**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

GISELI REBECHI

**Avaliação da histocompatibilidade do implante de
ácido glicólico/ácido láctico (PLGA) na laringe de
coelhos**

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

GISELI REBECHI

**Avaliação da histocompatibilidade do implante de
ácido glicólico/ácido láctico (PLGA) na laringe de
coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientador: Prof. Dr. Edwin
Tamashiro**

RIBEIRÃO PRETO

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rebechi, Giseli

Avaliação da histocompatibilidade do implante de ácido glicólico/ácido láctico (PLGA) na laringe de coelhos. / Giseli Rebechi; Orientador: Edwin Tamashiro. Ribeirão Preto, 2018.

63p.: 9il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

1. Laringe. 2. Colágeno. 3. Histologia. 4. Implante.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Giseli Rebechi

Título: Avaliação da histocompatibilidade do implante de ácido glicólico/ácido láctico (PLGA) na laringe de coelhos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Ao meu marido, Elias Lobo Braga, por seu incondicional apoio, pela compreensão e pelo carinho ao longo do período de elaboração deste estudo.

Ao meu filho, Heitor Rebechi Braga, por seu sorriso mágico que me incentiva a cada dia ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Vaunice de Jesus Casarini Rebechi e Antonio Sergio Rebechi, com amor e gratidão por todos os momentos que me fizeram chegar até aqui.

Agradecimentos

A toda minha linda família, incentivadores incondicionais, em especial ao meu irmão, Fernando Rebechi, minha cunhada Alair Cunha e ao meu amado sobrinho, Matheus Cunha Rebechi, que sempre compreenderam minha ausência.

Ao colega, sócio e grande amigo, José Emmanuel Burle Neto, agradeço pelo auxílio nos momentos de estresse.

Ao colega de trabalho e de estudos André Coura Perez, sem ele não teria conseguido chegar até aqui.

A todos os amigos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste estudo, principalmente ao Herton Rodrigo Costa e Isis Montenegro Ferrão, por me acolherem tão carinhosamente em suas casas.

À Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, agradeço pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Professor Armando da Silva Cunha Junior e à Professora Silvia Ligório Fialho, agradeço por terem sido os idealizadores dos implantes e por terem realizado uma consultoria a respeito do assunto durante todo o estudo.

Agradeço também aos assistentes de pesquisa. Sem eles, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada Adriana Murashima, Marina Zillo Fantucci e Francesca Maia, pelo auxílio na histologia. Obrigada Maria Rossato e a todos os membros da técnica cirúrgica, pela ajuda na realização dos experimentos.

E, finalmente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edwin Tamashiro, pelo apoio, pela atenção, pela coragem de ter me aceitado como orientanda e pelo ensino durante o processo de definição, desenvolvimento e orientação, que tornou possível a concretização deste projeto.

Epígrafe

“Cada qual sabe amar a seu modo; o modo, pouco importa; o essencial é que saiba amar”.

Machado de Assis

Apoio Financeiro (Bolsa)

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

RESUMO

REBECHI, G. **Avaliação da histocompatibilidade do implante de ácido glicólico/ácido lático (PLGA) na laringe de coelhos.** 63f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Ribeirão Preto-SP. 2018.

Introdução: Diversas afecções laríngeas exigem o uso de enxertos para correção de insuficiências anatômicas ou de múltipla aplicação de fármacos para controle da doença. Alguns bioimplantes, especialmente aqueles com propriedades de liberação controlada de drogas, podem ser úteis no tratamento dessas afecções laríngeas, como a papilomatose laríngea. O poli ácido lático-co-glicólico (PLGA), tem sido bastante testado em aplicações intraoculares e topicamente na cavidade nasal, com resultados bastante promissores. No entanto, um implante de PLGA nunca foi avaliado quanto à sua biocompatibilidade em tecidos laríngeos. **Objetivo:** Avaliar as alterações histológicas decorrentes da aplicação de PLGA em laringes de coelhos. **Materiais e Métodos:** Grupos de sete a oito coelhos foram sacrificados em diferentes tempos pós-manipulação cirúrgica (1, 2, 4 e 8 semanas), comparando o lado implantado com PLGA e o lado sham-operado. Os achados histopatológicos foram comparados entre os dois grupos em cada tempo cirúrgico, assim como foi avaliada a diferença comparada a laringes não manipuladas. **Resultados:** A implantação de PLGA promoveu maior infiltração de células inflamatórias, indução de fibrose e neovascularização até a 4ª semana pós-operatória avaliada. No entanto, após oito semanas de evolução, as hemilaringes implantadas com PLGA se apresentaram semelhantes às laringes sham-operadas, ou mesmo não manipuladas cirurgicamente, com retorno quase que completo às condições basais. Por outro lado, não houve diferença da quantidade de depósito de colágeno tipo I e III nas hemilaringes implantadas com PLGA, em nenhum dos tempos avaliados. **Conclusão:** O implante de PLGA parece ser seguro para aplicações intralaríngeas, produzindo reações inflamatórias nas quatro primeiras semanas, mas que são reversíveis em oito semanas.

Palavras-chave: Laringe. Colágeno. Histologia. Implante.

ABSTRACT

REBECHI, G. **Evaluation of histocompatibility of poly lactic-glycolic acid graft in rabbit larynx.** 63f. Dissertation (Masters). Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto-SP, 2018.

Introduction: Several laryngeal affections require the use of grafts to correct anatomical insufficiencies or multiple application of drugs to control the disease. Some bioimplants, especially those with controlled drug release properties, may be useful in the treatment of such laryngeal conditions, such as laryngeal papillomatosis. Poly (lactic acid-co-glycolic acid), PLGA, has been widely tested in intraocular and nasal cavity applications, with very promising results. However, a PLGA implant has never been assessed for its biocompatibility in laryngeal tissues. **Aim:** To evaluate the histological changes resulting from the application of PLGA in rabbit larynx. **Materials and Methods:** Groups of 7-8 rabbits were sacrificed at different post-surgical times (1, 2, 4, and 8 weeks), comparing the implanted side with PLGA and the sham-operated side. Histopathological findings were compared between the two groups at each surgical time, as was the difference compared to the non-surgically manipulated larynx. **Results:** PLGA implantation promoted a higher infiltration of inflammatory cells, induction of fibrosis and neovascularization until the 4th postoperative week evaluated. However, after 8 weeks of evolution, PLGA implanted hemilarynx were similar to sham-operated or even non-surgically manipulated larynx, with a complete return to baseline conditions. On the other hand, there was no difference in the amount of collagen deposition type I and III in the hemilarynx implanted with PLGA, in none of the evaluated times. **Conclusion:** The PLGA implant appears to be safe for intralaryngeal applications, producing inflammatory reactions in the first 4 weeks, but which are reversible within 8 weeks.

Keywords: Larynx. Collagen. Histology. Implant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	(A) Aspecto macroscópico do implante biodegradável, medindo aproximadamente 5 mm de comprimento. (B) Imagem em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 250X. (C) Imagem em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 5.000X, demonstrando a porosidade do material	33
Figura 2:	(A) Coelho sob efeito de anestesia geral em posição de decúbito dorsal horizontal com tricotomia em região cervical anterior. (B) Incisão em pele e dissecação de tecido subcutâneo. (C) Exposição cirúrgica da cartilagem tireoidea. (D) Incisão em cartilagem tireoidea com bisturi número 11. (E) Confeção do bolsão em músculo vocal bilateral. (F) Posicionamento do implante biodegradável na hemilaringe esquerda	35
Figura 3:	Dissecação do segmento laríngeo. (A) Vista superior, com visualização da cartilagem epiglote, anteriormente, e pregas vocais; (B) Visão posterior, com visualização da face laríngea da cartilagem epiglote	36
Figura 4:	(A) Imagem representativa de microscopia de birrefringência, de lâmina corada com <i>Sirius Red</i> , demonstrando a separação apenas da área de interesse; (B) calibração do brilho e da saturação da área a ser estudada (C) para posterior análise da quantidade de colágeno	38
Figura 5:	Gráficos demonstrando a porcentagem de laringes, em relação às semanas do estudo e do tipo de cirurgia (sham vs PLGA). (A) Avaliação do grau de inflamação; (B) Avaliação do grau de fibrose; (C) Avaliação da neovascularização; (D) Avaliação da presença de necrose	43
Figura 6:	Fotografias representativas de cortes histológicos das hemilaringes implantadas com PLGA, sham-operadas e naive, corados por hematoxilina-eosina, com aumento de 200x, em diferentes tempos pós-manipulação cirúrgica. (A) (PLGA) e (B) (sham): uma semana; (C) (PLGA) e (D) (sham): duas semanas; (E) (PLGA) e (F) (sham): quatro semanas; (G) (PLGA) e (H) (sham): oito semanas; (I) <i>naive</i>	44
Figura 7:	Distribuição da quantidade de colágeno nos diferentes grupos de hemilaringes implantados com PLGA e com cirurgia sham, nos diferentes tempos do estudo. Não houve diferença estatística da concentração de colágeno entre os lados implantado com PLGA e sham-operados em nenhum tempo avaliado. Todos os grupos apresentaram maior concentração de colágeno em relação ao grupo naive, com exceção do grupo sham-operado de quatro semanas	46

- Figura 8:** Fotografias obtidas por microscopia de contraste de luz, representativas de cortes histológicos das hemilaringes implantadas, corados por *Sirius Red*, com aumento de 50x, em diferentes tempos pós-manipulação cirúrgica. **(A)** (PLGA) e **(B)** (sham): uma semana; **(C)** (PLGA) e **(D)** (sham): duas semanas; **(E)** (PLGA) e **(F)** (sham): quatro semanas; **(G)** (PLGA) e **(H)** (sham): oito semanas, **(I)** *naive*47
- Figura 9 -** Espectros na região do infravermelho de hemilaringes de coelhos submetidos à colocação de implante de PGLA em uma semana **(A)** e quatro semanas **(B)**. As bandas de estiramento demonstram a presença dos grupos químicos que constituem a molécula do biomaterial, sugerindo que ainda há material de PLGA nos tecidos laríngeos avaliados.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos parâmetros histológicos avaliados, de acordo com a intensidade observada.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA-	Análise de variância
anti-VEGF-	Fator anti crescimento vascular endotelial
b-FGF-	Fator de crescimento de fibroblastos
COBEA-	Código Brasileiro de Experimentação em Animais
FAFAR-UFMG-	Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais
FDA-	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FTIR-	Infravermelho transformada de <i>Fourier</i>
HE-	Hematoxilina-eosina
HGF-	Fator de crescimento de hepatócitos
IL-1-	Interleucina-1
IL-6-	Interleucina-6
PLGA-	Poli ácido láctico-co-glicólico
PV-	Prega vocal
RPM-	Rotação por minuto
TGF-β1-	Fator de crescimento transformante beta-1
TNF-α-	Fator de necrose tumoral alfa
vs-	<i>versus</i>

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	20
1.1. Processo de cicatrização das pregas vocais.....	23
1.2. Uso de bioimplantes na laringe.....	25
1.3. Uso de bioimplantes em outras áreas médicas.....	27
2- OBJETIVO	29
3- MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Seleção e cuidado animal	32
3.2. Bioimplante utilizado	32
3.3. Experimentação animal.....	33
3.4. Avaliação histológica.....	37
3.5. Pesquisa de PGLA por espectroscopia	39
3.6. Análise estatística	39
4- RESULTADOS	40
4.1. Infiltrado inflamatório	41
4.2. Fibrose	41
4.3. Neovascularização	42
4.4. Necrose.....	42
4.5. Concentração de colágeno.....	45
4.6. Pesquisa de PGLA por espectroscopia	48
5- DISCUSSÃO	49
6- CONCLUSÃO	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8- ANEXO	62

1- INTRODUÇÃO

A laringe é um órgão multifuncional e que apresenta importantes papéis na respiração, deglutição, fonação e na proteção de vias aéreas inferiores. Por se tratar de um órgão em íntimo contato com o ambiente externo, torna-se alvo de diversos processos infecciosos agudos e crônicos, alterações inflamatórias das mais diversas naturezas, assim como de afecções tumorais benignas e malignas. Essas afecções podem causar uma reação inflamatória local que leva a adulteração da ultraestrutura da prega vocal (PV), podendo levar a sintomas como rouquidão, alterações na respiração e na deglutição. Não só a doença, mas também os tratamentos dessas enfermidades podem causar tais alterações. Um exemplo de doença benigna que provoca tais alterações é a palipomatose laringea (HOLLINGWORTH; KOHLMÖS; MCNAUGHT, 1950), causada pelo papilomavírus humano. Ela pode gerar múltiplas lesões no epitélio da PV, e o tratamento consiste em cirurgia com ressecção das lesões, causando reação cicatricial local intensa, alterando a configuração das camadas das PVs. Também pode levar à insuficiência glótica, quando não há boa coaptação dos bordos livres das PVs (KONO et al., 2017). Com o objetivo de diminuir a insuficiência glótica, reação inflamatória e cicatricial das PVs, tratamentos cirúrgicos minimamente invasivos têm sido empregados, porém com pequeno sucesso. O desenvolvimento de implantes de PVs tem ajudado a reduzir a insuficiência glótica, causada por essas doenças e seus tratamentos, assim como o uso de fatores de crescimento para diminuir a reação inflamatória; e a produção de colágeno local tem mostrado resultados bem promissores (HAMILTON; BIRCHALL, 2017).

A preocupação de se implantar materiais exógenos na laringe é que tais substâncias podem causar reações inflamatórias significativas; induzindo, potencialmente, alterações histológicas definitivas com sequelas funcionais. A preservação da arquitetura histológica normal é de fundamental importância para que a qualidade da fonação seja mantida, em função da delicada organização tecidual das PVs, que estão intimamente relacionadas com a qualidade da produção vocal. Histologicamente, as PVs de humanos são constituídas por cinco camadas: epitélio de revestimento, camadas superficial, intermediária e profunda da lâmina própria e músculo vocal. A lâmina própria é a principal camada responsável pela vibração da PV, decorrente da rica densidade de matriz extracelular (colágeno e

fibrina) e escassez de células, que lhe confere características fibroelásticas apropriadas.

Os componentes fibrosos da matriz extracelular são divididos microscopicamente em três tipos: fibras reticulares, colágenas e elásticas. O sistema de fibras colágenas tem a função de dar suporte e manter a morfologia dos tecidos, enquanto o sistema de fibras elásticas possibilita a distribuição do estresse mecânico de modo uniforme para manter e retornar rapidamente à forma original do tecido (USHIKI, 2002). As fibras colágenas são encontradas em quantidade abundante na lâmina própria: o colágeno tipo 1, mais espesso, e o tipo 3, mais delgado. Eles se entrelaçam em uma estrutura tridimensional, semelhante a uma cesta de vime, configurando um arcabouço fibroso. Em condições patológicas, alterações dessas fibras podem levar a modificações vibratórias significativas, com consequente alteração na produção da voz (SATO, 1998). Já as fibras colágenas dos tipos 4 e 7 predominam na membrana basal da PV humana (GRAY et al., 2000).

A baixa densidade celular na lâmina própria é outra característica que possibilita maior capacidade vibratória dessa estrutura. A densidade celular difere entre as diferentes camadas das PVs. Macrófagos e miofibroblastos se encontram nas camadas mais superficiais da lâmina própria, enquanto os fibroblastos, apesar de abundantes em toda a lâmina própria, apresentam maior concentração na camada mais profunda (CATTEN et al., 1998). Ainda, a lâmina própria das PVs é rica em proteínas extracelulares, especialmente de proteoglicanos, que são proteínas intersticiais ligadas a glicosaminoglicanos e exercem importantes funções biológicas na laringe, como controle da trombogênese, regulação de fatores de crescimento, assim como adesão e migração celular (COUCHMAN; WOODS, 1993). Também se confere à lamina própria algumas propriedades biomecânicas essenciais à função vibratória das PVs, como regulação da viscosidade e controle osmótico, este último resultando no controle de líquido e espessura das PVs. Entre os proteoglicanos mais comuns estão: ácido hialurônico, decorina, fibromodulina, agregano, versicano e biglicano (HIRANO et al., 2009). Dessa forma, qualquer alteração histológica nas diferentes camadas da lâmina própria, como alterações na densidade celular ou depósito de matriz extracelular podem trazer prejuízos transitórios ou mesmo definitivos para as funções laríngeas. Nesse sentido, um

implante laríngeo ideal deve causar discretas alterações à lamina própria da PV, com mínimas modificações na sua composição e/ou organização histológica (ROUSSEAU et al., 2013).

1.1 Processo de cicatrização das pregas vocais

Os processos de reparação tecidual, que ocorrem durante uma lesão nas PVs, sejam durante a fisiopatogênese de lesões benignas, devido à manipulação cirúrgica ou mesmo após a aplicação de bioimplantes, têm sido amplamente estudados em humanos e também em modelos animais (HIRANO et al., 2009). Em virtude da dificuldade ética de se avaliar tais intervenções experimentais em humanos, a maioria dos estudos tem utilizado modelos animais, envolvendo cães ou coelhos. Os modelos animais são considerados um bom método para investigação das respostas às injúrias das PVs e necessários para aumentar a compreensão das mudanças histológicas e biomecânicas que ocorrem nesse órgão (ROUSSEAU et al., 2004). Dentre esses, o coelho possui propriedades semelhantes de tecido vocal de humanos. Um limitador da pesquisa em coelhos é o fato de que, em condições normais, esses animais permanecem em repouso vocal, impossibilitando a avaliação da qualidade da voz (BRANSKI et al., 2005).

Os processos de cicatrização e remodelamento da matriz extracelular da lâmina própria após injúria da PV (KISHIMOTO et al., 2010) já são bem conhecidos em modelos animais (THIBEAULT et al., 2002). O processo cicatricial nas PVs pode se dar por várias causas: inflamatórias, traumáticas, iatrogênicas, radioterapia, infecciosas, entre outras (BENNINGER et al., 1996). A fase inflamatória aguda da cicatrização de feridas persiste desde o momento em que ocorre a lesão até aproximadamente quatro a seis dias após (HIRANO, 1981). O início dessa fase é marcado pelo controle de sangramento por meio da vasoconstrição dos vasos afetados.

Na lâmina própria da PV existem apenas pequenos vasos com orientação paralela à borda livre da PV. A vasculatura da lâmina própria superficial é escassa, com aumento da densidade vascular conforme a profundidade da PV (HIRANO; SATO, 1993), o que pode oferecer uma vantagem na prevenção da hemorragia

fonotraumática na lâmina própria. Na região da comissura anterior, há uma rica anastomose entre os capilares oriundos das PVs direita e esquerda, com pouca ou nenhuma comunicação vascular entre a lâmina própria e o músculo vocal, o que contribui com a liberdade mecânica durante a vibração.

Independentemente disso, quando ocorre uma lesão na lâmina própria e a microvasculatura é violada, a hemostasia local fornece a base para a futura cura de feridas (NAKAI et al., 1991). As plaquetas circulantes se agregam no local da lesão e ativam respostas de coagulação. O coágulo se torna a sede para células inflamatórias, como neutrófilos e monócitos, assim como para queratinócitos e fibroblastos, que são importantes para os estágios posteriores de remodelação da matriz. O recrutamento de neutrófilos e monócitos se dá por meio de fatores quimiotáticos liberados pelas plaquetas e outras células residentes, como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1). Os neutrófilos se ligam à matriz extracelular pré-existente por integrinas de superfície e são importantes para a limpeza de agentes bacterianos da área lesada (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Os neutrófilos também liberam metaloproteinases, que são capazes de quebrar a matriz extracelular circundante, promovendo o remodelamento tecidual. Além disso, tem se demonstrado que os neutrófilos são uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas com o recrutamento de fibroblastos (HÜBNER et al., 1996). Os monócitos se diferenciam em macrófagos 48 a 96 horas após a lesão e estão envolvidos na fagocitose de neutrófilos apoptóticos, detritos e bactérias no leito da ferida. Eles também liberam fatores de crescimento derivados de plaquetas, interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , estimulando a migração de mais macrófagos e fibroblastos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MARTIN, 1997).

O período entre o 4º e o 14º dia de cicatrização da ferida é marcado por reepitelização, angiogênese e formação de matriz. Durante a epitelização, os macrófagos estimulam a secreção de fibroblastos do fator de crescimento de queratinócitos e de outras moléculas por estimulação com IL-1 e de TNF- α . Os fibroblastos no local de lesão começam a produzir fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos para criar a matriz provisória que será, eventualmente, substituída por colagênio na fase de remodelação madura (BROUGHTON; JANIS;

ATTINGER, 2006). Aproximadamente, da segunda semana até cerca de um ano após a lesão, a matriz extracelular amadurece e sofre remodelamento; uma fase que tem maior importância clínica. O TGF- β 1 é fundamental na remodelação da matriz no início desse momento, com níveis mais elevados entre o 7º e o 14º dia após a lesão para ferimentos incisionais (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). A matriz provisória é progressivamente substituída por colágeno. A densidade e a concentração de colágeno aumentam ao longo do tempo e, uma vez estabelecida a matriz rica em colágeno, a migração celular ativa diminui. Os fibroblastos, que estão totalmente ligados à matriz, sofrem uma transformação fenotípica em miofibroblastos e iniciam uma contração para fechar a ferida com força centrípeta (GRINNELL, 2003).

Uma das alterações mais marcantes no processo cicatricial das PVs é o aumento da concentração do colágeno tipo I; que cresce, inicialmente, de modo desorganizado (THIBEAULT et al., 2002). Além disso, ocorre aumento da concentração de fibronectina e diminuição da densidade do ácido hialurônico, confirmando a sistemática ação dos fibroblastos nas lesões da PV (ROUSSEAU et al., 2013). A elastina pode se encontrar em concentração diminuída (HIRANO et al., 2009), ou ainda formar um emaranhado desorganizado, com fibras mais curtas, mais finas e menos onduladas (ROUSSEAU et al., 2013). Esse processo cicatricial pode causar rigidez na PV, diminuindo a capacidade ondulatória da lâmina própria e produzindo, conseqüentemente, disfonia de difícil controle (HIRANO, 2005).

1.2 Uso de bioimplantes na laringe

Para o tratamento de algumas alterações laríngeas, que causam mudanças na fonação, diversas substâncias implantáveis vêm sendo aplicadas nas PVs. A primeira substância a ser implantada na PV foi descrita por Bruening (1911), que relatou o uso de parafina líquida no tratamento de pacientes com paralisia do nervo recorrente. Apesar de melhorar o fechamento glótico desses pacientes, o uso da parafina apresentou graves efeitos colaterais, como formação de granuloma de difícil remoção e migração desse material para outros locais (ARNOLD, 1962). Da mesma maneira, outras substâncias sintéticas têm sido empregadas para essa mesma

finalidade. A hidroxiapatita tem apresentado pequena resposta inflamatória com fino encapsulamento fibroso do material, porém com osteogênese no local da implantação. Essa osteogênese parece limitar a migração de material, entretanto pode limitar a reversibilidade de um procedimento (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997; SPREKELSEN et al., 2004).

Outro material já utilizado em estudos foi o silicone. Esse material tem apresentado resultados conflitantes na literatura, alguns autores demonstrando limitada reação inflamatória e formação de capsula fibrosa ao seu redor, enquanto outros relataram significativa reação de corpo estranho. Em contrapartida o Teflon apresentou reação inflamatória intensa, com formação de granulomas, presença de células multinucleadas e migração de teflon para a musculatura subjacente e linfonodos cervicais (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997; SPREKELSEN et al., 2004).

Alguns efeitos adversos observados em alguns materiais têm incentivado a busca de outros que promovam menor ocorrência de migração e de reação inflamatória, com características imunobiológicas mais compatíveis. Alguns materiais biológicos mais compatíveis, como a gordura, fáscia e o colágeno, apresentam a limitação de seus efeitos transitórios em decorrência da reabsorção. A utilização da gordura, por exemplo, além de necessitar de um minucioso protocolo de tratamento após a excisão cirúrgica, apresenta alta taxa de reabsorção e consequente necessidade de múltiplas aplicações (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997; STEIN et al., 2000). No entanto, essa taxa de reabsorção é variável, reportada em até cinco meses em humanos laringectomizados e a um ano em estudos experimentais com gatos (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997). Adicionalmente, não há consenso sobre qual a melhor técnica para a injeção da gordura na PV, permanecendo incerto quais são as condições mais favoráveis para a maior duração do implante de gordura (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997; STEIN et al., 2000). Outra consequência negativa observada em alguns casos é o desenvolvimento de reações imunogênicas contra o enxerto, como é o caso do colágeno bovino (FLINT; CORIO; CUMMINGS, 1997). Com o intuito de minimizar tais reações, a utilização de transplante de fáscia autóloga tem se mostrado melhor do que a bovina (FORD, 1986).

Em virtude da imprevisibilidade do fator absorção desses materiais biológicos, tem se buscado o desenvolvimento de outros biocompatíveis, com taxas menores de reabsorção e reduzida resposta inflamatória nos tecidos hospedeiros. Essas pesquisas se estenderam a outros materiais biológicos que, por mudanças estruturais, apresentam menor grau de absorção (PERAZZO et al., 2007). A injeção de pasta de Gelfoam para o tratamento temporário de paralisia de PV foi usado com mínima reação inflamatória local, entretanto com tempo de permanência na PV de apenas oito a dez semanas (SCHRAMM; MAY; LAVORATO, 1978). A injeção de ácido hialurônico tem se tornado cada vez mais uma alternativa viável para o auxílio da cicatrização da PV (PERAZZO et al., 2007). O primeiro estudo dessa substância apresentou resultados promissores, com aumento da formação de colágeno, reduzida reação inflamatória e ausência de reação de corpo estranho (HALLEN; DAHLQVIST; LAURENT, 1998). O ácido hialurônico é uma glicosamina essencial na fase inicial de cicatrização, em que o aumento de sua concentração pode ser terapêutico para a regeneração de cicatrizes de PVs (THIBEAULT et al., 2004; WEIGEL; FULLER; LEBOEUF, 1986). O uso de fatores de crescimento também vem sendo estudado em lesões de PVs para diminuir o número de fibras colágenas e aumentar a concentração de ácido hialurônico. Estudos com fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento de fibroblastos (b-FGF) têm sido bastante promissores na implantação de tecidos laríngeos (HIRANO et al., 2004; SUEHIRO et al., 2010).

1.3 Uso de bioimplantes em outras áreas médicas

Em outras subespecialidades médicas, a busca por materiais biocompatíveis sem efeitos indesejados também vem ocorrendo há muitos anos. Recentemente, os oftalmologistas vêm empregando um dispositivo capaz de servir como veículo para carregar drogas por períodos prolongados em órgãos alvos, formado por polímeros biodegradáveis (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005; FIALHO et al., 2006). Em algumas doenças oftalmológicas, como as do humor vítreo e da retina, são necessárias múltiplas aplicações de corticoide para o controle dessas doenças. O implante intravítreo de epsilon-caprolactone permite a distribuição controlada e prolongada de

dexametasona, uma vez que libera 25% da droga em 21 semanas. Observações preliminares mostram que tais implantes são muito bem tolerados no olho de coelho. Outros polímeros já testados em animais incluem os ácidos polilático, poliglicólico e polilático-co-glicólico. Os implantes de liberação de fármaco podem obter concentrações prolongadas em tecidos oculares, diminuindo a necessidade de reaplicações, redução da exposição sistêmica, bem como de seus efeitos colaterais; aumentando, consequentemente, a adesão do paciente ao tratamento (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2007; FIALHO et al., 2007; FIALHO; BEHAR-COHEN; SILVA-CUNHA, 2008; ROUSSEAU et al., 2013). Na última década, alguns materiais biodegradáveis têm sido testados com o objetivo de preencher essa lacuna no tratamento de algumas doenças da laringe. A injeção de nanopartículas encapsuladas de polímero de ácido láctico e glicólico, hidrogel e microtubos de lipídeo foi testada com bons resultados, sem excesso de produção de colágeno ou de reação inflamatória local (KISHIMOTO et al., 2010; KOLACHALA et al., 2011; KOSINSKI et al., 2015; LEE et al., 2014; XIE et al., 2007).

2. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo avaliar as possíveis alterações histológicas que ocorrem após a colocação de um implante biodegradável, à base de ácido lático ácido e glicólico, em um modelo experimental, analisando possíveis alterações histológicas inflamatórias e de deposição de colágeno, buscando avaliar a potencial aplicabilidade clínica deste implante em humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção e cuidado animal

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (Processo nº 151/2013), e desenvolvido no Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, com supervisão e acompanhamento técnico veterinário. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas da Lei Federal nº 6.638, de 8 de maio de 1979, seguindo os princípios éticos na experimentação animal postulados pelo Código Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA).

Foram utilizados 36 coelhos Nova Zelândia machos, com massa corporal entre 2,5 Kg a 3,5 Kg, oriundos do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Durante a experimentação, os animais foram mantidos no biotério da Cirurgia Experimental, com iluminação e temperatura apropriadas, e alojados, individualmente, em caixas com fio galvanizado de ferro (diâmetro do fio de 3 mm), com dimensões de 50 cm de largura, 60 cm de comprimento e 50 cm de altura, com base fenestrada para recolhimento dos excrementos do animal. Ração apropriada e água potável foram fornecidas *ad libitum*; e a limpeza das caixas foi realizada diariamente.

3.2 Bioimplante utilizado

Os implantes biodegradáveis de copolímero do ácido glicólico/ácido-lático (PLGA) foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR-UFMG), plataforma tecnológica de Desenvolvimento de Sistemas Implantáveis de Liberação de Fármacos, coordenado pelo Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior. Para o preparo desses implantes, foram utilizados ácido lático e ácido glicólico na razão de 75/25, e depois solubilizados em mistura de solvente e água destilada. A solução obtida foi filtrada em filtros estéreis de 0,22 µm, sob fluxo laminar, posteriormente liofilizada e utilizada para o preparo do implante na forma de bastões pelo método de moldagem a quente. Esses bastões apresentaram peso entre 0,9-

1,2 mg, 4,5-6,0 mm de comprimento e 0,4-0,5 mm de diâmetro. Macroscopicamente, os implantes se mostraram lisos, com aparência similar e sistemas monolíticos (Figura 1).

Figura 1 - **(A)** Aspecto macroscópico do implante biodegradável, medindo aproximadamente 5 mm de comprimento. **(B)** Imagem em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 250X. **(C)** Imagem em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 5.000X, demonstrando a porosidade do material

3.3 Experimentação animal

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais:

- Grupo naive - Grupo sem manipulação cirúrgica, eutanasiados em sete dias (n=7);
- Grupo 1 semana - Sacrifício uma semana após a experimentação cirúrgica (n=8);
- Grupo 2 semanas - Sacrifício duas semanas após a experimentação cirúrgica (n=7);
- Grupo 4 semanas - Sacrifício quatro semanas após o procedimento cirúrgico (n=7);
- Grupo 8 semanas - Sacrifício oito semanas após o procedimento cirúrgico (n=7).

Para a realização do procedimento, os coelhos foram sedados com quetamina intramuscular (50 mg/Kg) nas regiões do quadríceps e posterior da coxa, com volume máximo de 2 mL. Após a sedação, os animais foram anestesiados com xilazina (5 mg/Kg) associada à quetamina (25 mg/Kg) por via endovenosa. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea, em decúbito dorsal, sem necessidade de assistência ventilatória. Após tricotomia da região cervical anterior (Figura 2A) e adequada antisepsia com iodopovidona, se estendendo desde a mandíbula até a fúrcula esternal, foi realizada infiltração subcutânea com xilocaína 2% associada a vasoconstritor, minutos antes da incisão cutânea. A incisão foi realizada na linha média, a partir da margem superior da cartilagem tireoidea até cerca de 0,5 cm abaixo da margem inferior da cartilagem cricoidea, permitindo a exposição das cartilagens tireoide, cricoidea e traqueal (Figura 2 B e C).

Após adequada exposição, uma incisão longitudinal na cartilagem tireoidea (Figura 2D) foi realizada a fim de permitir a confecção de um nicho entre a musculatura e a mucosa de PV para albergar o implante, com pinça delicada McPherson angulada (Figura 2E). O implante de PLGA foi introduzido na hemilaringe à esquerda (Figura 2F), enquanto o lado contralateral recebeu o mesmo tratamento cirúrgico, porém sem introdução do implante (cirurgia sham). Após hemostasia, foi realizado o fechamento da cartilagem tireoidea, sem sutura, seguido de sutura dos planos subcutâneos com fio *catgut* 2-0 e da pele com fios de *nylon* 5-0. Após a conclusão do procedimento cirúrgico, os coelhos receberam Pentabiótico® veterinário na dose de 0,1 mL/Kg/peso para antibioticoprofilaxia; e após a recuperação anestésica, os animais foram mantidos em suas gaiolas até a data da eutanásia.

Figura 2 - (A) Coelho sob efeito de anestesia geral em posição de decúbito dorsal horizontal com tricotomia em região cervical anterior. **(B)** Incisão em pele e dissecção de tecido subcutâneo. **(C)** Exposição cirúrgica da cartilagem tireoidea. **(D)** Incisão em cartilagem tireoidea com bisturi número 11. **(E)** Confecção do bolsão em músculo vocal bilateral. **(F)** Posicionamento do implante biodegradável na hemilaringe esquerda

Para a eutanásia, foi utilizada overdose de tionembutal por via endovenosa (150 mg/Kg). Após a confirmação da morte do animal, a laringe de cada coelho foi retirada através de incisão na pele, seguida de dissecação por planos até a exposição da cartilagem tireoidea, com remoção completa desse segmento (Figura 3).

Figura 3 - Dissecação do segmento laríngeo. **(A)** Vista superior, com visualização da cartilagem epiglote, anteriormente, e pregas vocais; **(B)** Visão posterior, com visualização da face laríngea da cartilagem epiglote

Apenas no grupo naive, nenhum dos sete coelhos foram submetidos a procedimento cirúrgico, para fins de comparação com laringes não manipuladas cirurgicamente. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até a data da eutanásia.

Para identificação do lado direito (cirurgia sham), a cartilagem tireoidea foi corada externamente com tinta nanquim e fixada com ácido acético por cinco segundos, para identificação da lateralidade nos cortes histológicos. Todas as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas, exceto uma amostra de cada grupo, que foi congelada a -80°C. As amostras congeladas foram

enviadas ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FAFAR-UFMG para a quantificação de PGLA nas amostras por espectroscopia. Após o término dos experimentos, os animais foram descartados em sacos plásticos leitosos com símbolo de agente biológico infectado, etiquetado e enviado ao abrigo de resíduos biológicos do Biotério da Cirurgia Experimental da FMRP-USP.

3.4 Avaliação histológica

Após fixação, as laringes foram emblocadas em parafina e seccionadas em cortes de 3 µm de espessura, no plano coronal, de modo anteroposterior, passando pela porção membranosa das PVs. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (método de Mayer) e *Sirius Red*. As análises histológicas da reação inflamatória foram realizadas sob microscopia ótica, com lâminas coradas com HE, pela médica patologista Francesca Maia Faria, no Laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP. Foram avaliados: intensidade e predomínio celular do processo inflamatório, neovascularização, intensidade de fibrose e áreas de necrose (Tabela 1). O infiltrado inflamatório foi analisado conforme a sua intensidade pela escala ponderal e dividido em quatro graus: Grau 0, ausente; Grau 1, leve, com esparsas células inflamatórias, sem lesão epitelial evidente; Grau 2, moderado, com infiltrado inflamatório difuso em lâmina própria, sem formação de agregados inflamatórios com lesão focal de células epiteliais caracterizadas por desorganização e ruptura de células epiteliais; e Grau 3, intenso, com denso infiltrado inflamatório difuso com formação de agregados de células inflamatórias caracterizadas por desorganização e ruptura de células epiteliais.

A formação de fibrose foi quantificada pela escala de intensidade: Grau 0, ausente; Grau 1, leve, com pouca formação de fibrose; Grau 2, moderado, com fibroblastos e trabéculas finas de fibrose; e Grau 3, intenso, com presença de fibroblastos e trabéculas espessas de fibrose. A neovascularização, assim como as áreas de necrose, foram descritas como ausente (Grau 0) ou presente (Grau 1) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos parâmetros histológicos avaliados, de acordo com a intensidade observada

	Infiltrado inflamatório	Fibrose	Neovascularização	Necrose
Grau 0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Grau 1	Leve	Leve	Presente	Presente
Grau 2	Moderado	Moderado		
Grau 3	Intenso	Intenso		

A avaliação da concentração do colágeno foi realizada nas lâminas coradas com *Sirius Red*, fotografadas com microscópio de luz polarizada (Olympus BX50®, câmera de vídeo para microscópio Spot RT3TM e X-Cite Led®), e analisadas com o auxílio do programa *Image J software* (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Para o cálculo da densidade de colágeno, foram excluídas as áreas onde não havia tecido, áreas de cartilagem e os possíveis espaços deixados pelo implante. O número total de *pixels* de cada imagem foi quantificado, sendo ajustada a saturação entre 10-255 *pixels* e o brilho entre 20-255 *pixels* para calibração (Figura 4).

Figura 4 - (A) Imagem representativa de microscopia de birrefringência, de lâmina corada com *Sirius Red*, demonstrando a separação apenas da área de interesse; (B) calibração do brilho e da saturação da área a ser estudada (C) para posterior análise da quantidade de colágeno

Os tipos de colágeno foram calculados pela captação do intervalo de cores, conforme a densidade e sua biorrefringência, segundo Junqueira (1978), sendo o vermelho entre 1-13 (mais denso), laranja entre 14-25, amarelo entre 25-52 e verde entre 53-110 (feixe de colágeno mais delgado). Considerou-se colágeno tipo I a soma dos colágenos vermelho, laranja e amarelo; e para o colágeno tipo III, foi considerada a marcação da cor verde (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRETANI, 1978).

3.5 Pesquisa de PGLA por espectroscopia

Um segmento cervical de cada grupo foi analisado pela técnica de espectroscopia FTIR (infravermelho transformada de Fourier) para a quantificação de PGLA nas amostras. As amostras congeladas foram pesadas, descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas por um ultra-Turrax (IKA, T-25) a 12000 RPM (rotação por minuto), por cinco minutos, em presença de acetona grau analítico, na proporção de 5 mL/100 mg de tecido. Após esse procedimento, as dispersões foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido, filtrado e evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão. Para a realização da espectroscopia FTIR, os resíduos obtidos após a evaporação do solvente foram pressionados contra um cristal de seleneto de zinco e os espectros de infravermelho foram obtidos a partir de quatro varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . As análises de FTIR foram realizadas no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000.

3.6 Análise estatística

Para avaliação do grau de inflamação, fibrinogênese, neovascularização e necrose, foi utilizado o teste Chi Quadrado para a comparação de distribuição de frequências. Para a comparação da quantidade de colágeno entre os diferentes grupos e tempos, foi utilizado o teste ANOVA *two-way*, sendo considerada a razão de cada intervalo de cor (representando cada subtipo de colágeno) pelo total de pixel captado em cada respectiva imagem. Para todas as análises, considerou-se como nível de significância ($p\text{-valor} < 0,05$), utilizando o *software* JMP 10.0.0, SAS Institute 2012, número de série 6.2.9200.0.

4. RESULTADOS

4.1 Infiltrado inflamatório

As hemilaringes submetidas à implantação de PGLA apresentaram maiores níveis de inflamação em relação ao lado controle (sham-operado), especialmente nas primeiras quatro semanas após manipulação (PGLA vs. Sham; p-valor=0,029 na primeira semana; p-valor=0,0432 no grupo de duas semanas; p-valor=0,0498 em quatro semanas). Oito semanas após o procedimento, não se observou diferença quando comparadas às hemilaringes sham-operadas (p-valor=0,2963). Entre a primeira e a oitava semana pós-cirúrgica, houve redução significativa do processo inflamatório, passando de grau moderado a intenso na primeira semana, grau moderado entre a segunda e quarta semana e grau leve na oitava semana de evolução. Durante as primeiras semanas pós-implantação de PLGA verificou-se significativa reação histiocitária, com presença de células multinucleares gigantes e focos de calcificações ao redor do implante. Após oito semanas, verificou-se resolução quase completa da inflamação na maioria das hemilaringes implantadas com PLGA (Figuras 5 e 6). O lado sham-operado não apresentou níveis diferentes de inflamação em relação às hemilaringes naíves em nenhum momento pós-cirúrgico (p-valor>0,05) (Figura 5).

4.2 Fibrose

As hemilaringes implantadas com PLGA apresentaram significativos graus de fibrose nas duas primeiras semanas de evolução, na maioria dos casos, graus moderados a intensos. No entanto, tais graus de fibrose não foram estatisticamente diferentes entre o lado sham-operado e o lado implantado com PLGA (p-valor=0,0764). A partir da quarta semana pós-cirúrgica, tanto o lado implantado com PLGA quanto o sham-operado apresentaram melhora significativa do depósito de fibrose, mais acentuada do lado sham-operado (4 semanas, PLGA vs. sham-operado, p-valor=0,0143), mas voltando a ser semelhantes em oito semanas, apesar de ambos os lados ainda apresentarem grau leve de fibrose subepitelial ao redor do local da manipulação cirúrgica, (p-valor=0,5582) (Figura 5). Quando comparadas com as hemilaringes naíves, observou-se diferença significativa do grau de fibrose,

desde a primeira (p-valor=0,0041) até a oitava semana pós-operatória (p-valor=0,0131) (Figura 5). Todavia, sem diferença estatística quando comparadas com as laringes sham da primeira à última semana do estudo (Figura 5).

4.3 Neovascularização

A implantação de PLGA produziu marcante presença de neovascularização entre a 1ª e a 4ª semana pós-cirúrgica. Nas duas primeiras semanas de pós-operatório, a neovascularização entre os lados implantados com PLGA foi semelhante ao lado sham-operado (p-valor=0,0053), demonstrando que tanto o implante quanto a manipulação cirúrgica podem ter sido responsáveis pela formação de neovasos. A partir da 4ª semana, verificou-se ausência de neovascularização nas laringes sham-operadas, ficando de modo semelhante às laringes naive. Em oito semanas de pós-operatório, as hemilaringes implantadas com PLGA também apresentaram ausência de neovascularização, demonstrando recuperação completa dessa característica nesse período (Figuras 5 e 6).

4.4 Necrose

A prevalência de necrose foi baixa, tanto nas hemilaringes implantadas com PLGA como nas sham-operadas. Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos implantados com PLGA, sham-operados e as hemilaringes sem manipulação cirúrgica (p-valor=0,0719) (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Gráficos demonstrando a porcentagem de laringes, em relação às semanas do estudo e do tipo de cirurgia (sham vs PLGA). **(A)** Avaliação do grau de inflamação; **(B)** Avaliação do grau de fibrose; **(C)** Avaliação da neovascularização; **(D)** Avaliação da presença de necrose

Figura 6 - Fotografias representativas de cortes histológicos das hemilaringes implantadas com PLGA, sham-operadas e naive, corados por hematoxilina-eosina, com aumento de 200x, em diferentes tempos pós-manipulação cirúrgica. **(A)** (PLGA) e **(B)** (sham): uma semana; **(C)** (PLGA) e **(D)** (sham): duas semanas; **(E)** (PLGA) e **(F)** (sham): quatro semanas; **(G)** (PLGA) e **(H)** (sham): oito semanas; **(I)** naive

4.5 Concentração de colágeno

A concentração total de colágeno não apresentou diferença estatística significativa, quando comparado o grupo de hemilaringes implantadas com PLGA com o grupo sham, em nenhum momento entre uma e oito semanas ($p=0,6585$, na primeira semana; $p\text{-valor}=0,9023$ na segunda semana; $p\text{-valor}=0,2850$ na quarta semana e $p\text{-valor}=0,5063$ na oitava semana (Figuras 7 e 8). Entretanto, quando esses grupos foram comparados separadamente do grupo sem manipulação, apenas o grupo sham de eutanásia após quatro semanas do procedimento cirúrgico não apresentou diferença ($p\text{-valor}=0,1896$), nos demais grupos observou-se concentração de colágeno maior do que no grupo não manipulado. A concentração de colágeno tipo I, considerada como a soma dos colágenos vermelho, alaranjado e amarelo, não foi estatisticamente diferente em nenhuma semana do estudo, quando comparado o grupo implantado com PLGA com o grupo de cirurgia sham (uma semana $p\text{-valor}=0,5853$; duas semanas $p\text{-valor}=0,5264$, quatro semanas $p\text{-valor}=0,3111$ e oito semanas $p\text{-valor}=0,4047$) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Distribuição da quantidade de colágeno nos diferentes grupos de hemilaringes implantados com PLGA e com cirurgia sham, nos diferentes tempos do estudo. Não houve diferença estatística da concentração de colágeno entre os lados implantado com PLGA e sham-operados em nenhum tempo avaliado. Todos os grupos apresentaram maior concentração de colágeno em relação ao grupo naive, com exceção do grupo sham-operado de quatro semanas

Figura 8 - Fotografias obtidas por microscopia de contraste de luz, representativas de cortes histológicos das hemilaringes implantadas, corados por *Sirius Red*, com aumento de 50x, em diferentes tempos pós-manipulação cirúrgica. **(A)** (PLGA) e **(B)** (sham): uma semana; **(C)** (PLGA) e **(D)** (sham): duas semanas; **(E)** (PLGA) e **(F)** (sham): quatro semanas; **(G)** (PLGA) e **(H)** (sham): oito semanas, **(I)** naive

4.6 Pesquisa de PGLA por espectroscopia

A avaliação por espectroscopia demonstrou a presença de bandas típicas de PLGA no animal representativo de uma semana em 1749 cm^{-1} , atribuída à frequência do estiramento de grupos carbonilas (C=O) de ésteres. No coelho de duas e quatro semanas, houve a presença de bandas em 2995 cm^{-1} , estiramento atribuído ao grupo metila (C-H), e em 1452 e 1000 cm^{-1} , eventos relativos ao estiramento de ligações (C-O) e (O-H), respectivamente. Estes dados indicam a presença da molécula de PLGA nas amostras analisadas dos animais representativos de uma, duas e quatro semanas de pós-operatório (Figura 9).

Figura 9 - Espectros na região do infravermelho de hemilaringes de coelhos submetidos à colocação de implante de PGLA em uma semana **(A)** e quatro semanas **(B)**. As bandas de estiramento demonstram a presença dos grupos químicos que constituem a molécula do biomaterial, sugerindo que ainda há material de PLGA nos tecidos laríngeos avaliados

Nas amostras do coelho de oito semanas e do animal sem manipulação, não foram encontradas bandas típicas de PLGA. Contudo, não foi possível afirmar que não havia material polimérico nessas amostras. Isso se deve ao fato de a quantidade de resíduo recuperado, após o preparo das amostras, ter sido muito pequena, o que pode ter comprometido a análise.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas as reações histopatológicas decorrentes da implantação cirúrgica de PLGA na laringe, com o intuito de elucidar uma potencial aplicabilidade clínica deste bioimplante no tratamento de doenças laringeas. Para tanto, compararam-se as alterações histopatológicas decorrentes da implantação cirúrgica do PLGA na laringe com hemilaringes sham-operadas ou não-manipuladas (naive).

De modo geral, observou-se significativa infiltração de células inflamatórias nas primeiras semanas pós-implantação de PLGA na laringe de coelhos, acompanhada, de modo semelhante, pela presença de neovascularização e fibrose. A resposta inflamatória inicial foi marcada, predominantemente, por uma reação de corpo estranho, caracterizada por formação de células gigantes polimorfonucleares, além de monócitos e neutrófilos. Após oito semanas, entretanto, observou-se recuperação quase que completa das alterações histológicas encontradas na fase aguda, retornando às suas características normais, semelhante às laringes não manipuladas cirurgicamente. Ainda, apesar do maior grau de fibrose encontrado até a 4ª semana pós-operatória nas avaliações histológicas com HE, não foram observados depósitos aumentados de colágenos tipo I ou III nas laringes desses animais, em nenhum dos tempos avaliados (até oito semanas).

Outros polímeros de PLGA, com outras concentrações específicas, como é o caso do PLGA/Pluronic F127, também já foram testados na laringe em outras ocasiões. A implantação de nanoesferas de PLGA/Pluronic F127 também apresentou formação de células gigantes na laringe, mas com pouca reação inflamatória no tecido implantado (LEE et al., 2014). Em laringes avaliadas um ano após a implantação dessas nanoesferas de PLGA para o tratamento de paralisia de PV, células gigantes ainda foram encontradas, demonstrando que em materiais que apresentam longa persistência (KWON et al., 2014), é comum se verificar reação de corpo estranho por longo prazo. Entretanto, nesses mesmos estudos, o PLGA sob a forma de nanoesferas não causou prejuízos na vibração da lâmina própria da PV.

O processo de reparação tecidual, na maioria dos tecidos, acontece de modo mais intenso nos períodos mais precoces, geralmente nas duas primeiras semanas de evolução. Entre o 4º e o 14º dia de cicatrização da ferida, normalmente ocorrem intensa reepitelização, angiogênese e formação precoce de matriz extracelular.

Durante a reepitelização, os macrófagos estimulam os fibroblastos a produzirem fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos para criar a matriz provisória que será, eventualmente, substituída por colágeno na fase de remodelação madura (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

No presente estudo, a experimentação com o implante de PLGA promoveu significativa indução de formação de neovasos na laringe, por pelo menos até a 4ª semana de avaliação. Por outro lado, poucas foram as ocasiões em que se verificou necrose tecidual, com evidência significativa até a segunda semana de evolução.

O processo de fibrose, neste estudo, também ficou mais intenso do lado implantado com PLGA, estando mais exacerbado na primeira semana, mas ainda presente até a oitava semana do experimento. O lado sham-operado também mostrou evolução semelhante, sugerindo que a fibrose presente nas laringes manipuladas cirurgicamente (PLGA e sham-operado) deveu-se mais ao ato cirúrgico, propriamente dito, do que pela presença do bioimplante de PLGA.

Como a ultraestrutura histológica da PV é muito importante para a manutenção de uma boa onda mucosa e, conseqüentemente, para a boa fonação (HIRANO et al., 2009), a quantidade de colágeno produzida na cicatriz foi outro importante parâmetro analisado neste estudo. Apesar da maior ocorrência de fibrose até quatro semanas após a implantação de PLGA na laringe, não se observou aumento da concentração de colágeno nos diferentes tempos avaliados. De modo semelhante, outros estudos, nos quais foram injetadas nanopartículas encapsuladas de polímero de ácido láctico e glicólico, hidrogel ou microtubos de lipídeo na laringe também não evidenciaram depósito excessivo de colágeno ou de reação inflamatória significativa localmente (KISHIMOTO et al., 2010; KOLACHALA et al., 2011; KOSINSKI et al., 2015; LEE et al., 2014; XIE et al., 2007).

No processo cicatricial, geralmente se verifica aumento da concentração de colágeno tipo I, que se instala de modo desorganizado (THIBEAULT et al., 2002), e está associado ao aumento da concentração de fibronectina e diminuição da densidade do ácido hialurônico no sítio lesado. Ainda, a elastina pode se encontrar em concentração diminuída (HIRANO et al., 2009), ou ainda formar emaranhados desorganizados, com fibras mais curtas, mais finas e menos onduladas (ROUSSEAU et al., 2013). Esse processo cicatricial pode causar rigidez na PV,

diminuindo a capacidade ondulatória da lâmina própria e, conseqüentemente, produzir disфонia de difícil controle (HIRANO, 2005). Tais alterações histológicas ressaltam a importância da ação dos fibroblastos no processo cicatricial de lesões da PV (ROUSSEAU et al., 2013).

As respostas inflamatórias moderadas e transitórias, observadas no presente estudo com o PLGA, demonstram potencial utilidade clínica desse dispositivo no tratamento de doenças laringeas. Os coelhos utilizados neste estudo não apresentaram nenhum tipo de complicação relacionada à implantação de PLGA, como desconforto respiratório ou sinais de infecção secundária após o procedimento cirúrgico. Também, nenhum deles morreu ou necessitou de eutanásia antes do tempo previsto no experimento.

Um implante de PLGA, já aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), e que vem apresentando bons resultados na otorrinolaringologia é o Propel®, um dispositivo de uso intranasal que libera mometasona dentro de quatro semanas. Esse implante é colocado em contato com a mucosa nasal, semelhante a um *stent* armado, que pode ser colocado tanto no intraoperatório como no próprio consultório, com boa tolerabilidade dos pacientes (PARIKH et al., 2014). Esse implante tem se mostrado eficaz no controle das recidivas de polipose nasal, reduzindo a necessidade de intervenções cirúrgicas (MARPLE et al., 2012).

O implante de PLGA, utilizado neste estudo, foi um microbastão rígido e de pouca maleabilidade, a fim de facilitar a introdução do dispositivo em um tecido denso, sem fragmentação do material. No entanto, devido ao tamanho da laringe do coelho e das dificuldades técnicas de se implantar pela via natural, utilizando microscópios ou mesmo endoscópios, adotou-se a técnica de laringofissura anterior. Assim, a implantação do material acabou se localizando em porções histológicas um pouco mais profundas do que se pretende utilizar em humanos, ficando internamente ou próxima ao músculo vocal. Contudo, a implantação do PLGA nas camadas mais profundas da lâmina própria desses animais não invalida a extrapolação de resultados encontrados nas camadas mais superficiais da PV. Dessa forma, acredita-se ser importante a revalidação destes resultados em camadas mais superficiais das PVs.

Um possível fator limitante deste estudo foram as diferenças histológicas da PV de coelhos, quando comparadas às de humanos adultos. A camada intermediária e profunda que formam o ligamento vocal, por exemplo, são estruturas presentes apenas em humanos e não encontradas em outros mamíferos (HIRANO et al., 2009). Além disso, outro limitador da pesquisa em coelhos foi o fato de que, em condições normais, esse animal permanece em repouso vocal, o que impossibilita a avaliação de qualidade vocal (BRANSKI et al., 2005). Apesar desses limitantes, o modelo de cicatrização em coelhos é considerado um bom método para investigação das respostas às injúrias das PVs e aceitos eticamente para se avançar na compreensão das mudanças histológicas e biomecânicas que ocorrem após injúria nesse órgão (ROUSSEAU et al., 2004). Por se tratar de uma avaliação pré-clínica, optou-se por este modelo animal para servir como referência para futuras aplicações clínicas.

Embora existam alguns estudos avaliando a histocompatibilidade do PLGA em diferentes tecidos, os seus efeitos na PV ainda são pouco investigados. Este implante causa pouca alteração histopatológica, com grande potencial para carrear e liberar drogas de maneira lenta e controlada. Baseado em suas características e em resultados de outros estudos realizados em diferentes órgãos-alvo, algumas aplicabilidades do bioimplante de PLGA podem ser testadas na laringologia, com variados objetivos. Um deles é diminuir a reação inflamatória causada por fonocirurgias, assim como a cicatriz, em si, provocada por esses procedimentos, por meio da associação com anti-inflamatórios e fatores de crescimento. Por ser um material em que o pesquisador define a concentração de cada ácido no momento da fabricação; determinando, assim, a durabilidade do produto final, o PLGA também pode ser usado para preencher PVs, no intuito de minimizar a insuficiência glótica originada por doenças, ou mesmo por procedimentos cirúrgicos. Alguns estudos têm demonstrado que o PLGA é eficiente como carreador de drogas para o tratamento de tumores de laringe (XIE et al., 2007). No entanto, não existem relatos da aplicabilidade desse material no tratamento da papilomatose laríngea. O PLGA poderia ser associado ao cidofovir ou outros imunobiológicos e ser implantado na PV, com o intuito de prolongar seu tempo de efeito terapêutico com dissipação controlada da droga; evitando-se, assim, um número excessivo de procedimentos

cirúrgicos e de injeções intralesionais em pacientes com papilomatose laríngea. Da mesma maneira, outras drogas como corticosteroides, anti-VEGF (Fator anticrescimento vascular endotelial), quimioterápicos, antibióticos ou mesmo antivirais poderiam ser associados ao PLGA e serem úteis no tratamento de diversas doenças crônicas que acometem a laringe.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo verificamos que bastões de PLGA, quando implantados na laringe de coelhos, promovem reações inflamatórias nas primeiras semanas após a aplicação, mas com reversão completa das alterações histológicas em oito semanas. Ainda, a implantação de PLGA não promoveu alteração no depósito de colágenos tipos I e III, acompanhada de reabsorção completa do bioimplante.

Assim, foi possível concluir que o implante de PLGA é seguro para aplicações intralaringeas, apresentando potencial aplicabilidade clínica no tratamento de doenças laríngeas, especialmente como veículo de liberação lenta de drogas. Novos ensaios clínicos serão necessários para explorar a utilização deste material na prática médica otorrinolaringológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Elaboração de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 3ª Ed. Revisada, Ampliada e Modificada. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

ARNOLD, G. E. Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia IX. Technique of intracordal injection. **Arch Otolaryngol**, v. 4, n. 76, p. 358-368, 1962.

BENNINGER, M. S. et al. Vocal fold scarring: current concepts and management. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 5, n. 115, p. 474-482, nov 1996.

BRANSKI, R. C. et al. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 1, n. 114, p. 19-14, jan 2005.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 7, Suppl, n. 117, p. 12s-34s, jun 2006.

BRUENING, W. Über eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslähmung. **Verhandl Ver Dtsch Laryngol**, v. 18, p. 93-151, 1911.

CATTEN, M. et al. Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 5, n. 118, p. 663-667, may 1998.

COUCHMAN, J.R.; WOODS, A. Structure and biology of pericellular proteoglycans. In: Roberts, D. D.; Mecham, R. P. (eds.). **Cell surface and extracellular glycoconjugates: structure and function**, New York: Academic Press, 1993. p. 33-82.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended to intraocular application. **Drug Deliv**, n. 12, p. 109-116, mar-apr 2005.

FIALHO, S. L. et al. Safety and pharmacokinetics of na intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Curr Eye Res**, v. 31, n. 6, p. 525-534, jun 2006.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. Drug delivery systems for the posterior segment of the eye: Fundamental basis and applications. **Arq Bras Oftalmol**, v. 1, n. 70, p. 173-179, jan-fev 2007.

FIALHO, S. L. et al. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. **J Drug Del Sci Tech**, v. 1, n. 17, p. 93-97, 2007.

FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly(-caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 68, n. 3, p. 637-646, mar 2008.

FLINT, P. W.; CORIO, R. L.; CUMMINGS, C. W. Comparison of soft tissue response in rabbits following laryngeal implantation with hydroxylapatite, silicone rubber and teflon. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, n. 106, n. 5, p. 399-407, may 1997.

FORD, C. N. Histologic studies of the fate of soluble collagen injected into canine vocal. **Laryngoscope**, n. 96, n. 11, p. 1248-1257, nov 1986.

GRAY, S. D. et al. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 109, n. 1, p. 77-85, jan 2000.

GRINNELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 264 – 269, may 2003.

HALLEN, L.; DAHLQVIST, A.; LAURENT, C. Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. **Laryngoscope**, v. 108, n. 3, p. 393-397, mar 1998.

HAMILTON, N. J. I.; BIRCHALL, M. A. Tissue-engineered larynx: Future applications in laryngeal cancer. **Curr Otorhinolaryngol Rep**, v. 5, n. 1, p. 42-48, 2017.

HIRANO, M. Structure of vocal fold in normal and disease states. **Anat Phys Stud**, v. 11, n. 1, p. 11-30, 1981.

HIRANO, M.; SATO, K. **Histological color atlas of the human larynx**. San Diego: Singular Pub. Group, 1993.

HIRANO, S. et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. **Laryngoscope**, v. 114, n. 3, p. 578-556, 2004, mar 2004.

HIRANO, S. Current treatment of vocal fold scarring. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 13, n. 3, p. 143-147, jun 2005.

HIRANO, S. et al. Histologic characterization of human scarred vocal folds. **J Voice**, v. 23, n. 4, p. 399-407, jul 2009.

HOLLINGWORTH, J. B.; KOHLMOS, H. W.; McNAUGHT, R. C. Treatment of juvenile papilloma of larynx with resin of podophylluma. Preliminary report . **Arch Otolaryngol**, v. 52, n. 1, p. 82-87, jul 1950.

HÜBNER, G. et al. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 548-556, jul 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscop. **Arch Histol Cytol**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

KISHIMOTO, Y. et al. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. **Laryngoscope**, v. 120, n. 1, p. 108-113, jan 2010.

KOLACHALA, V. L. et al. The use of lipid microtubes as a novel slow-release delivery system for laryngeal injection. **Laryngoscope**, v. 121, n. 6, p. 1237-1243, jun 2011.

KONO, T. et al. Multidimensional vocal assessment after laser treatment for recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, v. 127, n. 3, p. 679-684, mar 2017.

KOSINSKI, A. M. et al. Dexamethasone Controlled Release on TGF-1 Treated Vocal Fold Fibroblast. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 124, n. 7, p. 572-578, jul 2015.

KWON, S. K. et al. Vocal fold augmentation with injectable polycaprolactone microspheres/pluronic F127 hydrogel: long-term in vivo study for the treatment of glottal insufficiency. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85512, jan 2014.

LEE, J. H. et al. Evaluation of the poly(lactic-co-glycolic acid)/pluronic F127 for injection laryngoplasty in rabbits. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 151, n. 5, p. 830-835, jan 2014.

MARPLE, B. F. et al. Advance II: a prospective, randomized study assessing safety and efficacy of bioabsorbable steroid-releasing sinus implants. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 146, n. 6, p. 1004-1011, jun 2012.

MARTIN, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, apr 1997.

NAKAI, Y. et al. Microvascular structure of the larynx. A scanning electron microscopic study of microcorrosion casts. **Acta Otolaryngol Suppl**, v. 486, p. 254-263, 1991.

PARIKH, A. et al. Eluting nasal implants: formulation, characterization, clinical applications and challenges. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 2, p. 249-267, mai 2014.

PERAZZO, P. S. L. et al. Estudo preliminar do comportamento histológico da PV do coelho após injeção de ácido hialurônico. **Rev Bras Otorrinolaryngol**, v. 73, n. 2, p. 171-178, 2007.

ROUSSEAU, B. et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. **J Voice**, v. 18, n. 1, p. 116-124, mar 2004,

ROUSSEAU, B. et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. **Laryngoscope**, v. 113, n. 4, p. 620-627, apr 2013.

SATO, K. Reticular fibers in the vocal fold mucosa. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 107, n. 12, p. 1023-1028, dec 1998.

SCHRAMM, V. L.; MAY, M.; LAVORATO, A. S. Gelfoam paste injection for vocal cord paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence. **Laryngoscope**, v. 88, n. 8 Pt 1, p. 1268-1273, aug 1978.

SPREKELSEN, M. et al. Particulate silicone for vocal fold augmentation: morphometric evaluation in a rabbit model. **Ann Rhinol Laryngol**, v. 113, n. 41, p. 234-113, mar 2004.

STEIN, J. et al. Histopathologic study of alternative substances for vocal fold medialization. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 109, n. 2, p. 221-226, 2000.

SUEHIRO, A. et al. Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: a canine study. **Acta Otolaryngol**, v. 130, n. 7, p. 844-850, jul 2010.

THIBEAULT, S. L. et al. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. **J Voice**, v. 16, n. 2, p. 96-104, mar 2002.

THIBEAULT, S. L. et al. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. **Laryngoscope**, v. 114, n. 4, p. 760-764, apr 2004.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Arch Histol Cytol**, v. 65, n. 2, p. 109-126, jun 2002.

WEIGEL, P. H.; FULLER, G. M.; LEBOEUF, R. D. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. **J Theor Biol**, v. 119, n. 2, p. 219-234, mar 1986.

XIE, M. et al. Intratumoral delivery of paclitaxel-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for Hep-2 laryngeal squamous cell carcinoma xenografts. **Anticancer Drugs**, v. 18, n. 4, p. 459-466, apr 2007.

8. ANEXO

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 151/2013, sobre o projeto intitulado “*Avaliação histológica da resposta inflamatória da prega vocal de coelho à presença de implante biodegradável*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Edwin Tamashiro** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de novembro de 2013.

We certify that the protocol nº 151/2013, entitled “*Histological inflammatory responses to a biodegradable vocal fold implant in rabbits*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 11/25/2013.

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP