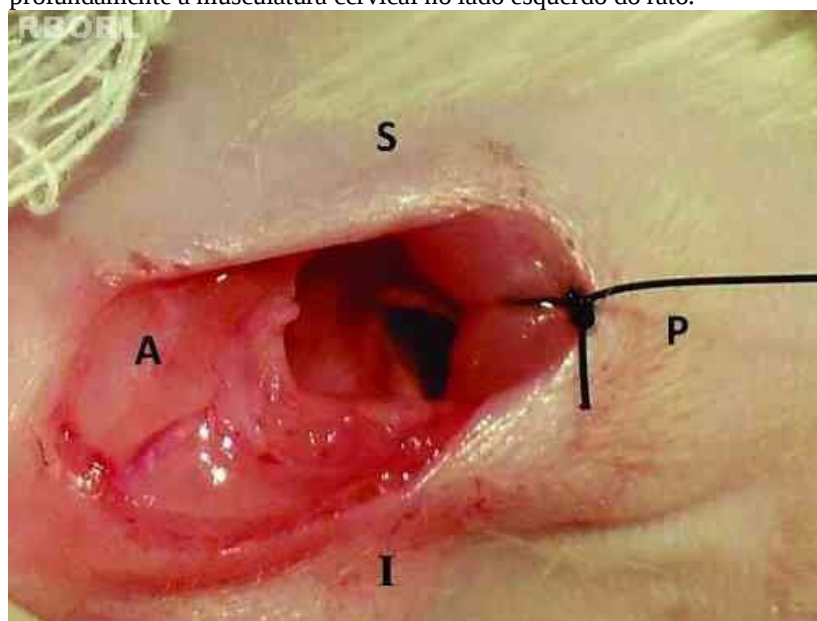
**Figura 1-** Rato Wistar em decúbito lateral. Incisão cirúrgica na região retroauricular da orelha esquerda.



Fonte: A autora.

Nota: A- anterior, P- posterior.

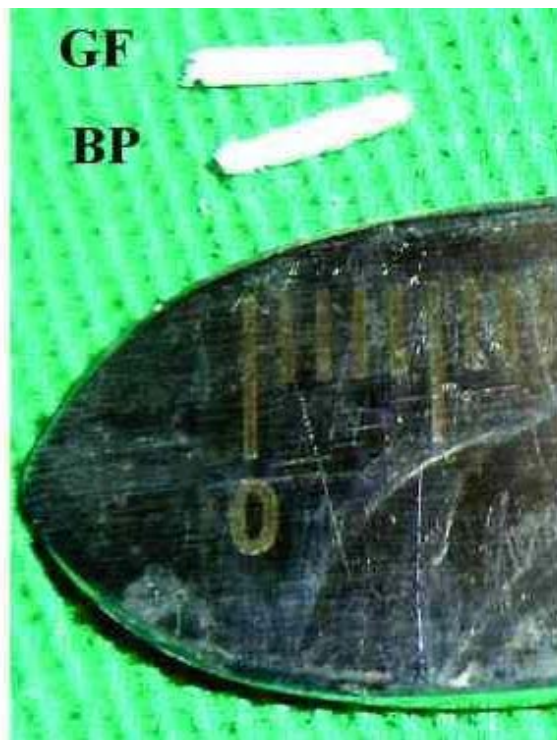
**Figura 2** - Exposição do local onde situa-se a bula timpânica, profundamente à musculatura cervical no lado esquerdo do rato.



Fonte: A autora.

Nota: A- anterior, P- posterior, S- superior, I-inferior.

**Figura 3** - Materiais estudados.



Fonte: A autora.

Nota: GF- Gelfoam®, BP- esponja do Biopolímero da cana-de-açúcar.

#### 4.6 PROCEDIMENTO HISTOTÉCNICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

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 2 mm na porção posterior da bula timpânica para entrada do formol tamponado. O material foi desidratado, em série crescente de etanol a 70%, 80%, 90% e 100%, uma hora cada; em seguida, submetido a processo de clarificação em xilol e incluídos em parafina. Já incluídas em blocos de parafinas, as peças foram levadas para corte de 5µm de espessura em micrótomo (Spencer AO) com intervalo de 50µm. Os cortes foram feitos em plano transversal ao da MT.

Em seguida o material foi submetido a coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), segundo protocolo padronizado do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas. Após todas as lâminas serem processadas, foram selecionadas aquelas cujo corte situava-se na altura do final do cabo do martelo, correspondente ao mesotímpano e o corte na altura do processo longo da bigorna, correspondente ao epitímpano. Os cortes selecionados foram submetidos à análise qualitativa por um patologista experiente.

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

O espessamento da MT e da mucosa da bula timpânica foi classificado em ausente, leve, moderado ou intenso. Através dos dados da espessura normal da MT e da mucosa, retirados dos estudos de Mayer et al.<sup>12</sup> e Melo et al.<sup>55</sup>, foi tido como espessamento leve aquele que não ultrapassava metade da espessura normal. O espessamento moderado foi aquele que apresentava-se entre a metade e o dobro da espessura normal e o intenso aquele em que o tecido aparecia com mais que o dobro de sua espessura.

O infiltrado inflamatório foi analisado quanto ao tipo de célula sendo infiltrado linfomononuclear (LMN) caracterizado pela presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos e o polimorfonuclear (PMN) pelos neutrófilos.

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

A neoangiogênese (neoangio) ocorre a partir de vasos pré-existentes. No curso da inflamação há vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Em seguida há degradação da membrana basal com migração das células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico<sup>56</sup>. A presença ou não desse comportamento da inflamação da mucosa foi avaliado.

A fibrose caracterizou-se pela presença de fibroblastos e deposição de colágeno na matriz extracelular. A fibrose subepitelial da bula foi classificada em leve, moderada e intensa, a depender da extensão do processo na bula timpânica e espessura das fibras colágenas depositadas.

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

#### 4.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

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

#### 4.8 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

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

## 5 RESULTADOS

Do total dos 30 ratos operados, 15 eram do tempo T1 e 15 eram do tempo T2. Houve perda de dois animais dos 15 do tempo T1 por complicações anestésicas no transoperatório. Dos 13 ratos operados, 6 foram excluídos por problemas como infecção secundária bilateral ou falha no processamento histotécnico. Dos 7 ratos (14 orelhas do tempo T1) que sobraram, dois apresentaram otite unilateral (lado esquerdo) e permaneceram no estudo. Assim, no final do primeiro mês de observação do experimento, obtivemos 7 orelhas direitas (grupo BP) e 5 orelhas esquerdas (grupo do GF).

Nos 15 ratos sacrificados no tempo T2, duas orelhas esquerdas foram excluídas por infecção secundária e outras duas pela baixa qualidade do processamento histotécnico. Das 30 orelhas iniciais, restaram 11 orelhas esquerdas (grupo do GF) e 15 orelhas direitas (grupo do BP). Ao final do experimento, as orelhas ficaram assim distribuídas: T1- 7 no grupo do BP e 5 no grupo do GF; T2- 15 no grupo do BP e 11 no grupo do GF.

A descrição dos achados histológicos foi subdividida de acordo com os seguintes parâmetros semi-quantitativos: o grau do espessamento da MT e da mucosa, o tipo celular do infiltrado inflamatório (incluindo a intensidade e extensão da inflamação), a extensão da neovascularização e a intensidade da fibrose da submucosa. Com o objetivo apenas de caracterizar a amostra estudada, apresentamos as frequências absolutas (N) e relativas (percentuais) das classes de cada variável qualitativa, nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

**Tabela 1-** Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês (T1) da inoculação da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar.

| <b>Achados histológicos<br/>BP (n=7)</b> | <b>E.Mu</b> | <b>E.MT</b> | <b>LMN</b> | <b>PMN</b> | <b>Neoangio</b> | <b>Fibrose</b> |
|------------------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------------|----------------|
| Ausente                                  | 1 (14,28%)  | 3 (42,86%)  | -          | -          | 1 (14,28%)      | -              |
| Leve                                     | 3 (42,86%)  | 4 (57,14%)  | 1 (14,28%) | 1 (14,28%) | 6 (85,71%)      | 5 (71,43%)     |
| Moderada                                 | -           | -           | 4 (57,14%) | 3 (42,86%) | -               | 2 (28,57%)     |
| Intensa                                  | 3 (42,86%)  | -           | 2 (28,57%) | 3 (42,86%) | -               | -              |

Fonte: A autora.

Nota: BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 2** - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês (T1) da inoculação da esponja de gelatina absorvível.

| Achados histológicos<br>GF (n=5) | E.Mu      | E.MT      | LMN       | PMN      | Neoangio  | Fibrose   |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| Ausente                          | 2 (40,0%) | 3 (60,0%) | -         | 5 (100%) | -         | -         |
| Leve                             | 1 (20,0%) | -         | 4 (80,0%) | -        | 4 (80,0%) | 1 (20,0%) |
| Moderada                         | 1 (20,0%) | 1 (20,0%) | 1 (20,0%) | -        | 1 (20,0%) | 3 (60,0%) |
| Intensa                          | 1 (20,0%) | 1 (20,0%) | -         | -        | -         | 1 (20,0%) |

Fonte: A autora.

Nota: BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 3** - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses (T2) da inoculação da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar.

| Achados histológicos<br>BP (n=15) | E.Mu       | E.MT       | LMN        | PMN        | Neoangio   | Fibrose    |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ausente                           | 1 (6,66%)  | 8 (53,33%) | -          | -          | 5 (33,33%) | 1 (6,66%)  |
| Leve                              | 5 (33,33%) | 5 (33,33%) | -          | 1 (6,66%)  | 8 (53,33%) | 8 (53,33%) |
| Moderada                          | 4 (26,66%) | 1 (6,66%)  | 12 (80,0%) | 6 (40,0%)  | 2 (13,33%) | 5 (33,33%) |
| Intensa                           | 5 (33,33%) | 1 (6,66%)  | 3 (20,0%)  | 8 (53,33%) | -          | 1 (6,66%)  |

Fonte: A autora.

Nota: BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 4** - Achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses (T2) da inoculação da esponja de gelatina absorvível.

| Achados histológicos<br>GF (n=11) | E.Mu       | E.MT       | LMN        | PMN        | Neoangio   | Fibrose    |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ausente                           | 1 (9,09%)  | 5 (45,45%) | -          | 9 (81,81%) | -          | -          |
| Leve                              | 1 (9,09%)  | 3 (27,27%) | 7 (63,63%) | 1 (9,09%)  | 3 (27,27%) | 4 (36,36%) |
| Moderada                          | 3 (27,27%) | 3 (27,27%) | 4 (36,36%) | -          | 7 (63,63%) | 3 (27,27%) |
| Intensa                           | 6 (54,54%) | -          | -          | 1 (9,09%)  | 1 (9,09%)  | 4 (36,36%) |

Fonte: A autora.

Nota: BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

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

Segue a análise estatística dos dados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. As tabelas 5 e 6 compararam os biomateriais entre si, e as tabelas 7 e 8 compararam os tempos T1 e T2 para cada material.

**Tabela 5** – Comparação dos grupos de biomateriais em relação aos achados histológicos na bula timpânica dos ratos após um mês de experimento (T1).

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

Fonte: A autora.

Nota:\* estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 6** – Comparação dos grupos de biomateriais em relação aos achados histológicos na bula timpânica dos ratos após três meses de experimento (T2).

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

Fonte: A autora.

Nota:\* estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 7** – Comparação dos momentos T1 e T2 no grupo BP em relação a cada parâmetro estudado.

| Achados Histológicos                         | Grupo BP               |                         | p-valor |
|----------------------------------------------|------------------------|-------------------------|---------|
|                                              | 1º Mês – T1 (n = 7)    | 3º Mês – T2 (n = 15)    |         |
| E.Mu<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso     | 4 (57,1%)<br>3 (42,9%) | 6 (40,0%)<br>9 (60,0%)  | 0,652   |
| E.MT<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso     | 7 (100%)<br>0 (0%)     | 13 (86,7%)<br>2 (13,3%) | > 0,999 |
| LMN<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso      | 1 (14,3%)<br>6 (85,7%) | 0 (0%)<br>15 (100%)     | 0,318   |
| PMN<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso      | 1 (14,3%)<br>6 (85,7%) | 1 (6,7%)<br>14 (93,3%)  | > 0,999 |
| Neoangio<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso | 7 (100%)<br>0 (0%)     | 13 (86,7%)<br>2 (13,3%) | > 0,999 |
| Fibrose<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso  | 5 (71,4%)<br>2 (28,6%) | 9 (60,0%)<br>6 (40,0%)  | > 0,999 |

Fonte: A autora.

Nota:\* estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

**Tabela 8** – Comparação dos momentos T1 e T2 no grupo GF em relação a cada parâmetro estudado.

| Achados Histológicos                         | Grupo GF               |                        | p-valor |
|----------------------------------------------|------------------------|------------------------|---------|
|                                              | 1º Mês – T1 (n = 5)    | 3º Mês – T2 (n = 11)   |         |
| E.Mu<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso     | 3 (60,0%)<br>2 (40,0%) | 2 (18,2%)<br>9 (81,8%) | 0,245   |
| E.MT<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso     | 3 (60,0%)<br>2 (40,0%) | 8 (72,7%)<br>3 (27,3%) | > 0,999 |
| LMN<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso      | 4 (80,0%)<br>1 (20,0%) | 7 (63,6%)<br>4 (36,4%) | > 0,999 |
| PMN<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso      | 5 (100%)<br>0 (0%)     | 10 (90,9%)<br>1 (9,1%) | > 0,999 |
| Neoangio<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso | 4 (80,0%)<br>1 (20,0%) | 3 (27,3%)<br>8 (72,7%) | 0,106   |
| Fibrose<br>Ausente/Leve<br>Moderado/Intenso  | 1 (20,0%)<br>4 (80,0%) | 4 (36,4%)<br>7 (63,6%) | > 0,999 |

Fonte: A autora.

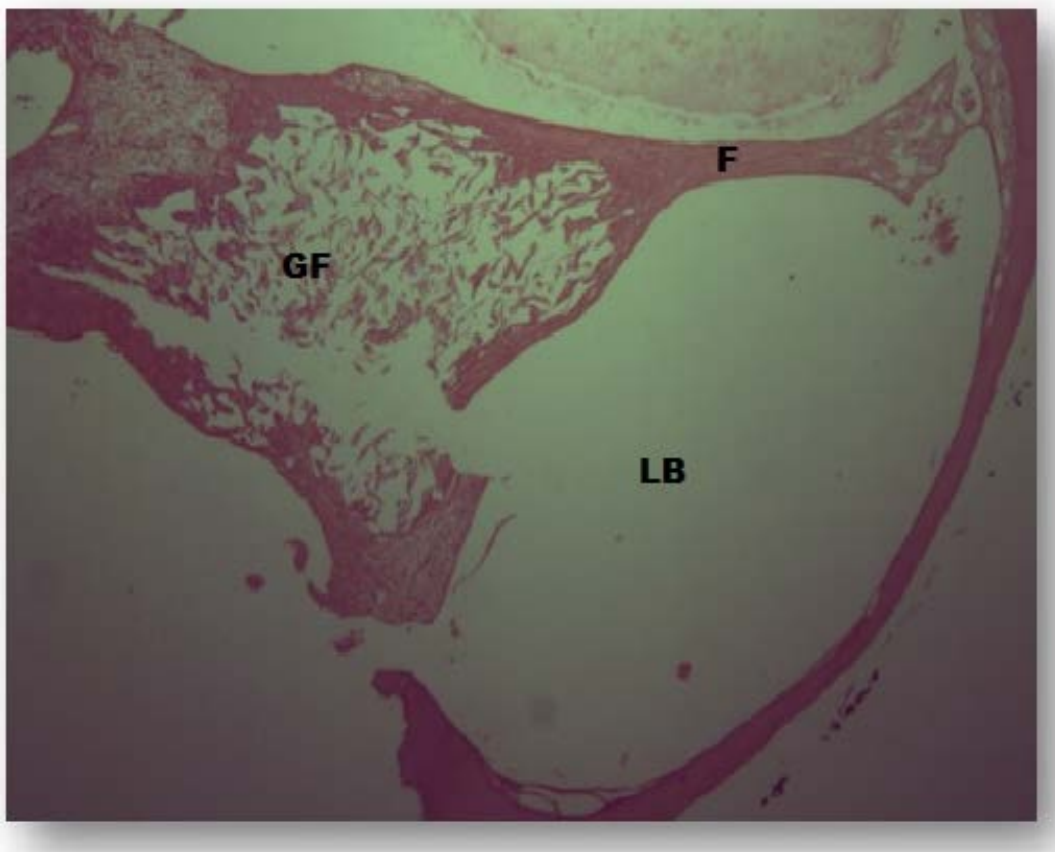
Nota:\* estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). BP Biopolímero, GF Gelfoam®, E.Mu Espessamento da Mucosa da bula timpânica, E.MT Espessamento da Membrana Timpânica, LMN Infiltrado Linfomononuclear, PMN Infiltrado Polimorfonuclear, Neoangio Neoangiogênese.

Em relação a presença do material implantado e sua absorção, após 3 meses do experimento, o BP foi visualizado em todas as bulas timpânicas. O GF foi visualizado em

apenas uma bula. Foi observado neoformação óssea em duas bulas com GF e em três bulas com BP.

O padrão de resposta fibrogênica foi distinto entre os dois grupos. Nos implantes de BP, a fibrose, quando era observada, apresentava-se na maioria dos casos de leve intensidade. Enquanto nos implantes de GF, a fibrose presente apresentava em alguns casos a formação de aderências fibrosas, com preenchimento de espaços aéreos. Estas aderências foram observadas tanto no grupo após um mês de experimento, quanto naquele após três meses. As figuras 4, 5 e 6 ilustram as alterações histológicas encontradas no experimento.

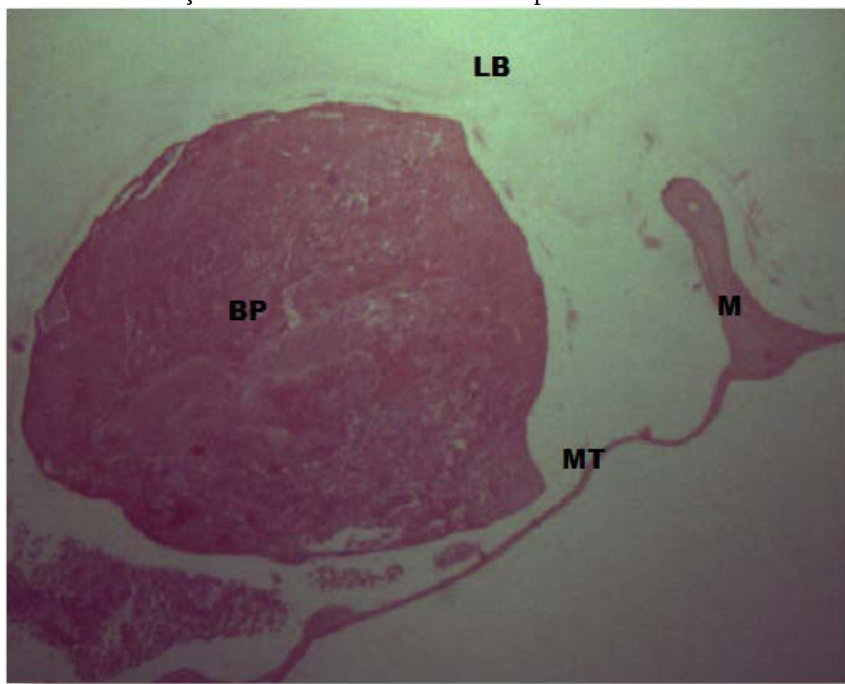
**Figura 4** – Fotomicrografia da bula timpânica esquerda do rato com esponja de gelatina absorvível em seu interior. Nota-se exsudato leve com traves de fibrose.



Fonte: A autora.

Nota: GF- Gelfoam®, F- Fibrose, LB- Luz da bula timpânica. HE (aumento de 40x).

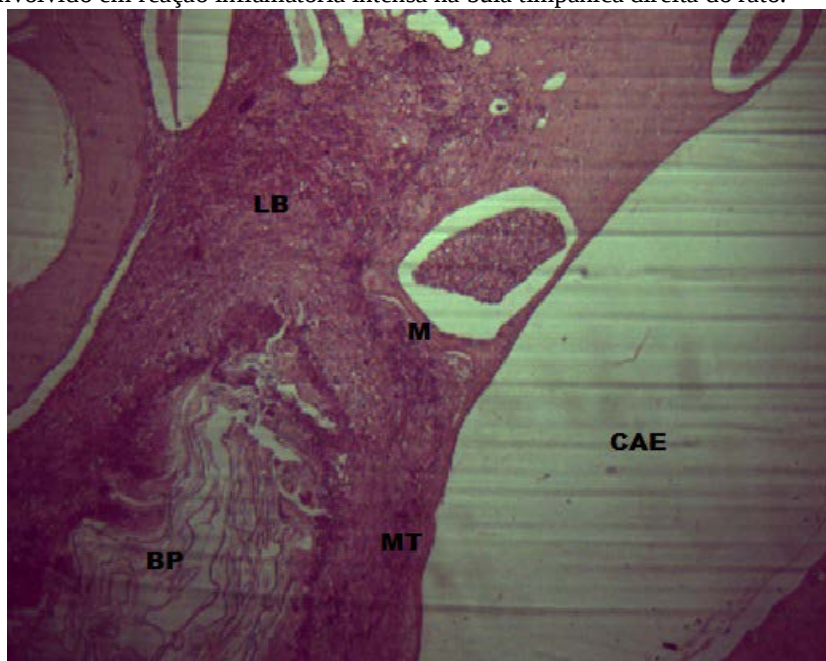
**Figura 5** - Fotomicrografia da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar envolvido em reação inflamatória leve na bula timpânica direita do rato.



Fonte: A autora.

Nota: BP- esponja do biopolímero da cana-de-açúcar, MT- Membrana timpânica, M- Cabo do martelo, LB- Luz da bula timpânica. HE (aumento de 40x).

**Figura 6** - Fotomicrografia da esponja do biopolímero da cana-de-açúcar envolvido em reação inflamatória intensa na bula timpânica direita do rato.



Fonte: A autora.

Nota: BP- esponja do biopolímero da cana-de-açúcar, MT- Membrana timpânica, M- Cabo do martelo, LB- Luz da bula timpânica, CAE- Conduto auditivo externo. HE (aumento de 40x).

## 6 DISCUSSÃO

Os biomateriais estão presentes em diversas áreas da medicina, seja no fio de sutura ou nas próteses complexas. Na cirurgia otológica, são testados biomateriais para tubos de ventilação, implantes na substituição dos ossículos da orelha média, como selantes da janela oval, materiais para hemostasia, materiais de suporte para o enxerto e material de preenchimento da cavidade timpânica ou canal auditivo externo. Nas cirurgias de miringoplastia e timpanomastoidectomia, os materiais de suporte e preenchimento são os mais usados.

A MT quando sofre alguma lesão torna-se espessada, principalmente, por deposição de colágeno<sup>12,54,55</sup>. No presente estudo, na comparação da resposta da MT ao GF e ao BP, foi observado, tanto no tempo T1 quanto no tempo T2 do experimento, que nenhum dos biomateriais provocou um espessamento importante da MT.

A MT é formada por três camadas, e sua camada mais interna é contígua com a mucosa da bula timpânica, sofrendo inclusive as mesmas lesões e com resposta inflamatória semelhante. Mayer et al.<sup>12</sup> observaram um espessamento importante da MT após inoculação do BP através de uma perfuração timpânica. Os autores<sup>12</sup> observaram que este achado resultou não apenas da presença do material mas da própria manipulação da MT e concluíram que a metodologia para colocação do material na cirurgia experimental da bula timpânica pode influenciar nos resultados. Por isso, este estudo utilizou a via retrobular, já descrita por outros autores<sup>4</sup>, o que minimizou o dano à MT.

O espessamento da mucosa do ouvido médio, em resposta a injúria, é devido ao edema, densidade do infiltrado inflamatório, proliferação vascular e deposição de colágeno<sup>12,54,55</sup>. Houve espessamento subepitelial da mucosa da bula timpânica na presença de ambos os materiais. Na tabela 5 observa-se, que no início do experimento o espessamento da mucosa foi semelhante entre os grupos. Mas na tabela 6, apesar de não haver diferença estatística, o grupo do GF, no tempo T2, apresentou o maior percentual de espessamento moderado/intenso da mucosa (81,8%). A tendência do espessamento da mucosa secundário ao GF apresentar-se mais intenso, era esperado, visto que outros estudos experimentais demonstraram esse comportamento. Dogru et al.<sup>4</sup> relataram espessamento subepitelial mais intenso, com diferença estatisticamente significativa, entre o GF e outros dois materiais. Krupala et al.<sup>29</sup> usaram como parâmetro a presença ou não do espessamento da mucosa, sem

classificação gradativa. Esse autores<sup>29</sup> encontraram espessamento com inflamação da mucosa em 9 de 10 animais em que foi utilizado GF como material de suporte. Jang et al.<sup>41</sup> encontraram espessamento da mucosa importante na comparação do GF com o material Interceed®. Neste estudo, os achados histológicos evidenciaram aderências e espessamento da mucosa em 7 de 10 orelhas com GF<sup>41</sup>. Bahadir et al.<sup>57</sup> encontraram espessamento moderado da mucosa ao inocular GF em ratos, após 8 semanas de observação. Quando houve escarificação da mucosa em contato com o GF, os autores encontraram um espessamento da mucosa muito mais importante, em 6 ratos de grau moderado e em 4 de grau intenso, do total de 10 ratos<sup>57</sup>.

O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os casos, mas houve diferença quanto a celularidade do processo. Nas orelhas preenchidas pelo BP houve maior reação inflamatória com presença de infiltrado tanto LMN quanto PMN, com frequentes neutrófilos sinalizando um processo crônico ativo. Esse tipo de reação inflamatória foi constatado e categorizado nas tabelas 1 e 3. O infiltrado PMN estava circundando a esponja do BP e o infiltrado LMN na mucosa subjacente.

O GF provocou um aumento dos linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Nas tabelas 2 e 4, podemos constatar que o infiltrado LMN correspondeu a maioria dos casos, caracterizando uma reação inflamatória crônica. O exsudato PMN estava ausente ou leve nas bulas com GF, com diferença estatisticamente significativa entre os biomateriais, como pode ser visto nas tabelas 5 e 6.

Além do tipo celular do infiltrado, a intensidade do exsudato também foi diferente entre os grupos. Na tabela 5 observa-se que 85,7% do exsudato do BP foi considerado moderado a intenso no tempo T1, ao contrário do GF que provocou reação inflamatória leve ou ausente na maioria dos casos. Na análise do comportamento da mucosa ao longo do tempo, na tabela 6, nota-se que mesmo após 3 meses de cirurgia, na grande maioria dos casos, o BP manteve uma resposta inflamatória moderada a intensa. Nessa mesma tabela, observa-se que o GF provocou uma resposta leve. A diferença de celularidade e intensidade do exsudato entre os grupos já é perceptível no tempo T1, mas torna-se estatisticamente significativa no tempo T2, pois nesse segundo momento, a reação inflamatória provocada pelo GF começa a resolver-se, enquanto àquela do BP permanece.

Nas tabelas 7 e 8, compara-se as alterações na mucosa da bula timpânica para cada material, entre os tempos do experimento. Não houve diferença estatística dos resultados. O grupo do BP permaneceu com a reação mais intensa e o grupo do GF com a reação mais leve.

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. 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<sup>56</sup>. 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<sup>56</sup>. O exsudato crônico leve encontrado como resposta ao contato da bula com o GF mostra uma reação insidiosa, com tendência de resolução por meio da fibrose. Por outro lado, o exsudato neutrofílico, intenso, que permeia o BP, provavelmente, revela uma incapacidade de resolução do processo.

Outros estudos também apontam para uma resposta inflamatória importante do BP. Em forma de membrana, na bula timpânica de ratos, ele provocou exsudato com LMN e PMN, classificado como moderado a intenso, em 33,3% dos casos<sup>12</sup>. Como substituto vascular, o BP induziu reação inflamatória com presença de neutrófilos, linfócitos e fibrose, tanto nos enxertos venosos quanto arteriais<sup>10,53</sup>. No presente estudo, havia infiltrado inflamatório principalmente no permeio da esponja; na região da bula, contra-lateral ao BP, não havia exsudato. Era um exsudato intenso, mas localizado. Resta-nos compreender até que ponto essa reação inflamatória ativa e persistente pode prejudicar a ventilação e cicatrização da bula timpânica.

Mayer et al.<sup>12</sup> através de estudo histomorfométrico, demonstraram que a espessura da mucosa e o exsudato PMN e LMN inicial, diminuem após 12 semanas. Na sua análise descritiva, ao final, há uma redução de volume e encistamento da membrana do BP. Aparentemente, a forma esponjosa desse material deveria ter sido invadida e degradada pelas células inflamatórias de uma maneira mais fácil e com menor reação na submucosa, mas não foi isso que aconteceu. Talvez se houvesse um terceiro grupo experimental, com observação do fenômeno até 12 semanas ou mais, poderia ser observada alguma resolução do processo.

A degradação do BP apresentou-se mais lenta que a do GF, o que também contribuiu para a permanência do estímulo imunológico. A composição química do BP foi definida como um polissacarídeo celulósico, composto por diferentes bases monoméricas, a saber: glicose 87, 57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glucurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, fucose 0,01%, ramnose 0,01%<sup>7</sup>. Apesar de, teoricamente, todos esses elementos serem facilmente degradados no organismo, nos experimentos *in vivo*,

a reação inflamatória intensa e a visualização da esponja do BP após 3 meses da cirurgia apontam para uma certa dificuldade, não observada na esponja derivada da derme do porco. Uma possibilidade seria a origem vegetal do BP, em contraste com a origem animal do GF. Ou mesmo uma dificuldade imunológica da espécie roedora. A permanência do BP no organismo pode ter aplicabilidade em outras situações, ou mesmo tornar-se um material de suporte não absorvível. Outros estudos biomoleculares podem ser realizados no futuro para avaliar melhor esse comportamento.

Apesar da presença do exsudato inflamatório persistente, a esponja do BP parece não induzir o processo de neovascularização e fibrose na mesma proporção que a esponja de GF. Na tabela 6 observa-se que a neovascularização foi ausente ou leve em 86,7% nas bulas com BP e mostrou-se moderada a intensa em 72,7% no grupo do GF, com diferença estatisticamente significativa. A neovascularização é a proliferação do endotélio na presença de um estímulo inflamatório<sup>56</sup>. A reação imunológica provocada pelo GF permitiu a dilatação dos vasos com formação de novas tramas vasculares, que provavelmente, apontam para uma organização do processo inflamatório. Essa neovascularização intensa nas orelhas com GF, pode estar relacionada a uma maior taxa de fibrose em um tempo tardio. Afinal, na literatura, há maior tendência de fibrose na orelha média exposta ao GF.

A organização da inflamação em fibrose é melhor observada a longo prazo. No tempo T2, na tabela 6, observamos 63,6% de fibrose intensa com GF contra 40% com BP. Não houve diferença estatística significativa. Na tabela 4 pode-se observar que a fibrose foi mais frequente com o GF. Nos resultados descritivos foram evidenciadas traves de fibrose que atravessavam a cavidade da bula timpânica, e não apenas fibrose na submucosa.

O resultado deste estudo é compatível com a literatura. Lipan et al.<sup>54</sup> observaram densas fibras de colágeno na submucosa, que segundo os autores, fizeram parte do processo de neoformação óssea das bulas timpânicas estudadas, em contato com GF. Estudos com a esponja de gelatina absorvível, encontram proporções com quase 90% dos casos com fibrose moderada a intensa<sup>4,5,32,41,58</sup>. Em outros trabalhos chega-se a 60% de observação de fibrose, como também, há alguns, que só observam essa alteração em 20% dos casos<sup>3,29,57</sup>.

A capacidade de causar fibrose endotelial faz com que o GF seja amplamente utilizado como micropartícula para embolização em procedimentos de Hemodinâmica<sup>44</sup>. Contudo, a fibrose é indesejada na cirurgia da orelha média. Para um bom funcionamento, a cavidade timpânica deve estar bem aerada e os ossículos livres para vibrarem. O surgimento de aderências, fibrose da mucosa ou a presença de exsudato crônico prejudica a transmissão

sonora e pode causar infecção secundária ou retração do neotímpano. O biomaterial ideal não deveria provocar reação inflamatória que resultasse no aumento do tecido conectivo.

A esponja de BP não causou aderências ou fibrose importante, contudo houve exsudato inflamatório que poderia comprometer a cicatrização na cirurgia otológica. É sabido, que não há, até os dias de hoje, relato de biomaterial ideal para uso em contato com a mucosa da orelha média, já que a mesma é muito responsiva a qualquer estímulo<sup>2,6</sup>. Assim, alguns autores questionam a forma de usar o material de suporte ou preenchimento.

A resposta inflamatória da mucosa da orelha média pode ser influenciada pela quantidade do material empregado e a preservação da mucosa parecem influenciar a resposta inflamatória e o resultado final da cirurgia, tanto quanto o material usado<sup>2</sup>. As lesões extensas da mucosa da orelha média (mucosa desnuda) provocam maior inflamação e fibrose. Ao comparar a mucosa da bula timpânica intacta e a mucosa escarificada em contato com GF, Bahadir et al.<sup>57</sup> relatam fibrose leve a moderada com leve proliferação vascular no primeiro grupo, enquanto no outro grupo, houve neovascularização e fibrose intensa com aumento da atividade fibroblástica. Um modelo experimental que utilizou porquinhos-da-índia, tentou mimetizar o trauma cirúrgico com uma escarificação pontual na mucosa da bula timpânica. No local do trauma, houve exsudato inflamatório inicial, mas após 6 semanas, foi observada metaplasia epitelial. Os autores comentam que a intervenção cirúrgica por si só pode provocar alterações da mucosa, independente do material empregado<sup>54</sup>.

Desta forma, alguns autores testam o uso de artifícios, como por exemplo uma membrana de Gelfilm® ou uma membrana de celulose (Interceed) entre a mucosa e o GF para diminuir a fibrose<sup>41,58</sup>. Em estudos experimentais, autores relatam que o uso de gotas de corticóide no transoperatório parece favorecer um melhor resultado<sup>57</sup>. Um trabalho experimental comparou o GF em contato com a mucosa escarificada associada ou não ao uso de gotas de corticóide tópico<sup>57</sup>. Nas bulas em que se usou corticóide tópico houve diminuição na intensidade da reação inflamatória<sup>57</sup>. Laurent e cols. também levantaram a possibilidade de usar-se o GF embebido em AH para reduzir a fibrose<sup>26</sup>.

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

de suporte que possa ser utilizado dentro da orelha média, em contato direto com a mucosa. Contudo, é possível que essa esponja possa ser utilizada em contato com a face epidérmica da MT e com a pele do CAE, como material de preenchimento na técnica *overlay*. Nessa técnica de timpanoplastia, o enxerto fica lateral ao remanescente timpânico e faz-se necessário um material de suporte no CAE. Um estudo experimental anterior não evidenciou reação inflamatória importante do BP em contato com a face lateral da MT<sup>11</sup>. Outra possibilidade seria sua utilização, como um material não-absorvível, que pode ser removido em um segundo tempo cirúrgico. Estudos posteriores poderão elucidar se o comportamento aqui descrito do biopolímero da cana-de-açúcar pode ser favorável nas diferentes técnicas da cirurgia otológica.

## 7 CONCLUSÃO

A esponja do Biopolímero da cana-de-açúcar provocou reação inflamatória com exsudato mais intenso quando comparada a esponja de gelatina absorvível. Houve maior evidência de neovascularização e tendência a fibrose nos ouvidos com a esponja de gelatina absorvível que naqueles com a esponja do Biopolímero da cana-de-açúcar. A principal contribuição deste estudo foi a descrição da dificuldade de absorção do biopolímero, mesmo em forma de esponja, e o exsudato persistente encontrado na luz da bula timpânica. O presente experimento evidenciou que a esponja do BP não apresentou as características necessárias para o uso como material de suporte dentro da bula timpânica, em contato direto com a mucosa.

## REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Shen Y, Teh BM, Friedland PL, Eikelboom RH, Atlas MD. To pack or not to pack? A contemporary review of middle ear packing agents. *Laryngoscope*. 2011; 121(5):1040–8.
3. 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(4):454–7.
4. Dogru S, Haholu A, Gungor A, Kucukodaci Z, Cincik H, Ozdemir T, et al. Histologic analysis of the effects of three different support materials within rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 140(2):177–82.
5. Hellström S, Salén B, Stenfors LE. Absorbable gelatin sponge (Gelfoam) in otosurgery: one cause of undesirable postoperative results? *Acta Otolaryngol*. 1983; 96(3-4):269–75.
6. Tonnaer ELGM, Ingels KJAO, Rijkers GT, Curfs JHAJ. Antigenic as well as nonantigenic stimuli induce similar middle ear responses in the rat. *Laryngoscope*. 2003; 113(2):322–7.
7. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LLMV, Medeiros V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2000; 42(4):375–83.
8. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-áçúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras*. 2002; 17(Suppl 1):11–3.
9. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória a 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(1):37–40.
10. Aguiar JLA, Lins EM, Marques SRB, Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV. Sugarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. *Acta Cir Bras*. 2007; 22(Suppl 1):77–81.
11. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2006; 51(1):45–51.

12. Mayer DLB, Araújo JG, Leal MC, Caldas Neto SS, Ataíde RF, Mello RJV. Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(1):44–50.
13. Zollner F. The prognosis of the operative improvement of hearing in chronic middle ear infections. *Ann Otolaryngol*. 1957; 66(4):907–17.
14. Wullstein H. The restoration of the function of the middle ear, in chronic otitis media. *Ann Otolaryngol*. 1956; 65(4):1021–41.
15. Biedlingmaier JF, Samaranayake R, Whelan P. Resistance to biofilm formation on otologic implant materials. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118(4):444–51.
16. Sato T, Kawase T, Yano H, Suetake M, Kobayashi T. Trans-tympanic silicone plug insertion for chronic patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngol*. 2005; 125(11):1158–63.
17. Courteney-Harris RG, Ford GR, Ganiwalla TM, Mangat KS. Closure of tympanic membrane perforation after the removal of Goode-type tympanostomy tubes: the use of silastic sheeting. *J Laryngol Otol*. 1992; 106(11):960–2.
18. Akin WO, Tobin HA. Silicone rubber stent. An improved form of ear packing. *Arch Otolaryngol*. 1974; 99(6):462–3.
19. Saberman MN. Letter: Silicone rubber stent. *Arch Otolaryngol*. 1974; 100(6):481.
20. Ng M, Linthicum FH. Long-term effects of Silastic sheeting in the middle ear. *Laryngoscope*. 1992; 102(10):1097–102.
21. Kazama K, Takahashi H, Kaieda S, Iwanaga T, Yamamoto-Fukuda T, Yoshida H, et al. Effect of a large-sized silicone sheet upon recovery of mastoid aeration after mastoidectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 138(6):738–42.
22. Blevins NH. Transfacial recess ossicular reconstruction: technique and early results. *Otol Neurotol*. 2004; 25(3):236–41.
23. Elmorsy SM, Amer HE. Insertion of middle-ear Silastic sheeting during tympanoplasty: hearing outcomes. *J Laryngol Otol*. 2011; 125(5):445–8.
24. Vincent R, Rovers M, Mistry N, Oates J, Sperling N, Grolman W. Ossiculoplasty in intact stapes and malleus patients: a comparison of PORPs versus TORPs with malleus relocation and Silastic banding techniques. *Otol Neurotol*. 2011; 32(4):616–25.
25. Laurent C, Hellström S, Fellenius E. Hyaluronan improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. A comparison of preparations with different rheologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 114(12):1435–41.

26. Laurent C, Hellström S, Stenfors LE. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study. *Am J Otolaryngol*. 1986; 7(3):181–6.
27. Angeli S, Connell S, Gibson B, Ozdek A, McElveen JT, Van De Water TR. Injectable form of cross-linked hyaluronan is effective for middle ear wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007; 116(9):667–73.
28. Martini A, Morra B, Aimoni C, Radice M. Use of a hyaluronan-based biomembrane in the treatment of chronic cholesteatomatous otitis media. *Am J Otol*. 2000; 21(4):468–73.
29. Krupala JL, Gianoli GJ, Smith RA. The efficacy of hyaluronic acid foam as a middle ear packing agent in experimental tympanoplasty. *Am J Otol*. 1998; 19(5):546–50.
30. Li G, Feghali JG, Dinces E, McElveen J, van de Water TR. Evaluation of esterified hyaluronic acid as middle ear-packing material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 127(5):534–9.
31. Park AH, Jackson A, Hunter L, McGill L, Simonsen SE, Alder SC, et al. Cross-linked hydrogels for middle ear packing. *Otol Neurotol*. 2001; 27(8):1170–5.
32. Huang G, Chen X, Jiang H. Effects of NasoPore packing in the middle ear cavity of the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011; 145(1):131–6.
33. Blaine G. Absorbable gelatin sponge in experimental surgery. *Lancet*. 1951; 2(6680):427–9.
34. Booth JB. Tympanoplasty. Factors affecting results as determined by audiometry and acoustic impedance measurements. *J Laryngol Otol*. 1974; 88(7):625–40.
35. Donald PJ, Baker SR. Hearing results following atticotomy. *Laryngoscope*. 1979; 89(2 Pt 1):195–203.
36. Doyle-Kelly W. Behaviour of absorbable gelatine sponge in the animal middle ear. *J Laryngol Otol*. 1961; 75:152–66.
37. Schuknecht HF. Sensorineural hearing loss following stapedectomy. *Acta Otolaryngol*. 1962; 54: 336–40.
38. Niklasson A, Tano K. The Gelfoam® plug: an alternative treatment for small eardrum perforations. *Laryngoscope*. 2011; 121(4):782–4.
39. 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(1):10–8.

40. Ma Y, Zhao H, Zhou X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol.* 2002; 122(6):586–99.
41. Jang CH, Park H, Cho YB, Choi CH. The effect of Interceed for reducing adhesion as a middle ear packing agent: an experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008; 72(10):1517–21.
42. Baylancicek S, Serin GM, Ciprut A, Sari M, Akdaş F, Tutkun A. Ototoxic effect of topical ciclopirox as an antimycotic preparation. *Otol Neurotol.* 2008; 29(7):910–3.
43. Havenith S, Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Sedee RJ, Grolman W, et al. Spiral ganglion cell survival after round window membrane application of brain-derived neurotrophic factor using gelfoam as carrier. *Hear Res.* 2011; 272(1-2):168–77.
44. Loffroy R, Guiu B, Cercueil JP, Krausé D. Endovascular therapeutic embolisation: an overview of occluding agents and their effects on embolised tissues. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009; 7(2):250–63.
45. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Coutinho Netto J, Mrue F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2003; 69(7):649–55.
46. Souza LCA, Piza MRT, Coutinho Netto J, Ruiz DB, Schmidt VB. Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomias. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73(7):331–6.
47. Sousa LH, Ceneviva R, Coutinho Netto J, Mrué F, Sousa Filho LH, Castro e Silva OD. Morphologic evaluation of the use of a latex prosthesis in videolaparoscopic inguinoplasty. An experimental study in dogs. *Acta Cir.* 2011; 26(2):84–91.
48. Melo FAD, inventor; Melo FAD, depositante. Biopolímero produzido por materiais provenientes da cultura da cana-de-açúcar via microorganismo *Zooglea* sp. Para utilização nas áreas de química e bioquímica: fio cirúrgico e membranas biodegradáveis. Brasil patente PI9603700-8. 2001 Set 18
49. Castro CMMB, Andrade JL, Melo FAD, Silva WTF. Citotoxicidade do biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2004; 49(2):119–123.
50. Carvalho Junior AM, Santos MM, Barkokébas BB, Andrade Aguiar JL, Lima SVC, Dambros M. Characterization of the deposition of collagen fibers and lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. *Int Braz J Urol.* 2012; 38(4):544–51.
51. Albuquerque PCVC, Aguiar JLA, Santos SM, Pontes Filho N, Mello RJV, Costa MLCR, et al. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced

- in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(5):383–6.
52. Cordeiro-Barbosa FA, Aguiar JLA, Lira MMM, Pontes Filho NT, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arq Bras Oftalmol.* 2012; 75(4):267–72.
  53. De Barros-Marques SR, Marques-Lins E, de Albuquerque MCS, de Andrade-Aguiar JL. Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. *J Vasc Surg.* 2012; 55(2):517–21.
  54. Lipan MJ, Alava I, Abi-Hachem R, Vernon S, van de Water TR, Angeli, SI. Middle ear packing: comparison of materials in an animal model of mucosal trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011; 144(5):763–9.
  55. Melo AA, Caldas Neto SS, Leão FS, Campos AJC. Effect of intratympanic mitomycin C on the development of cholesteatoma and otitis media in rats. *J Laryngol Otol.* 2013; 127(4): 359–63.
  56. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins SL, Collins T, Kuman K, Cotran RS, editores. *Robbins: Patologia estrutural e funcional.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44–78.
  57. 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(1):19–23.
  58. 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(6):712–6.



Brazilian Journal of  
**OTORHINOLARYNGOLOGY**

www.bjorl.org



ORIGINAL ARTICLE

## Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats<sup>☆</sup>

Débora Lopes Bunzen Mayer<sup>a,\*</sup>, Nathalia Lins<sup>b</sup>, Mariana de Carvalho Leal<sup>a</sup>,  
Mariana Montenegro de Melo Lira<sup>c</sup>, Silvio da Silva Caldas Neto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Otorhinolaryngology Service, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Centre of Experimental Research, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pathology, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

Received 15 October 2013; accepted 14 January 2014

### KEYWORDS

Biocompatible Materials  
Otologic Surgical Procedures  
Gelatine Sponge, Absorbable  
Biopolymers

### Abstract

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

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

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

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

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

### PALAVRAS-CHAVE

Espanja de gelatina  
absorvível  
Materiais biocompatíveis  
Biopolímeros  
Timpanoplastia

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

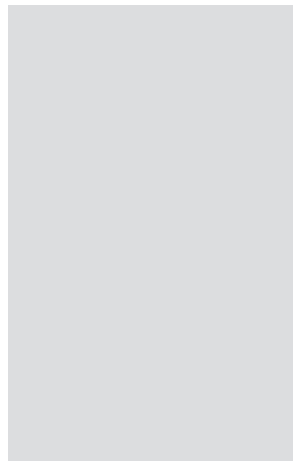
### Resumo

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

<sup>☆</sup>Please cite this article as: Mayer DLB, Lins N, Leal MC, Lira MMM, Caldas Neto SS. Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:xxx-xx.

\* Corresponding author.

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



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

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

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

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

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

## Introduction

Tympanoplasty and tympanomastoidectomy are common otologic surgical procedures in ENT practices. In most of the techniques used, besides the graft material for tympanic membrane (TM) perforation closure, it is necessary to use a supporting or packing material in the cavity of the middle ear. The support material must be safe for the patient, biocompatible and should not cause any mucosal reaction, which could compromise middle ear ventilation.<sup>1</sup> Ideally it should be conformable to the tympanic cavity and maintain the graft stability long enough for healing.<sup>1</sup> After healing, the material may or may not be absorbed by the body.

Several types of support materials may be used in tympanoplasty and tympanomastoidectomy procedures. There are nonabsorbable materials (such as silicone) that require revision surgery to be removed. Absorbable materials can be manufactured from hyaluronic acid, synthetic materials, alternative materials (plants) or gelatine. Worldwide, the material most commonly used to provide stability to the tympanic graft is a hemostatic absorbable gelatine sponge, derived from pig dermis. However, studies in the medical literature challenge their use in otology. Significant submucosal fibrosis of the middle ear of rats was found in contact areas with this hemostatic sponge.<sup>2</sup> One study compared three substances: Nasopore® (polyurethane membrane), Sepragel® (hyaluronic acid polymer) and Gelfoam® (hemostatic absorbable sponge) that were inoculated into the tympanic bullae of rats. After 3 days, an increased inflammatory reaction was noted in the Gelfoam® group, compared to the other groups; and after 20 days there was a greater degree of subepithelial thickening and fibrosis in this group.<sup>3</sup>

The middle ear mucosa is very reactive. Tonnaer et al. inoculated various substances (bacteria, hemocyanin, charcoal or saline) in the tympanic bulla of rats by a transtympanic route.<sup>4</sup> The authors concluded that they could provoke an acute otitis media with any of the tested substances (except saline) by contact of the substance with the middle ear mucosa.<sup>4</sup> The difficulty in finding a biocompatible material that would cause minimal damage to mucosa has stimulated the search for new biomaterials.

The sugarcane biopolymer is a macromolecule produced by the bacterium *Zoogloea* sp. when this organism is grown in a culture medium rich in molasses from sugarcane.<sup>5</sup> It has been shown to be biocompatible in membranous form in several studies conducted in different sites.<sup>6</sup> Silva et al.<sup>7</sup> conducted an experimental study using the biopolymer as a tympanic graft fixed on the external surface of TM perforation, and noted the closure of the tympanic perforation in most cases. Mayer et al.<sup>8</sup> studied the inflammatory reaction of the sugarcane biopolymer membrane in the middle ear of rats. These authors noted the presence of exudate and mucosal thickening that regressed over time.

One form of the sugarcane biopolymer is a non-porous laminar sheet that was experimentally evaluated to replace or fix in place the graft in TM perforation repair procedures. Another form is a sugarcane biopolymer sponge that is porous and dense. In contact with water, this biomaterial expands only slightly and becomes crumbly over time. This type of material could be used as support for the graft or even as packing material for the tympanic cavity and ear canal. The present study aims to evaluate the inflammatory reaction of the sponge form of the sugarcane biopolymer when it contacts the middle ear mucosa, and to compare it with that of absorbable gelatine sponge, marketed as Gelfoam®. The early inflammatory response will be analyzed through the characterization of the exudate and submucosal edema. The delayed inflammatory response will also be assessed by evaluating for neoangiogenesis and fibrosis, as well as any chronic exudate.

## Materials and methods

In the present study, 30 healthy Wistar female albino rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 211–290 g (mean 247.25 g), about four months old, were used. We excluded from the study any rat with an abnormality of the middle ear or the tympanic membrane (perforation or extensive myringosclerosis).

The selected animals were operated and followed-up at

the Center of Experimental Surgery. The animals were kept in a vivarium with constantly controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) in collective cages with sawdust in its floor with five animals before the experiment, and in individual cages after the experiment. The animals were under illumination for 12 hours/day. The rats were fed *ad libitum* with industrialized ration (Labina®).

### Study model

This is a prospective, controlled, analytical, experimental study.

### Procedures

For the procedure, the rats underwent general anesthesia, using ketamine chlorydrate (5 mg/100 g body weight) IM, xylazine chlorydrate (2 mg/100 g body weight) IM, and atropine (0.16 ml/100 g body weight) SC. Antibiotic prophylaxis was administered with cephalothin (1.3 mg/100 g body weight) IM.

Arbitrarily, all right ears were allocated to the sugarcane sponge biopolymer (BP) group, and all left ears of the same rats formed the absorbable gelatine sponge, Gelfoam® (GF) group.

All animals underwent otomicroscopy with a surgical microscope (MC-M31 column microscope, DF Vasconcelos®). After otomicroscopy with magnification  $\times 10$ , the included rats underwent ear surgery.

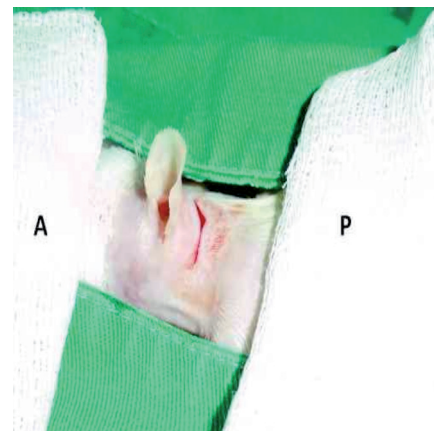
### Ear surgery

The surgical procedure was performed on a surgical table with complete asepsis and antiseptic precautions. After anesthesia and shaving the retroauricular and cervical regions, a ventrolateral 2 cm incision was performed with a #15scalpel blade 0.5 cm from the external ear orifice (Fig. 1). Then, the muscle plane was retracted to avoid unnecessary trauma, thus allowing the visualization of the tendon of insertion of the digastric muscle at the base of the skull. In this position, the posterior portion of the tympanic bulla is deeply located (Fig. 2). After the retroauricular exposure, the tympanic bulla was perforated gently with the tip of a needle  $40 \times 1.20$  mm. Then, with the alligator forceps, the corresponding material was introduced. In the same rat, the biopolymer was placed on the right side, and Gelfoam® on the left side. The size of the biomaterials was standardized (5 mm long  $\times$  1 mm thick, Fig. 3). After the introduction of the biomaterials, the muscle layer was repositioned, and the skin was sutured with 4-0 nylon. All surgery procedures were performed by the same investigator to avoid variations in technique. After 15 days, the rat skin naturally expels the suture, obviating the need to remove it.

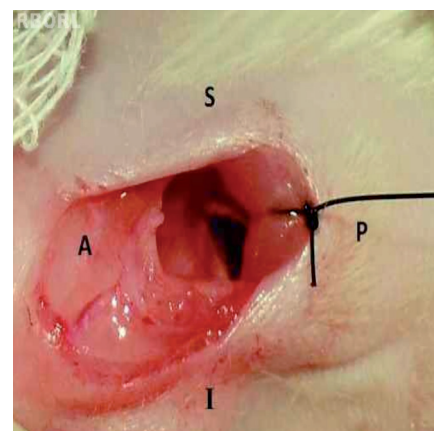
The operated rats were subdivided in two subgroups by random allotment: T1 time - rats sacrificed at 4 weeks, and T2 time - rats sacrificed 12 weeks after surgery. At these time intervals the animals were euthanized painlessly by intraperitoneal administration of sodium thiopental followed by a lethal dose of barbiturate by intracardiac injection. After euthanasia, their tympanic bullae were removed for study.



**Figure 1** Materials studied. GF, Gelfoam (absorbable gelatine sponge); BP, sponge of sugarcane biopolymer.



**Figure 2** Wistar rat in lateral decubitus. Surgical incision in the retroauricular region of the left ear. A, anterior; P, posterior.



**Figure 3** Exposure of the location of the tympanic bulla, deep to the cervical muscles on the left side of the rat. A, anterior; P, posterior; S, superior; I, inferior.

## **Preparation and histological analysis**

The tympanic bullae were isolated and prepared for histological study. The fixation was performed in 10% buffered formalin and decalcification in 5% nitric acid for 24 hours. In order to improve fixation, a 2-mm hole was made in the posterior part of the tympanic bulla for introduction of the buffered formalin. The material was dehydrated in an increasing ethanol series of 70%, 80%, 90% and 100%, one hour each, and then subjected to a diaphanization process in xylene, and finally embedded in paraffin. With the specimens already embedded in blocks of paraffin, 5- $\mu$ m slices were obtained in a microtome (Spencer AO) with a 50-micron interval. The slices were made in a transverse plane to the MT.

Then the material was stained with haematoxylin-eosin (HE). After the processing of all slides, we selected those whose section was situated at the level of the end of the malleus handle, corresponding to mesotympanum, and whose section was situated at the level of the long process of the incus, corresponding to epitympanum. The selected sections were subjected to qualitative analysis by an experienced pathologist. In the analysis, the morphology of the mucosa and MT of the bullae, type and intensity of the inflammatory reaction, presence of fibrosis, and behavior of biopolymer, compared to Gelfoam, were observed.

The description of histological findings was subdivided according to the following parameters: TM or mucosal thickness, cell type in the inflammatory infiltrate, and submucosal neovascularization and fibrosis.

The TM thickness was rated as absent, mild, moderate or severe. The intensity of inflammation was described based on the observation of exudate cellularity and extent of the process through the tympanic bulla cavity. The intensity of the inflammatory activity was rated as follows: null - absence of inflammatory signals; mild - exudate with little cell infiltration, with a reaction involving up to 1/3 of the tympanic bulla lumen (epitympanum or mesotympanum); moderate - exudate with moderate cell infiltration, with a reaction involving between 1/3 and 2/3 of the bulla lumen (epitympanum and mesotympanum); intense - exudate with extensive cell infiltration, with a reaction involving more than 2/3 of the bulla accompanied by signs of necrosis.

The inflammatory infiltrate was also analyzed for cellularity. If there were more lymphocytes and plasma cells, it was rated as chronic and lymphomononuclear (LMN). If there was greater number of neutrophils, the infiltrate was rated as acute and polymorphonuclear (PMN). If there was as much LMN as PLM, it was considered as a subacute exudate.

Neovascularization occurs from pre-existing vessels. In a late phase of inflammation, there is vasodilatation and increased vascular permeability and degradation of the basement membrane with endothelial cell migration toward the angiogenic stimulus. The presence or absence of this behaviour of mucosal inflammation was evaluated.

Presence of fibrosis is also part of the late phase of inflammation, and was characterized by presence of fibroblasts and collagen deposition in the extracellular matrix. The subepithelial fibrosis in the bulla was rated

as mild, moderate or severe, depending on the extension of the process into the tympanic bulla.

In assessing the degree of absorption of the material into the tympanic bulla, we considered whether there was any sign of persistence of the material in the slides investigated.

## **Statistical analysis**

The data obtained were categorized and presented descriptively and analytically. All data were grouped into tables. In the comparative statistical analysis, we checked whether there were differences between biomaterials. We also compared data between T1 and T2 times for each group separately. The Fisher's exact test was used due to the small number of observations. Results whose descriptive levels (p values) were <0.05 were considered statistically significant. The statistical calculations were performed using SPSS software for Windows version 18.0 - Statistical Package for the Social Sciences.

## **Ethical considerations**

This study followed the principles governing the Code of Ethics and the experimental animal protection laws, according to the abiding principles in Brazil, especially Law No. 9,605 - art. 32, and Decree No. 3,179 - art. 17, dated September 21, 1999, which deal with the issue of using animals for scientific purposes. Furthermore, the study had full approval from the Ethics Committee for Animal Use, and was registered under protocol No. 23076.020776/2010-48, in agreement with the fact that the death of the animals used in this study is justified, because there are no alternative resources for the realization of our scientific procedure. The use of general anesthesia before any procedure aimed to avoid pain and reduce animal stress. During the experiment, the experimental animals were followed-up by veterinary officers of the Centre for Experimental Surgery.

## **Results**

Of the total of 30 rats in the study, 15 rats were randomly selected for T1, and 15 for T2 group. In the T1 group, two animals died due to anesthetic complications during surgery. Of the 13 operated rats, 6 were lost due to problems such as bilateral secondary infection or failure of the histotechnical processing. Of the 7 remaining rats, two had unilateral otitis (left side) and remained in the study. Thus, at the end of the first month of observation of the experiment, we obtained 7 right ears (BP group) and 5 left ears (GF group).

Among the 15 rats sacrificed at T2, two left ears were excluded due to secondary infection and two others due to the low quality of the histotechnical processing. Thus, in the GF group, 11 ears remained. The 36 ears studied were distributed as follows: T1 - 7 in BP group and 5 in GF group; T2 - 15 in BP group and 11 in GF group.

The description of the histological findings was subdivided according to the following parameters: TM and mucosal thickness, cell type in the inflammatory infiltrate, neovascularization and severity of the submucosal fibrosis. To characterize the sample studied, we present in tables 1 and 2 the absolute (N) and relative (percentage) frequencies of classes in each qualitative variable.

To compare the groups with respect to the histological findings, we applied the Fisher's exact test, due to the small number of observations. For the statistical analysis, the histological results rated as absent or mild were pooled and compared to the pooled outcome of the data rated as moderate or severe.

Tables 3 and 4 list the statistical analysis of the data. These tables show a comparison between the biomaterials.

There was no statistical difference between the analyzed parameters when comparing the results in T1 and T2 only for BP group, as well as when this comparison were performed in T1 and T2 for GF group.

Regarding the presence of the implant after 3 months of the experiment, BP was seen in all the tympanic bullae. GF was seen in only one tympanic bulla. Bone neoformation was observed in two bullae with GF and in three bullae with BP.

The fibrogenic response pattern was different between the two groups. In BP implants, fibrosis, when observed, was mild in most cases. On the other hand, some cases in the GF implants developed, fibrous adhesions, with the air spaces fully occupied. These adhesions were observed in this group both at one and three months after the surgery.

**Table 1** Histological findings in the tympanic bulla of rats after one month of the experiment (T1).

| Histological findings | Muc. Th.   | TM. Th.    | LMN        | PMN        | Neoangio   | Fibrosis   |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| BP (n = 7)            |            |            |            |            |            |            |
| Absent                | 1 (14.28%) | 3 (42.86%) | -          | -          | 1 (14.28%) | -          |
| Light                 | 3 (42.86%) | 4 (57.14%) | 1 (14.28%) | 1 (14.28%) | 6 (85.71%) | 5 (71.43%) |
| Moderate              | -          | -          | 4 (57.14%) | 3 (42.86%) | -          | 2 (28.57%) |
| Intense               | 3 (42.86%) | -          | 2 (28.57%) | 3 (42.86%) | -          | -          |
| GF (n = 5)            |            |            |            |            |            |            |
| Absent                | 2 (40.0%)  | 3 (60.0%)  | -          | 5 (100%)   | -          | -          |
| Light                 | 1 (20.0%)  | -          | 4 (80.0%)  | -          | 4 (80.0%)  | 1 (20.0%)  |
| Moderate              | 1 (20.0%)  | 1 (20.0%)  | 1 (20.0%)  | -          | 1 (20.0%)  | 3 (60.0%)  |
| Intense               | 1 (20.0%)  | 1 (20.0%)  | -          | -          | -          | 1 (20.0%)  |

BP, Biopolymer; GF, Gelfoam; Muc.Th., Mucosal thickening; TM.Th., Tympanic membrane thickening; LMN, Lymphomononuclear infiltrate; PMN, Polymorphonuclear infiltrate; Neoangio, Neoangiogenesis.

**Table 2** Histological findings in the tympanic bulla of rats after 3 months of the experiment (T2).

| Histological findings | Muc. Th.   | TM. Th.    | LMN        | PMN        | Neoangio   | Fibrosis   |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| BP (n = 15)           |            |            |            |            |            |            |
| Absent                | 1 (6.66%)  | 8 (53.33%) | -          | -          | 5 (33.33%) | 1 (6.66%)  |
| Light                 | 5 (33.33%) | 5 (33.33%) | -          | 1 (6.66%)  | 8 (53.33%) | 8 (53.33%) |
| Moderate              | 4 (26.66%) | 1 (6.66%)  | 12 (80.0%) | 6 (40.0%)  | 2 (13.33%) | 5 (33.33%) |
| Intense               | 5 (33.33%) | 1 (6.66%)  | 3 (20.0%)  | 8 (53.33%) | -          | 1 (6.66%)  |
| GF (n = 11)           |            |            |            |            |            |            |
| Absent                | 1 (9.09%)  | 5 (45.45%) | -          | 9 (81.81%) | -          | -          |
| Light                 | 1 (9.09%)  | 3 (27.27%) | 7 (63.63%) | 1 (9.09%)  | 3 (27.27%) | 4 (36.36%) |
| Moderate              | 3 (27.27%) | 3 (27.27%) | 4 (36.36%) | -          | 7 (63.63%) | 3 (27.27%) |
| Intense               | 6 (54.54%) | -          | -          | 1 (9.09%)  | 1 (9.09%)  | 4 (36.36%) |

BP, Biopolymer; GF, Gelfoam; Muc.Th., Mucosal thickening; TM.Th., Tympanic membrane thickening; LMN, Lymphomononuclear infiltrate; PMN, Polymorphonuclear infiltrate; Neoangio, Neoangiogenesis.

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

| Histological findings | Group - T1 |            | P value            |
|-----------------------|------------|------------|--------------------|
|                       | BP (n = 7) | GF (n = 5) |                    |
| Muc. Th.              |            |            |                    |
| Absent/Light          | 4 (57.1%)  | 3 (60.0%)  | > 0.999            |
| Moderate/Severe       | 3 (42.9%)  | 2 (40.0%)  |                    |
| TM. Th.               |            |            |                    |
| Absent/Light          | 7(100%)    | 3 (60.0%)  | 0.152              |
| Moderate/Severe       | 0(0%)      | 2 (40.0%)  |                    |
| LMN                   |            |            |                    |
| Absent/Light          | 1(14.3%)   | 4 (80.0%)  | 0.062              |
| Moderate/Severe       | 6 (85.7%)  | 1 (20.0%)  |                    |
| PMN                   |            |            |                    |
| Absent/Light          | 1(14.3%)   | 5 (100%)   | 0.015 <sup>a</sup> |
| Moderate/Severe       | 6 (85.7%)  | 0 (0%)     |                    |
| Neoangio              |            |            |                    |
| Absent/Light          | 7(100%)    | 4 (80.0%)  | 0.417              |
| Moderate/Severe       | 0 (0%)     | 1 (20.0%)  |                    |
| Fibrosis              |            |            |                    |
| Absent/Light          | 5 (71.4%)  | 1 (20.0%)  | 0.234              |
| Moderate/Severe       | 2(28.6%)   | 4 (80.0%)  |                    |

<sup>a</sup> Statistically significant (p < 0.05).

**Table 4** Comparison between groups of biomaterials in relation to histological findings in the tympanic bulla of rats after 3 months of experiment (T2).

| Histological findings | Group - T2  |             | P value            |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------------|
|                       | BP (n = 15) | GF (n = 11) |                    |
| Muc. Th.              |             |             |                    |
| Absent/Light          | 6 (40.0%)   | 2 (18.2%)   | 0.234              |
| Moderate/Severe       | 9 (60.0%)   | 9 (81.8%)   |                    |
| TM. Th.               |             |             |                    |
| Absent/Light          | 13 (86.7%)  | 8 (72.7%)   | 0.620              |
| Moderate/Severe       | 2 (13.3%)   | 3 (27.3%)   |                    |
| LMN                   |             |             |                    |
| Absent/Light          | 0(0%)       | 7 (63.6%)   | 0.001 <sup>a</sup> |
| Moderate/Severe       | 15 (100%)   | 4 (36.4%)   |                    |
| PMN                   |             |             |                    |
| Absent/Light          | 1 (6.7%)    | 10 (90.9%)  | 0.001 <sup>a</sup> |
| Moderate/Severe       | 14 (93.3%)  | 1 (9.1%)    |                    |
| Neoangio              |             |             |                    |
| Absent/Light          | 13 (86.7%)  | 3 (27.3%)   | 0.004 <sup>a</sup> |
| Moderate/Severe       | 2 (13.3%)   | 8 (72.7%)   |                    |
| Fibrosis              |             |             |                    |
| Absent/Light          | 9 (60.0%)   | 4 (36.4%)   | 0.234              |
| Moderate/Severe       | 6 (40.0%)   | 7 (63.6%)   |                    |

<sup>a</sup> Statistically significant (p < 0.05).

## Discussion

The use of biomaterials in otologic surgery is a common practice in otorhinolaryngology. After the introduction of packing materials into the tympanic cavity in the 50s by Zollner and Wullstein, the use of biomaterials became popular.<sup>9,10</sup> Depending on the indication and surgical technique proposed to the patient, materials were developed to be used as implants in the replacement of the ossicles of the middle ear, oval window sealants, hemostasis materials, ventilation tubes, support materials for graft and packing material for tympanic cavity or external ear canal.<sup>1</sup> The support and packing materials are indicated in most tympanoplasty and mastoidectomy procedures.

Currently, Gelfoam® is the absorbable biomaterial most used in otologic surgery. Initially this sponge was used as a hemostatic agent in neurosurgery. The expandability of the material in contact with fluid and its absorption by the body in the medium term resulted in Gelfoam being used to occupy space in various surgical areas. In 1951, Blaine<sup>11</sup> described its use not only as a hemostatic agent, but also as a replacement of destroyed tissues. Since the 50s, Gelfoam® has been used in various otologic operations, but, since the 1960s, some studies noted deleterious effects on the middle ear. Schuknecht<sup>12,13</sup> in two reports, documented the occurrence of hearing loss after stapedectomy surgery and concluded that this failure was secondary to the use of Gelfoam® in the oval window.

The middle ear mucosa and MT, when in contact with some harmful material, suffer subepithelial oedema and hyperplasia, evidenced by histological thickening. In the present study, we observed, both in T1 and T2 of our experiment, that none of the biomaterials tested caused a significant MT thickening. Laurent et al.<sup>14</sup> also observed no changes in MT in experimental surgeries using GF.

The tympanic membrane is composed of three layers, and its innermost layer is contiguous with the tympanic bulla mucosa, being subject to the same injuries and with a similar inflammatory response. Mayer et al.<sup>8</sup> observed a significant MT thickening after inoculation of material through a perforated eardrum. The authors noted that this finding resulted not only from the presence of the material, but also from the handling of MT itself, and concluded that the methodology for application of the material in the experimental surgery of the tympanic bulla may influence the results.<sup>8</sup> Therefore, our study used the retrobullar route, already described by other authors, which causes no damage to MT.

In our study, although not statistically different, the GF group in T2 had the highest percentage of severe mucosal thickening in the tympanic bulla (81.85%). This trend for a more intense mucosal thickening secondary to GF use was expected, since other experimental studies have reported it previously. Krupala et al.<sup>15</sup> found a thickening with mucosal inflammation in 9 of 10 animals in which GF was used as support material. Jang et al.<sup>16</sup> found significant mucosal thickening, when compared GF versus Interceed®. In their

study, the authors performed myringotomy procedures with scarification of the mucosa before the procedure; and after 3 weeks, the histological findings revealed adhesions and mucosal thickening in 7 of 10 ears with the use of GF.<sup>16</sup> After eight weeks of observation, Bahadir et al.<sup>17</sup> found moderate mucosal thickening in rats treated with inoculation of Gel-foam per transtympanic route. When a scarification of the mucosa in contact with the GF was performed, the authors found a much more exuberant mucosal thickening; 6 rats exhibited a moderate, and 4 a severe, grade of thickening in a total of 10 animals.<sup>16</sup>

An inflammatory infiltrate was present in all cases, but with a difference regarding to the cellularity of the process. In ears packed with BP, a greater inflammatory reaction was noted, with the presence of both polymorphonuclear (PMN) and lymphocytic (LMN) infiltration. The PMN infiltrate was present around the BP sponge, and the LMN infiltrate in the underlying mucosa. On the other hand, in the ears packed with GF, the LMN infiltrate represented most cases and there was no PNM exudate, with a statistically significant difference between biomaterials.

The amount of exudate was also significantly different between groups, since 85.7% of the BP exudate were considered of moderate to severe at the beginning of the experiment, unlike GF, which caused mild or absent inflammatory reaction in most cases. The inflammatory reaction caused by BP sponge remained different from GF throughout the experiment. In T2, table 4 shows that in most cases BP maintained a moderate to intense inflammatory response, both in PMN as in LMN exudate, while the group of ears treated with PG showed mild or no reaction, with statistically significant difference. There was no change in inflammatory intensity over time; BP group remained with the most intense reaction and GF group with the lightest reaction.

In other studies, BP also induced an important inflammatory response. In the form of the membrane used in the tympanic bulla of rats, BP led to the formation of a sub-acute exudate, rated as moderate to severe in 33.3% of cases.<sup>8</sup> As vascular replacement, BP induced inflammatory reaction with the presence of neutrophils, lymphocytes, and fibrosis.<sup>18</sup> In subaponeurotic tissue, BP was tested as a pubovaginal sling.<sup>19</sup> Severe inflammatory reaction with the presence of PMN and giant cells around the biomaterial was reported.<sup>19</sup> In the present study, the inflammatory infiltrate proved important, especially in terms of permeating the sponge; in the bulla region, contralateral to BP, there was no exudate. Finally, it remains unknown to what extent this persistent inflammatory response may impair the ventilation and the scarring process of the tympanic bulla.

The degradation of BP was slower than GF's: this also contributed to the maintenance of the immune stimulus. The chemical composition of BP was defined as a cellulose polysaccharide composed of different monomeric bases, namely: glucose 87.57%, xylose 8.58%, ribose 1.68%, glucuronic acid 0.83%, mannose 0.82%, arabinose 0.37%, galactose 0.13%, fucose 0.01%, and rhamnose 0.01%.<sup>5</sup> Although, in theoretical terms, all these elements are easily degraded in the body, the persistence of an intense inflammatory reaction and the continued presence of BP sponge 3 months after surgery in *in vivo* experiments demonstrate a level of inflammatory response not observed in the sponge derived from pig dermis. One possibility could be that BP is of plant

origin, in contrast to the animal origin of GF, or perhaps there is some immunological difficulty of the rodent species. The persistence of BP in the body may have applicability in other situations; this product may become a non-absorbable support material. Future biomolecular studies could be performed to better assess this property.

Despite the presence of a persistent inflammatory exudate, the BP sponge does not seem to induce neovascularization and fibrosis in the same proportion as the GF sponge. Table 4 shows that neovascularization was absent or mild in 86.7% in the tympanic bullae with BP, but was moderate to severe in 72.7% in the GF group, a statistically significant difference. The neovascularization occurs as an endothelial proliferation in the presence of an inflammatory stimulus. The immune reaction caused by GF allowed the vessels to dilate with the formation of new vascular meshes, which probably point to an organization of the inflammatory process. This intense neovascularization in ears treated with GF may be related to a higher rate of fibrosis at a later time. After all, in our result and in the literature, there is a greater tendency to fibrosis in the middle ear exposed to GF.

In the descriptive results, we noted not only the sub-mucosal fibrosis of the GF group, but also trabeculae of fibrosis crossing the cavity of the tympanic bulla. In the 1980s, otologists in Sweden found adhesions with trabeculae of connective tissue in the middle ear in reoperations of tympanoplasty and in programmed revision mastoidectomy surgeries.<sup>20</sup> There was a suspicion that the hemostatic sponge used as support could be the cause of these changes. In experimental surgery with rats, Swedish researchers found tympanic membrane retraction with synechiae and fibrosis in the middle ear in the presence of Gelfoam after 2 months.<sup>20</sup> These authors also observed new bone formation and submucosal thickening in both the promontory and the hypotympanum after 3 months of experiment.<sup>20</sup> Hellstrom et al. concluded that Gelfoam® could be involved in the failure of some otologic surgeries.<sup>20</sup>

The presence of moderate or severe fibrosis in 80% and 63.6% in T1 and T2, respectively, is consistent with studies in the literature implanted GF. Rates as high as 90% of cases with moderate to severe fibrosis have been reported.<sup>3,16,20-22</sup> In other studies, 60% of the cases exhibited fibrosis, but there are also papers that noted this change in only 20% of cases with GF.<sup>2,15,17</sup>

Due to its ability to cause endothelial fibrosis, GF is widely used as microparticle for embolization in hemodynamic procedures.<sup>23</sup> However, the occurrence of fibrosis is unwanted in the middle ear surgery. To function properly, the tympanic cavity should be well aerated and with the ossicles free to vibrate. The occurrence of adhesions, mucosal fibrosis or the presence of chronic exudate affect the sound transmission and can cause secondary infection or neotympanum retraction. The ideal biomaterial should not cause inflammatory reaction which would result in an increase of connective tissue.

The BP sponge caused no significant fibrosis, but there was an inflammatory exudate which could compromise the healing process in otologic surgery. So far, an ideal biomaterial for use in contact with the mucosa of the middle ear has not been identified, since this region is hyperresponsive to any stimulus.<sup>1,4</sup> However, some authors question how to use the support or packing material. The amount of material used, the preservation of the mucosa and the use of steroid drops during surgery seem to favour a better outcome.<sup>17,24,25</sup>

BP is a polymer derived from sugarcane, a low cost and abundant biomass in Brazil, capable of changing its natural state to gel, membrane or sponge simply through physical phenomena, without need of adding chemically active products. BP is biocompatible in vitro; but more studies are needed to ensure a satisfactory end result in ear surgery.

## Conclusion

The sugarcane biopolymer sponge caused a more intense inflammatory reaction with exudate, compared to absorbable gelatine sponge. There was little neovascularization and mild fibrosis in the sugarcane biopolymer sponge group, compared to absorbable gelatine sponge group. Further studies may elucidate whether this behaviour of the sugarcane biopolymer may be useful in otologic operations.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

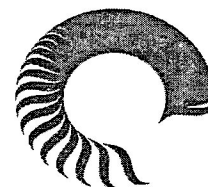
To Camila Sartechi, for his help in the statistical analysis of this study. To Adriana Amorim, Med. Vet., by her care for the experimental animals.

## References

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

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, 28 de julho de 2010.

Ofício nº 296/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof: Silvio da Costa Caldas**  
Departamento de Nutrição – CCB - UFPE  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.020776/2010-48

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***“Um novo material de suporte na cirurgia otológica: a esponja de biopolímero da cana-de-açúcar.”***

Concluímos 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 CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição,  
Animais: Ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar; sexo:  
Machos; Idade: adultos jovens; Nº de Animais : 36 (trinta e seis).

Atenciosamente,



Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA