

Uso de carbonos pirolíticos (Durasphere) no tratamento da insuficiência glótica: estudo experimental em cães

Use of pyrolytic carbon coated beads (Durasphere) to treat glottic failure: an experimental study in dogs

*Domingos Hiroshi Tsuji*¹, *Flavio Akira Sakae*²,
*Rui Imamura*³, *Luis Fernando Ferraz*⁴, *Luiz Ubirajara Sennes*⁵

Palavras-chave: cordas vocais, laringe, voz.
Keywords: vocal cords, larynx, speech.

Resumo / Summary

Nenhum tecido ou substância ideal foi encontrado para a injeção em pregas vocais. O objetivo deste estudo prospectivo foi avaliar o uso do Durasphere como substância de injeção na prega vocal canina. **Materiais e Métodos:** Em seis cães adultos foram injetados 0,3mL de Durasphere no terço médio da prega vocal direita no músculo tireoaritenóideo e 0,3mL de soro fisiológico na prega contralateral. Os animais foram sacrificados após 7 dias (três cães) e 90 dias (três cães). Analisamos os processos inflamatórios no músculo vocal e na lâmina própria das pregas vocais. **Resultados:** No músculo vocal com Durasphere havia uma inflamação significativamente maior que no músculo controle, formou-se um infiltrado linfomononuclear moderado após 7 dias e leve após 90 dias. Não observamos formação de corpos estranhos ou granulomas. Já na lâmina própria houve um processo inflamatório leve nos dois grupos, sem diferença entre eles. **Conclusão:** Trata-se de uma substância com biocompatibilidade comprovada em humanos, com resultados preliminares e inéditos de sua injeção em pregas vocais caninas que causou um processo inflamatório moderado no músculo vocal após 7 dias e leve após 90 dias, sem formação de corpos estranhos ou granulomas.

There is no ideal tissue or substance to be injected in the vocal folds. The objective of the present study was to assess the use of Durasphere in canine vocal fold injection. **Materials and Methods:** in six adult dogs we injected 0.3 mL of Durasphere in the middle third of the thyroarytenoid muscle and 0.3 mL of saline solution in the contralateral vocal fold. The animals were slaughtered after seven days (three dogs) and after 90 days (three dogs). We analyzed the inflammatory process in the vocal fold and in the lamina propria of the vocal folds. **Results:** in the vocal muscle which received Durasphere there was a significantly more intense inflammation when compared to the control muscle - there was a moderate lymphomodular infiltrate after seven days and mild after 90 days. We did not observe foreign bodies nor granulomas. On the lamina propria there was a mild inflammatory process in the two groups, without difference between them. **Conclusion:** this is a substance of proven biocompatibility in humans, with preliminary and unprecedented results and its injection in canine vocal folds caused a moderate inflammatory process after seven days and mild after 90 days, without foreign bodies or granuloma formation.

¹ Livre-Docente em ORL pela USP, Chefe do grupo de Laringe do Hospital das Clínicas da USP.

² Doutor em Ciências pelo Departamento de ORL da USP, Médico assistente em Otorrinolaringologia na PUC de Campinas.

³ Doutor em Ciências pelo Departamento de ORL da USP, Médico assistente em ORL do Hospital das Clínicas da USP.

⁴ Pós-graduando no Departamento de Patologia da USP, Médico assistente do Departamento de Patologia da USP.

⁵ Livre-Docente em ORL pela USP, Prof. Associado do Departamento de ORL da USP.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 20 de setembro de 2008. cod. 6046

Artigo aceito em 10 de dezembro de 2008.

INTRODUÇÃO

O funcionamento normal da laringe necessita que as pregas vocais se aproximem para a fonação e proteção das vias aéreas inferiores. Quando existe falha nesta aproximação por paralisia, atrofia ou fibrose da prega vocal, surge a insuficiência glótica^{1,2,3}. Pacientes incapazes de fechar adequadamente a glote podem sofrer de sintomas que incluem voz fraca, soprosa e aspiração crônica³.

A injeção na prega vocal é uma técnica utilizada para corrigir este problema. As substâncias mais comumente utilizadas para medializar a prega vocal são: teflon, gelfoam, gordura autógena, colágeno e fásia autógena^{1,4,5}.

Nenhum tecido ideal e universalmente aceito para injeção na prega vocal foi encontrado, sendo que cada material tem suas vantagens e desvantagens. Uma nova substância, o Durasphere (Carbon Medical Technologies, St. Paul, Minnesota), composta de partículas de carbono pirolítico suspenso em gel aquoso⁶ foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento da incontinência urinária. Sua função é promover um fechamento (abaulamento) quando injetado na submucosa da uretra próximo ao colo da bexiga, restabelecendo a competência vesical.

A substância ideal para injeção precisa ser biocompatível, durável, não migratória, pouco imunogênica, de fácil injeção e que não altere as propriedades viscoelásticas da prega vocal⁷. Considerando que o Durasphere tem potenciais vantagens que podem ser ideais para a injeção nas pregas vocais, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso do Durasphere como substância de injeção na prega vocal canina para o tratamento da insuficiência glótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 353/04).

Neste estudo foram utilizados 6 cães adultos, de ambos os sexos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem raça definida e peso médio de 10 kg.

O Durasphere (Carbon Medical Technologies, St. Paul, Minnesota) corresponde a glóbulos revestidos por carbono pirolítico suspensos em gel aquoso a 2,8% de glucano (Figura 1). As partículas possuem tamanho que variam de 251 a 300µm.

Com o animal na posição supina e previamente sedado, realizamos uma laringoscopia de suspensão para exposição da região glótica do animal. Foi injetado sob visão microscópica 0,3mL de Durasphere no terço médio da prega vocal direita, lateral ao processo vocal, na profundidade de aproximadamente 3mm no músculo



Figura 1. Durasphere em uma seringa de 1ml.

tireoaritenóideo, utilizando-se uma agulha de 19 gauge. A prega vocal esquerda foi utilizada como controle sendo injetado 0,3mL de soro fisiológico 0,9% na mesma localização da outra prega.

Os animais foram sacrificados após um período de 7 dias (3 cães) e 90 dias (3 cães) e submetidos a uma laringectomia total com dissecação de todas as estruturas anexas à laringe. Separamos as duas pregas vocais e foi obtido um fragmento de cinco milímetros de espessura do terço médio da parte intermembranácea de cada prega vocal compreendendo epitélio, lâmina própria e músculo vocal. O Durasphere que se apresentava como uma massa bem delimitada de consistência pastosa foi retirado cuidadosamente da prega vocal para facilitar os cortes dos blocos de parafina, pois os resultados de um estudo piloto prévio com 5 cães mostraram que após a impregnação na parafina, o Durasphere ficava com uma consistência bastante endurecida, dificultando o corte da parafina com micrótomo, o que produzia laceração do tecido muscular, prejudicando a avaliação histológica.

As pregas vocais foram fixadas em formol a 10%, desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas com xilol, impregnadas pela parafina fundida em estufa a 60 graus, e a seguir cortadas no micrótomo com espessura de 5µm.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. Analisamos a quantidade e o tipo de infiltrado inflamatório local no músculo vocal e na lâmina própria de ambas as pregas vocais, para isso utilizamos um método quantitativo e qualitativo.

O processo inflamatório foi graduado qualitativamente em leve, moderado ou acentuado baseado na intensidade do infiltrado. A presença de reação de corpo estranho ou formação de granulomas também foi observada.

Para a análise quantitativa a fim de avaliar a quantidade de reação inflamatória, foram escolhidos 10 campos aleatórios no músculo vocal e 10 na lâmina própria com

aumento óptico de 400 vezes, sobre o qual se aplicava uma grade quadriculada contendo 10 linhas verticais e 10 linhas horizontais, contabilizando 100 pontos de intersecção. Os pontos foram contados em 2 grupos: pontos de coincidência que continham células inflamatórias e pontos de inclusão correspondendo ao restante dos pontos. O processo inflamatório de cada região foi medido através de uma média dos pontos de coincidência dos 10 campos analisados (Figura 2). Foram comparados os percentuais de inflamação entre as pregas direitas (Durasphere) e esquerdas (controle), sendo agrupado os cães dos dois grupos (7 dias e 90 dias), devido à amostra pequena do estudo. Utilizamos o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas, com o nível de significância de 5%.

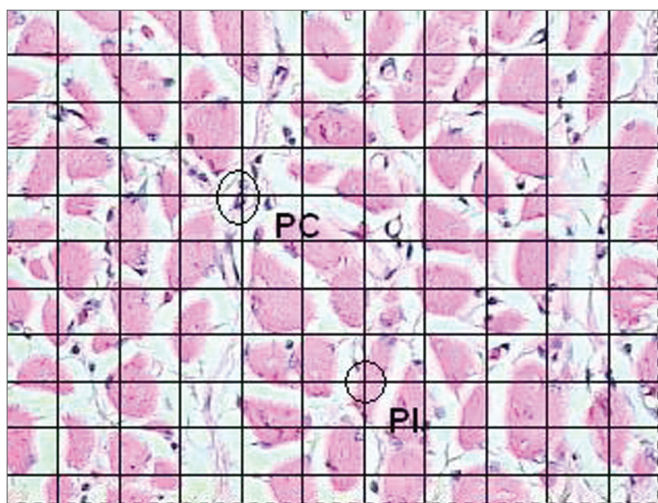


Figura 2. Corte histológico coronal da prega vocal canina direita com sacrifício após 90 dias. Coloração hematoxilina-eosina. Análise quantitativa do processo inflamatório. Grade quadriculada contendo 10 linhas verticais e 10 linhas horizontais, contabilizando 100 pontos de intersecção. Os pontos foram contados em 2 grupos: pontos de coincidência (PC) que continham células inflamatórias e pontos de inclusão (PI) correspondendo ao restante dos pontos. O processo inflamatório de cada região foi medido através de uma média dos pontos de coincidência dos 10 campos analisados (400x).

RESULTADOS

Não foram observadas complicações perioperatórias ou tardias nos animais do estudo. Em dois animais observamos uma pequena extrusão da substância no momento da injeção no músculo vocal.

Na inspeção macroscópica da laringe observamos um visível abaulamento na prega vocal com Durasphere depois de 7 dias e 90 dias. Não observamos presença do Durasphere em outras regiões da laringe.

Na análise histológica das lâminas verificamos que o espaço ocupado anteriormente pelo Durasphere apresentava-se como um espaço vazio (Figura 3). Havia um infiltrado linfomononuclear moderado adjacente a

este espaço no músculo vocal com 7 dias e um infiltrado leve após 90 dias (Figura 4). Não observamos formação de corpos estranhos ou granulomas.

Na lâmina própria das pregas vocais com Durasphere e controle observamos um infiltrado linfomononuclear leve com 7 dias e 90 dias (Figura 5).

O estudo quantitativo do processo inflamatório revelou que no músculo vocal com Durasphere a inflamação apresentava-se significativamente maior que no músculo controle. Já na lâmina própria não houve diferença no processo inflamatório entre as duas pregas (Quadro 1).

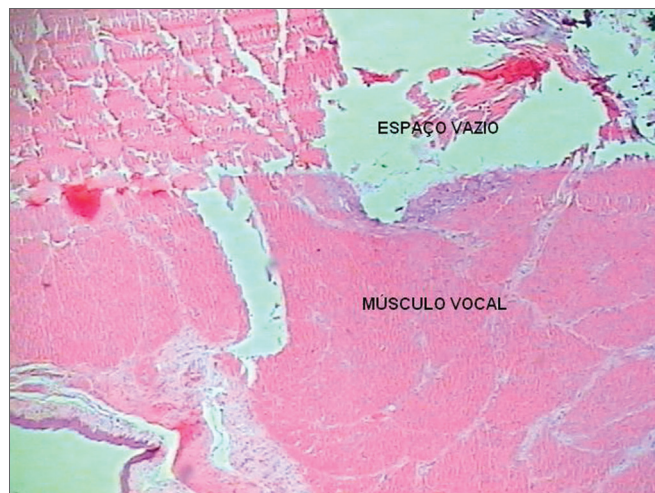


Figura 3. Corte histológico coronal da prega vocal canina direita com sacrifício após 90 dias. Coloração hematoxilina-eosina. Observamos um espaço vazio no músculo vocal após a retirada do Durasphere (50x).

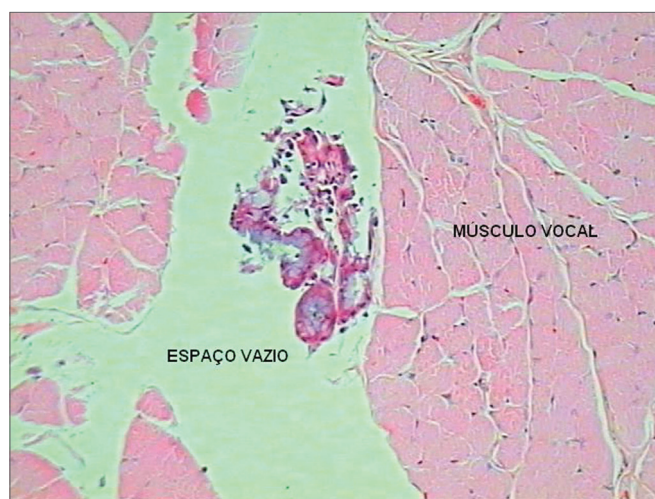


Figura 4. Corte histológico coronal da prega vocal canina direita (Durasphere) com sacrifício após 90 dias. Coloração hematoxilina-eosina. Observamos um infiltrado linfomononuclear leve no músculo vocal adjacente ao espaço vazio (200x).

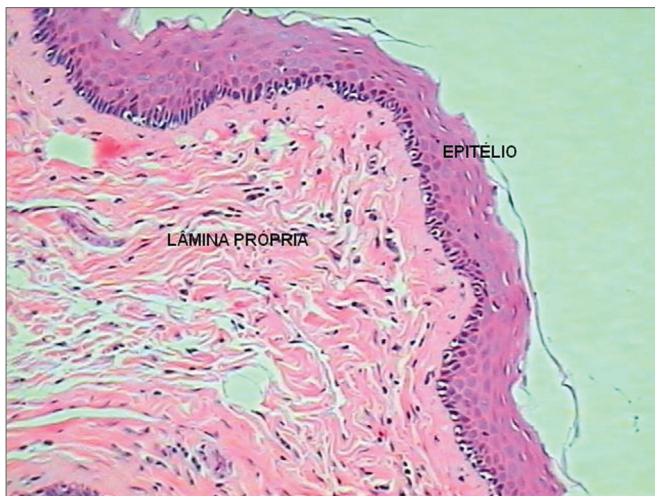


Figura 5. Corte histológico coronal da prega esquerda (controle) de um animal com sacrifício após 90 dias. Coloração hematoxilina-eosina. Observamos a lâmina própria com infiltrado linfomononuclear leve (aumento de 200x).

Quadro 1. Análise quantitativa do processo inflamatório em 6 cães (p <0,05)

% Inflamação	PVD (Durasphere) N = 6	PVE (controle) N = 6	p
Lâmina Própria	7,0 ± 2,4	5,8 ± 3,0	0,6
Músculo	9,5 ± 8,4	0,9 ± 0,8	0,046

DISCUSSÃO

O Durasphere tem sido utilizado na prática clínica na submucosa dos tecidos (uretra ou esfíncter anal), porém o uso em laringe para o tratamento da insuficiência glótica é inédito, o que motivou este estudo inicial em cães.

O Durasphere injetado no músculo vocal de cães mostrou uma reação inflamatória moderada e significativamente maior que no músculo controle, sendo um resultado esperado já que se trata de uma substância sintética. Partículas sintéticas como o teflon⁸ apresentam o risco de causar processo inflamatório intenso, porém o Durasphere no músculo vocal não levou a um processo inflamatório intenso, formação de corpos estranhos ou granulomas.

O Durasphere foi testado inicialmente como substância de injeção no tecido periuretral de cães para determinar sua biocompatibilidade e migração. Em avaliações realizadas até 2 anos observou-se um processo inflamatório leve a moderado no período de 7 a 28 dias, que evoluiu para um processo inflamatório crônico leve nos períodos de 3, 6, 12 e 24 meses, envolvendo acúmulos de macrófagos⁹.

A biocompatibilidade em humanos já foi comprovada na prática clínica. Lightner et al.⁶ realizaram um estudo multicêntrico, randomizado, controlado e duplo-cego

com o Durasphere e colágeno bovino como substâncias de injeção para o tratamento da incontinência urinária de estresse em 355 mulheres, entre 26 e 84 anos. Os resultados durante o seguimento de 1 ano revelaram que o Durasphere é uma substância segura e uma alternativa efetiva no tratamento da incontinência urinária, o que esteve de acordo com outros estudos^{10,11}. A efetividade do Durasphere também foi comprovada no tratamento da incontinência fecal¹².

Substâncias sintéticas podem migrar para outros tecidos. Estudos prévios^{8,13} sugerem que partículas maiores que 50µm possuem menor chance de migração. Apesar do nosso estudo não ter avaliado uma possível migração linfática quando injetado na prega vocal, estudo experimental em cães⁹ mostrou que quando injetado no tecido periuretral não houve migração para tecidos linfáticos. Acreditamos que o mesmo ocorra quando injetado na prega vocal. O baixo risco de migração pode ser devido ao fato do Durasphere ser constituído por partículas de maior tamanho (251 a 300µm).

A reabsorção também é um problema das substâncias de injeção. Este estudo não avaliou objetivamente a possível reabsorção do Durasphere, porém a avaliação após 3 meses mostrou a presença do Durasphere em todos os cães e sendo uma substância sintética a possibilidade de reabsorção é menor. Estudo⁷ com a hidroxiapatita revela a possível necessidade de reinjeções ocorra pela absorção do gel aquoso que carregam as partículas, talvez isso também possa ocorrer com o Durasphere.

Em nosso estudo, o Durasphere foi injetado no músculo vocal e apesar de ser uma substância formada por partículas grandes (251 a 300µm), não houve resistência para a sua injeção, provavelmente porque a quantidade injetada foi pequena, cerca de 0,3mL, enquanto que na uretra, onde a injeção é na submucosa, a quantidade é bem maior, em média 4,8mL⁶. O interesse em se injetar no músculo vocal seria pelo fato de não alterar as propriedades viscoelásticas da prega vocal, mantendo as características histológicas da lâmina própria, reforçado pelo fato de não ter ocorrido um processo inflamatório significativo na lâmina própria comparado com a prega vocal controle.

CONCLUSÃO

Trata-se de uma substância com biocompatibilidade comprovada em humanos, com resultados preliminares e inéditos de sua injeção em pregas vocais caninas que causou um processo inflamatório moderado no músculo vocal após 7 dias e leve após 90 dias, sem formação de corpos estranhos ou granulomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duke SG, Salmon J, Blalock D, Postma GN. Fascia Augmentation of the Vocal Fold: Graft Yield in the Canine and Preliminary Clinical Experience. *Laryngoscope*. 2001;111(5):759- 64.

-
2. Hsiung MW, Woo P, Minasian A, Mojica, JS. Fat Augmentation for Glottic Insufficiency. *Laryngoscope*. 2000;110(6):1026-33.
 3. Ford, CN, Bless DM. Clinical Experience with Injectable Collagen for Vocal Fold Augmentation. *Laryngoscope*. 1986;96(8):863-69.
 4. Imamura R, Sennes LU, Chung D, Bohadana S, Tsuji DH. Injeção de gordura na prega vocal: efeitos do local de injeção sobre a configuração glótica e a distribuição espacial da gordura injetada. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(4):445-50.
 5. Zaretsky LS, ShindomL, Detar M, Rice DH. Autologous Fat Injection for Vocal Fold Paralysis: Long-Term Histologic Evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:1-4.
 6. Lightner D, Calvosa C, Andersen R, Klimberg I, Brito CG, Snyder J, et al. A New Injectable Bulking Agent for Treatment of Stress Urinary Incontinence: Results of a Multicenter, Randomized, Controlled, Double-blind Study of Durasphere. *Urology*. 2001;58:12-15.
 7. Chhetri DK, Jahan-Parwar B, Bhuta SM, Hart SD, Berke GS. Injection Laryngoplasty with Calcium Hydroxylapatite Gel Implant in an in Vivo Canine Model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004;113:259-64.
 8. Boedts D, Roels H, Kluyskens P. Laryngeal Tissue Responses to Teflon. *Arch Otolaryngol*. 1996;86:562-7.
 9. Carbon Medical Technologies. Durasphere for the Treatment of Gastroesophageal Reflux: A Post-Market Study. Investigation Plan, 2004.
 10. Anderson RC. Long Term Follow-Up Comparison of Durasphere and Contigen in the Treatment of Stress Urinary Incontinence. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2002;6(4):239-43.
 11. Madjar S, Covington-Nichols C, Secrest CL. New Periurethral Bulking Agent for Stress Urinary Incontinence: Modified Technique and Early Results. *J Urol*. 2003;170(12):2327-9.
 12. Davis K, Kumar D, Poloniecki J. Preliminary Evaluation of an Injectable Anal Sphincter Bulking Agent (Durasphere) in the Management of Faecal Incontinence. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18:237-43.
 13. Malizia AA, Reiman, HM, Myers RP. Migration and Granulomatous Reaction After Periurethral in Polycef (Teflon). *JAMA*. 1984;251:3277-81