



**Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**

ISSN: 1808-8694

revista@aborlccf.org.br

Associação Brasileira de  
Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-  
Facial  
Brasil

D'urso Panerari, Angelo; Olival Costa, Henrique; Coelho de Souza, Flavia; Castro, Marília; da Silva, Leonardo; Mesquita de Sousa Neto, Osmar

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

Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 74, núm. 4, julio-agosto, 2008, pp. 512-522

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial  
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392437850006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

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

Angelo D'urso Panerari<sup>1</sup>, Henrique Olival Costa<sup>2</sup>, Flavia Coelho de Souza<sup>3</sup>, Marília Castro<sup>4</sup>, Leonardo da Silva<sup>5</sup>, Osmar Mesquita de Sousa Neto<sup>6</sup>

## Tracheal inflammatory response to bacterial cellulose dressing after surgical scarification in rabbits

Palavras-chave: celulose, cicatrização, coelho, traquéia.  
Keywords: cellulose, healing, rabbit, trachea.

### Resumo / Summary

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

**E**xuberant scarring tissue formation is among the failure causes of tracheal stenosis surgery. Dressings that could avoid such reaction could be very helpful in these cases. Bacterial cellulose, produced by acetobacter xylinum can be useful in these cases. There are no studies in the laryngotraheal region. **Aim:** to assess subglottic tissue response in rabbits after scarification and placement of cellulose dressing, and comparing it to a control group. **Study design:** experimental. **Materials and Methods:** 26 rabbits underwent laryngotraheal scarification, received the dressing and were compared to the control group. We established four follow up periods. Laryngotraheal specimens underwent histological exam and the results were statistically assessed. **Results:** the study group had statistically similar results when compared to the control group in the following parameters: vascular congestion, purulent oozing, acute inflammation, epithelial integrity, fibrous proliferation and granulous proliferation. **Conclusion:** we did not observe differences between the study and control groups as far as inflammation and scarring are concerned. There were no inflammatory signs associated with the use of the cellulose membrane that did not occur because of surgery.

<sup>1</sup> Mestrando em ORL pela Santa Casa de São Paulo, Médico otorrinolaringologista, Maringá, Paraná.

<sup>2</sup> Otorrinolaringologista, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, Doutor em Otorrinolaringologia, Prof. Adjunto do Depto de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo, Coordenador do programa de Pós-Graduação em ORL da Santa Casa de São Paulo.

<sup>3</sup> Mestre pela Escola Paulista de Medicina, veterinário responsável pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês.

<sup>4</sup> Médica patologista, Patologista da Irmandade de Misericórdia da Santa Casa de São Paulo.

<sup>5</sup> Doutor em Otorrinolaringologia, Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

<sup>6</sup> Doutor em Otorrinolaringologia, Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Endereço para correspondência: Rua Dr. Cesário Mota Jr. 112 São Paulo SP 01221-021.

Fundação de apoio a pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 11 de junho de 2007. cod. 4592

Artigo aceito em 7 de janeiro de 2008.

## INTRODUÇÃO

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

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

Todas as técnicas têm um grau de sucesso e insucesso, entretanto, há evidências de que a formação de tecido de granulação exuberante sobre a área de tratamento seja um dos principais motivos dos insucessos por re-estenose<sup>7-12</sup>.

As principais maneiras de se evitar o crescimento deste tipo de tecido têm sido as prevenções de infecção, o uso de enxertos para a substituição do epitélio de revestimento e a colocação de moldes<sup>2</sup>.

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

A possibilidade de utilização de tecido que possa

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIAL E MÉTODO

### Seleção dos animais

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

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

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

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

### Detalhamento dos procedimentos

#### Seleção e tamanho da amostra

Os animais utilizados foram coelhos adultos de 4 meses de idade com peso que variava entre 1700 e 3250g. Apesar da grande variação do peso a luz laríngea era semelhante por se tratarem de animais adultos.

Para o grupo controle utilizamos 8 animais, dois para cada tempo de seguimento, e para o grupo de estudo utilizamos 16 animais, 4 para cada período de seguimento, além de dois animais para o tempo zero que foi considerado controle positivo da técnica de desepitelização.

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

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

#### Procedimento cirúrgico

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

Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica

em decúbito dorsal, sem a necessidade de assistência ventilatória.

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

A membrana cricotireóidea foi incisada na linha media, com bisturi de lâmina 15, permitindo a visualização da subglote. A cartilagem tireóidea e cricóidea aberta permitiram a exposição da luz laríngea e traqueal.

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

Realizada a exposição da luz laríngea e traqueal, realizamos a remoção com cureta até ocorrer a desepitelização evidenciada pela presença de sangramento, da mucosa de parte da porção posterior da subglote, estendendo por cerca de 1 cm na direção caudal e por cerca de 2mm nos dois sentidos laterais (Figura 1). Este método descrito por Branski et al. (2005) e Loewen et al. (2001)



FIGURA 1

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

atingiu mais de 50% de estenose em coelhos nas mãos dos autores.

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

a) fim do procedimento e alocação em grupo controle de desepitelização;

b) fim do procedimento e alocação em grupo de controle de cicatrização;

c) colocação de celulose bacteriana de acetobacter xylinum (Bionext®) e alocação em grupo de estudo de curativo de celulose.

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

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

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

### Grupos de seguimento

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

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

O grupo de estudo 1 foi aquele onde os animais tiveram uma semana de sobrevida e contou com 4 animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com 2 animais.

O grupo de estudo 2 foi aquele onde os animais tiveram um mês de sobrevida e contou com 4 animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com 2 animais.

O grupo de estudo 3 foi aquele onde os animais tiveram 3 meses de sobrevida e contou com 4 animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com 2 animais.

O grupo de estudo 4 foi aquele onde os animais tiveram 6 meses de sobrevida e contou com 4 animais. O seu grupo controle permaneceu em acompanhamento pelo mesmo período e contou com 2 animais. Os animais que compuseram este grupo foram os remanescentes do estudo.

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

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

### Avaliação anatomo-patológica

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

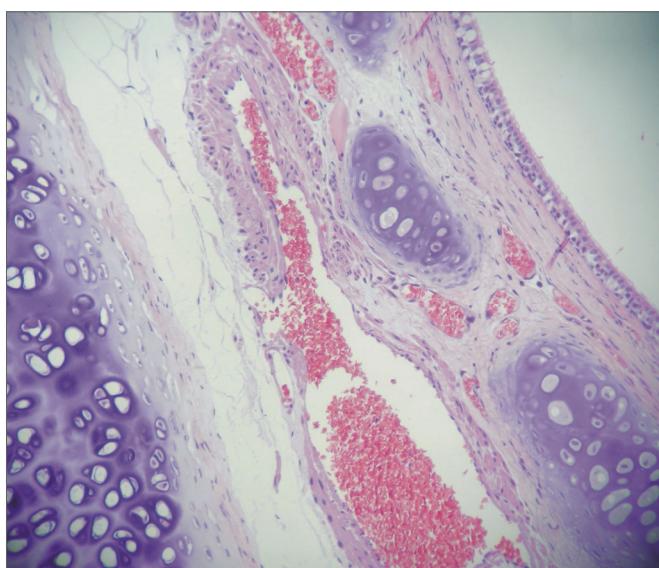
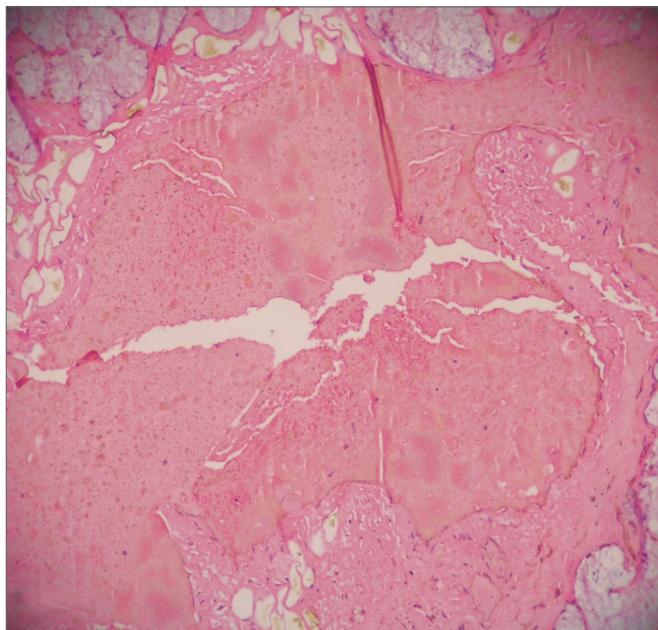


Figura 2. Congestão vascular moderada. HE 40X.

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

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

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



**Figura 3.** Congestão vascular intensa.

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

Cada um dos parâmetros foi categorizado, sendo classificados em:

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

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

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

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

### Análise estatística

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

### RESULTADOS

Após a análise histológica das lâminas agrupamos nas Tabelas 1 a 10 os parâmetros definidores de condição inflamatória entre os coelhos do grupo controle e de estudo comparando os resultados em relação ao tempo de pós-operatório.

Os resultados encontrados por meio do teste de Spearman, não-paramétrico, para as variáveis não-contínuas como parâmetros inflamatórios e de cicatrização e fibrose se encontram nas Tabelas 6 e 7.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## DISCUSSÃO

O curativo de celulose tem se mostrado um excelente curativo biológico. O seu uso na área médica vem aumentando, na medida em que aumenta o uso de materiais biológicos como curativos em tecidos lesionados ou doentes, pois devido a sua estrutura única e suas propriedades a celulose produzida por acetobacter xylinum é um candidato natural a ser utilizado em diversas áreas da medicina em que se tenha como objetivo a restauração tecidual. Este composto tem sido utilizado como curativo em escaras de pele, queimaduras, dermabrasões e áreas doadoras de pele, sendo usado como substituto de meninge e como material de revestimento de stents intravasculares para evitar estenose circumferencial em artérias de largo calibre<sup>15</sup>.

Já a estenose das vias aéreas superiores tem se tornado um problema cada vez mais freqüente com o avanço de técnicas que propiciem uma diminuição da mortalidade, porém um aumento da morbidade. Existem diversas formas de tratamento de estenose de laringe, porém nenhuma delas atinge um resultado suficientemente

satisfatório, logo vários estudos têm sido realizados no intuito de obter técnicas ou fatores que propiciem uma redução na incidência de estenoses desta área.

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

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

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

a) Tipo e idade do animal - Os animais utilizados no trabalho foram coelhos de ambos os sexos adultos, fato semelhante ao que ocorre em diversos trabalhos na literatura que utilizam esses animais por apresentarem a

via aérea semelhante a dos seres humanos e serem animais de fácil manuseio e de baixo custo em relação ao animais de porte maior<sup>16-19</sup>.

Os animais apresentavam peso que variava entre 1700 e 3250 gramas. Apesar desta diferença considerável entre os pesos, não detectamos alterações significativas na estrutura da região subglótica, por se tratarem de animais em idade adulta, fato confirmado por outros estudos já realizados<sup>20</sup>.

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

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

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

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

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

a) Congestão vascular (Figuras 4, 5 e 6) - em nosso trabalho encontramos nos coelhos do grupo com o

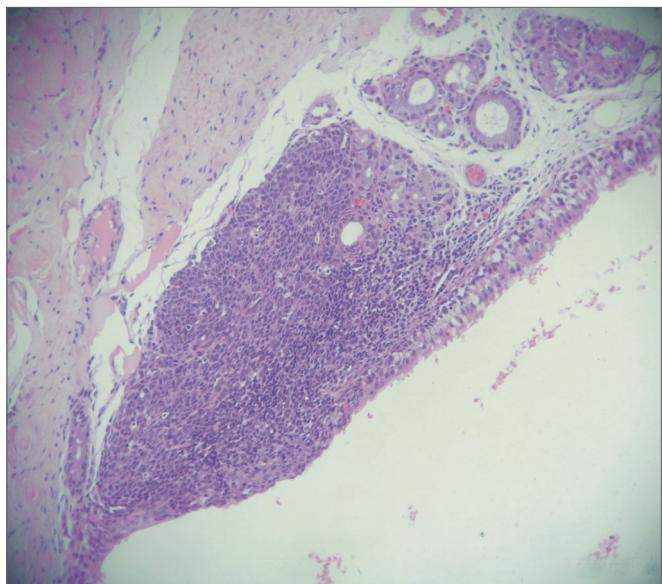


Figura 4. Processo inflamatório agudo intenso. HE 40X.

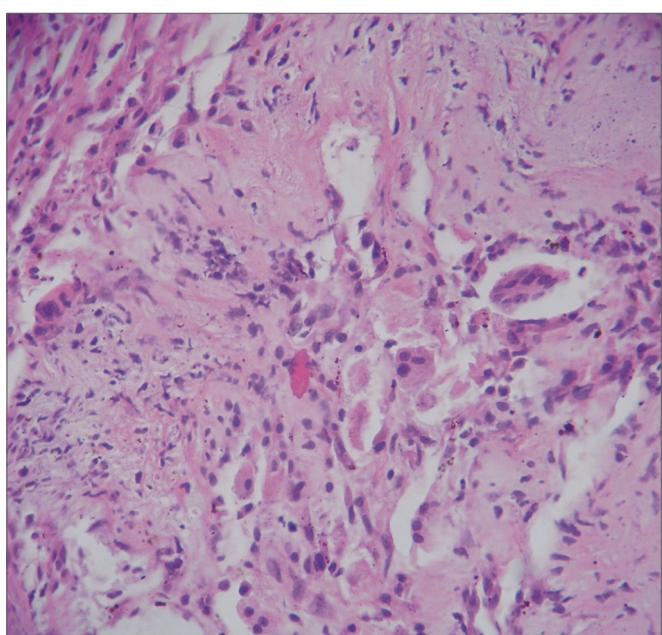
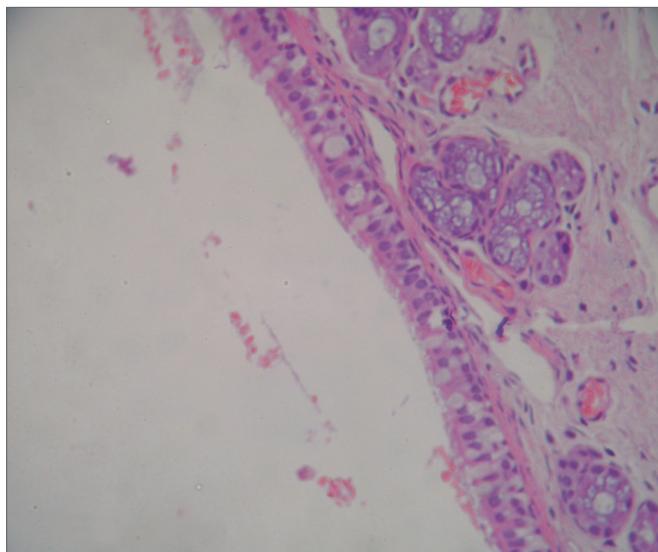


Figura 5. Reação de corpo estranho na mucosa traqueal. HE 100X.

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

Já o grupo de estudo evoluiu com o passar do tempo com resultados estatisticamente semelhantes ao



**Figura 6.** Mucosa com epitélio integral. HE 100X.

do grupo controle, sendo que no grupo com 180 dias de pós-operatório apenas um coelho apresentou congestão vascular discreta e o restante não evidenciou congestão vascular, o que evidencia que apesar de num primeiro momento o curativo possa promover uma exacerbação da congestão vascular e consequentemente do processo inflamatório, esse processo logo fica semelhante ao processo cicatricial espontâneo, fato que é compatível com os estudos que analisam a biocompatibilidade de enxertos, que revelam a ocorrência de edema e reação inflamatória ao redor do implante nos primeiros dias, ocorrendo melhora com a evolução<sup>21,22</sup>.

Esse resultado é semelhante aos dos outros estudos experimentais com a celulose que evidenciam que tal curativo não afeta a intensidade e o tempo de cicatrização<sup>23-26</sup>.

b) Exsudato purulento - não houve, em todos os períodos analisados, diferenças estatisticamente significantes entre o exsudato purulento dos membros do grupo controle submetidos apenas a escarificação da região da subglote e os casos submetidos à escarificação e colocação do curativo de celulose, pois não houve formação de exsudato purulento em nenhum dos coelhos estudados. A formação de exsudato purulento é um sinal de reação inflamatória exacerbada causado pela falha de um biomaterial em oferecer biocompatibilidade, promovendo assim uma resposta inflamatória insatisfatória, pois o principal aspecto da biocompatibilidade é a resposta tecidual local<sup>27</sup>.

O fato de não ocorrer a formação do exsudato purulento, demonstra a boa resposta do organismo a este curativo, que evitaria desta maneira a formação de processo inflamatório exacerbado e consequente possibilidade maior de se estabelecer um processo de estenose. Tal característica pode ser em virtude das características do curativo de celulose produzida pelo *Acetobacter xylinum*.

Dentre estas temos o fato de apresentar poros pequenos o bastante para impedir a entrada de bactérias, mas grande o suficiente para que o tecido tenha uma adequada aeração, protegendo assim o tecido enquanto o organismo renova a mucosa por baixo dele.

O resultado encontrado vem de encontro aos achados de outros estudos experimentais com o curativo de celulose que não mostraram exsudato purulento de forma estatisticamente significativa<sup>23-26</sup>.

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

Na evolução do processo inflamatório não houve diferenças estatisticamente significantes, em relação à sua intensidade, entre os grupos de sete, trinta, noventa e cento e oitenta dias, tanto no grupo controle como nos casos com enxerto de celulose, sendo que ocorreu processo inflamatório leve em apenas um coelho do grupo controle com 30 dias de pós-operatório, no restante não foi detectada inflamação.

Já no grupo de estudo o fato se repetiu com exceção do grupo III (90 dias de pós-operatório) que apresentou 2 coelhos com processo inflamatório com discreta presença de polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, associado a discreto edema local, sendo tal fato não significante estatisticamente.

Esses achados demonstram que apesar da escarificação da região subglótica seguir os princípios das técnicas descritas na literatura e atingir as camadas mais profundas dessa região, mostrou ser um procedimento pouco efetivo<sup>16-20</sup>. Dessa forma, tal técnica não proporcionou uma reação inflamatória significativa, que não foi exacerbada pela presença do curativo de celulose.

O fato da presença de curativo de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório deve-se às suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície, consistência e propriedade químicas, que promovem uma melhor reação tecidual não perpetuando o processo inflamatório.<sup>23-25</sup> Um dos aspectos importantes é a capacidade do curativo em conter exsudato em seu interior, formando dessa maneira um gel aderente que é efetivo para encapsular e imobilizar populações bacterianas potencialmente patogênicas, que promoveriam

um processo infeccioso e consequente exacerbação e prolongamento da inflamação.

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

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

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

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

A integridade do epitélio é um importante parâmetro definidor de cicatrização e cura por segunda intenção e a regeneração tecidual deste tecido é um processo de intensa restauração e reorganização dos vários tecidos envolvidos neste processo conforme concluído em outros experimentos<sup>1,4,28</sup>. A ausência de um diferença estatisticamente significativa deste parâmetro é um dado importante que evidencia um não prolongamento e cronificação da resposta inflamatória nos casos com o uso de curativo de celulose, que se ocorresse evoluiria para o rompimento do tecido, podendo levar à extrusão do enxerto e alterações significativas do epitélio. Tal fato demonstra que o curativo de celulose não promove uma resposta tecidual exacerbada que poderia ser um fator desfavorável para o seu uso em estudos seguintes.

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

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

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

Esse achados são semelhantes aos encontrados em outros estudos que usaram o curativo de celulose em outros animais e regiões corpóreas que evidenciaram as vantagens do curativo de celulose no processo cicatricial, promovendo uma melhora da cicatrização em feridas com cicatrização alterada<sup>23</sup>.

Outros estudos evidenciaram que o uso do Bionext® não altera a velocidade nem a força de cicatrização, concluindo que o curativo atua numa forma positiva no processo cicatricial<sup>20-23,25,27</sup>.

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

No grupo controle em nenhum dos coelhos estudados houve reação granulomatosa. Já no grupo de estudo evidenciamos a formação de reação granulomatosa apenas em 2 coelhos no grupo com 90 dias de pós-operatório, sendo que o restante dos coelhos evoluiu sem a formação de granuloma.

A ausência de reação granulomatosa evidencia uma resposta favorável do tecido hospedeiro ao implante do curativo, pois segundo a literatura a reação de biocompatibilidade trata-se de uma resposta de reação de corpo estranho e de reação cicatricial, que pode progredir para uma resposta favorável com a formação de um fina cápsula fibrosa envolvendo o implante e/ou crescimento de tecido dentro do biomaterial, ou evoluir para uma reação continua, inflamatória crônica caracterizada por formação de cápsula fibrosa espessa, granulação e rompimento do tecido com subsequente formação de abscesso ou fistula, culminando com extrusão do enxerto e alterações neoplásicas.

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

Resultado semelhante de Costa, quando analisou a cicatrização de pele de porcos large White comparando o uso do Bionext® ao curativo local diário não observando diferenças na evolução do processo inflamatório e da cicatrização entre as lesões.

Portanto, o curativo de celulose não foi um agravante na reação granulomatosa, logo o Bionext® é um curativo inerte e sua presença não agrava ou prolonga este processo, fato que se assemelha aos achado de outros estudos realizados com esse curativo<sup>20-23,27</sup>.

Como um dos principais conceitos do tratamento das estenoses subglóticas e traqueais é a necessidade de revestimento das áreas cruentas, sempre associado à ampliação da luz traqueal, o uso de uma membrana, biolo-

gicamente inerte, não associada à resposta inflamatória e infeciosa pode ser de grande utilidade em estudos futuros, já que os achados do trabalho realizado é compatível com outros estudos com curativo de celulose em animais.

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

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

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste estudo permitiu concluir:

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zietek E, Matyja G, Kawczynski M. Stenosis of the larynx and trachea: diagnostics and treatment. *Otolaryngol Pol* 2001;55(5):515-20.
2. Koshkareva Y, Gaughan JP, Soliman AM. Risk factors for adult laryngotracheal stenosis: a review of 74 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007 Mar;116(3):206-10.
3. Richard I, Hamon MA, Ferrapie AL, Rome J, Brunel P, Mathe JF. [Tracheotomy in brain injured patients: which patients? Why? When? How?] *Ann Fr Anesth Reanim* 2005 Jun;24(6):659-62.
4. Couraud L, Jougon JB, Velly JF. Surgical treatment of nontumoral stenoses of the upper airway. *Ann Thorac Surg* 1995 Aug;60(2):250-9; discussion 259-60.
5. Ashiku SK, Kuzucu A, Grillo HC, Wright CD, Wain JC, Lo B, Mathisen DJ. Idiopathic laryngotracheal stenosis: effective definitive treatment with laryngotracheal resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 Jan;127(1):10-1.
6. Herrington HC, Weber SM, Andersen PE. Modern management of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope* 2006 Sep;116(9):1553-7.
7. Brown OE, Manning SC. Microbial flora of the subglottis in intubated pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996 Apr;35(2):97-105.
8. Obara S, Muto H, Ichikawa N, Tanaka O, Otsuka M, Kawanabe M, Ishii H, Niikura Y, Komatsu M. A repeated-dose dermal toxicity study of hydrophobically modified hydroxypropyl methylcellulose in rats. *J Toxicol Sci*; 1997 Aug; 22 (3):255-80.
9. Korpela A, Aarnio P, Sariola H, Tormala P, Harjula A. Comparison of tissue reactions in the tracheal mucosa surrounding a bioabsorbable and silicone airway stents. *Ann Thorac Surg* 1998 Nov;66(5):1772-6.
10. Dufresne AM, Lafreniere D. Soft tissue response in the rabbit larynx following implantation of LactoSorb (PLA/PGA copolymer) prosthesis for medialization laryngoplasty. *J Voice* 2000 Sep;14(3):387-97.
11. Dodge-Khatami A, Niessen HW, Koole LH, Klein MG, Van Gulik TM, de Mol BA. Tracheal replacement in rabbits with a new composite silicone-metallic prosthesis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003 Sep;11(3):245-9.
12. Glatz F, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Damikas D, Mowlavi A. A tissue-engineering technique for vascularized laryngotracheal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003 Feb;129(2):201-6.
13. Saad AS, Falla A. Management of intractable and extensive tracheal stenosis by implantation of cartilage graft. *J Pediatr Surg* 1983 Aug;18(4):472-4.
14. Aidonis A, Nikolaou A, Bourikas Z, Aidonis I. Management of tracheal stenosis with a titanium ring and nasal septal cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002 Sep;259(8):404-8.
15. Mello LR, Machado FCN, Haas IJ, Zacchi V, Luzzi R, Zoschke J, Ramos RS. Efeitos hemostático e estrutural da esponja de celulose liofilizada. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56(3B):613-20.
16. Adriaansen FC, Verwoerd-Verhoef HL, Van Der Heul RO, Verwoerd CD. Differential effects of endolaryngeal trauma upon the growth of the subglottis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1988 May;15(2):163-71.
17. Morera E, Alvarez H, Fontes L, Gorospe M, Bernaldez R, Gavilan J. Histopathological changes at the surgical site in experimental animals following partial cricoid resection and thyrotracheal anastomosis. *Acta Otorrinolaringol Esp*; 2004 Mar;55(3):131-8.
18. Loewen MS, Walner DL, Caldarelli DD. Improved airway healing using transforming growth factor beta-3 in a rabbit model. *Wound Repair Regen* 2001 Jan-Feb;9(1):44-9.
19. Roh JL, Lee YW, Park, HT. Subglottic wound healing in a new rabbit model of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006 Aug;115(8):611-6.
20. Loewen MS, Walner DL. Dimensions of rabbit subglottis and trachea. *Lab Anim* 2001 Jul;35(3):253-6.
21. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Pathologic basis of disease. 5 Ed. Philadelphia: W. B. Saunders 1994;52-92.
22. Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M. New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials* 1995;16(11):881-5.
23. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 Dec;34(12):1557-70.
24. Moseley R, Walker M, Waddington RJ, Chen WY. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials--carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials* 2003 Apr;24(9):1549-57.
25. Cohn SM, Lopez PP, Brown M, Namias N, Jackowski J, Li P, Mishkin D, Lopez JM. Open surgical wounds: how does Aquacel compare with wet-to-dry gauze? *J Wound Care* 2004 Jan;13(1):10-2.
26. Costa HO, FC Souza. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue® 2005, Out/Nov/Dez;23(4):192-6.
27. Sevastjanova NA, Mansurova LE, Dombrovská LE, Slutskii LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials* 1987.
28. Dormer KJ, Bryce GE, Hough JVD. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28(1):17-27.