

**ROBINSON KOJI TSUJI**

**Uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato no  
tratamento cirúrgico da cavidade mastóidea.  
Estudo experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto

**SÃO PAULO  
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tsuji, Robinson Koji

Uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato no tratamento cirúrgico da cavidade mastóidea. Estudo experimental / Robinson Koji Tsuji. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Rubens Vuono de Brito Neto.

Descritores: 1.Substitutos ósseos 2.Cimentos para ossos 3.Colesteatoma/cirurgia  
4.Processo mastóide/cirurgia 5.Materiais biocompatíveis/uso terapêutico  
6.Osseointegração

USP/FM/SBD-312/08

## Dedicatória

Dedico esta tese, que é a concretização de um grande sonho profissional aos grandes amores da minha vida.

Aos meus pais, Yuso Tsuji e Rinko Tsuji, a quem devo tudo que tenho na minha vida. Pelo amor, pela educação exemplar e pelo sacrifício que possibilitaram que eu seja quem eu sou hoje.

Aos meus irmãos, Silvia Kaoru Tsuji, Marcos Yoshikasu Tsuji, Angela Isumi Tsuji e Augusto Takanori Tsuji, que são minha fonte de amor eterno e incondicional, o porto seguro nos meus momentos mais difíceis e a energia que me faz seguir sempre em frente.

À minha esposa, Patrícia Harumi Tsuji, companheira completa e exemplar, mulher de fibra, que me tira da inércia e me faz crescer. Amor da minha vida, sol que ilumina a minha vida eternamente.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto, Médico Assistente da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), meu orientador e tutor, o grande responsável pelo meu crescimento profissional e acadêmico. Minha eterna gratidão por cada conselho, por cada oportunidade que me foi dada e por ter mudado os rumos da minha vida profissional. Além disso, um grande amigo e um raro exemplo de profissional competente, honesto e humano. Um exemplo que eu sigo na minha vida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUSP, pela oportunidade e confiança que me foram dadas nesta clínica, que sob seu comando e dinamismo cresce a cada dia.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan, pela sua generosidade em compartilhar comigo e com todos os residentes a sua imensa sabedoria. Formador de gerações de médicos. Um mestre.

Ao Prof. Dr. Aroldo Miniti, Professor Titular da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUSP durante todo o meu período de residência e especialização, por ter criado este serviço de excelência no qual pude aprender imensamente.

À Prof. Dra. Vanda Jorgeti, médica assistente do Departamento de Nefrologia do HCFMUSP, pela inestimável contribuição para a realização desta tese. Exemplo de pessoa humana que se preocupa com seus pacientes e com as pessoas que trabalham a sua volta.

Ao Prof. Dr. Renato Paulo Choupard do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (laboratório de tecido mineralizados), pela inestimável contribuição para a realização desta tese. A realização dos cortes histopatológicos só foi possível graças à técnica de polimento que me ensinou.

Ao Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji, por me ensinar que o médico deve sempre buscar a perfeição no seu trabalho. Seus ensinamentos me acompanham a cada paciente que eu atendo e a cada cirurgia que eu faço. Exemplo de sucesso profissional a ser alcançado.

Ao Prof. Dr. Silvio Monteiro Maroni, Professor Titular da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas pela acolhida em seu serviço e pela sua amizade.

Ao Dr. Rui Imamura, pelas críticas e sugestões no exame de qualificação que ajudaram a engrandecer este trabalho. Exemplo de postura profissional e conhecimento.

Aos Drs. Michel Burihan Cahali e Luis Antonio Prata de Figueiredo, pelas suas contribuições e sugestões oportunas como participantes da banca da aula de qualificação.

À Dra. Maria Valéria Goffi Gomez, pelo nosso trabalho conjunto no Grupo de Implante Coclear do HCFMUSP, pelas nossas conversas e discussões, crescemos juntos a cada dia.

A todos os assistentes da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUSP, que sempre me ensinaram e me respeitaram e que contribuem cada um a seu modo, com a grandeza desta instituição.

À minha amiga Dra. Raquel Aguiar Tavares, companheira de preceptoría e de todos os momentos.

À minha amiga Francine Grecco de Melo Pádua, pelo prazer de sua companhia no dia a dia do departamento, pelas nossas conversas e pelos seus conselhos.

Aos meus colegas de residência, Dra. Cláudia Galindo, Dr. Fábio Lorenzetti, Dr. Maurício Poderoso, Dra. Maura Neves, Dra. Renata Marcondes e Dra. Miwa Nita, por todos os momentos felizes que passamos naqueles anos de residência, tempos de pouco dinheiro, mas muitos sonhos.

Aos Fellows do Grupo de Ouvido, Dra. Mariana Hausen, Dr. Sandro Sergio Muniz da Silva, Dr. Aquiles Figueiredo Leal e Dra. Graziela de Souza Queiroz Martins por me ajudarem no dia a dia da clínica, principalmente quando precisei me ausentar para execução desta tese.

A todos os residentes que mantêm o funcionamento da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUSP, pela jovialidade que torna prazerosa o exercício de nosso trabalho.

Às fonoaudiólogas do Grupo de Implante Coclear do HCFMUSP, Cristina Ornelas, Mariana Guedes e Ana Tereza de Matos Magalhães pelo convívio e pela dedicação ao nosso grupo.

À Márcia, Bárbara, Marileide, Lucy, Ofélia, Lúcia, Jorge, Edizira e Ana Paula pela atenção, disponibilidade, e pelo respeito que sempre me trataram.

Ao meu avô materno Massayoshi Fukuyama, ex-combatente japonês da segunda guerra mundial, que me ensinou que honestidade e honra são mais preciosos que dinheiro e sucesso profissional. Já há muitos anos se foi, porém sinto sua presença me vigiando e protegendo em todos os momentos

### Agradecimentos Especiais

**À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,**  
que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que  
dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

**Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico,** pela contribuição financeira através da bolsa de estudos e da  
taxa de bancada, incentivo fundamental durante o período de pós-graduação.



Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

## SUMÁRIO

Normas da revista

Artigo

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO .....	01
2	OBJETIVOS.....	06
3	REVISÃO DA LITERATURA .....	08
3.1	Histologia Óssea.....	09
3.2	Biocompatibilidade.....	11
3.3	Técnicas de Obliteração da Cavidade Mastóidea .....	13
3.4	O Modelo Animal .....	15
3.5	Materiais Aloplásticos .....	17
3.6	Implantes Aloplásticos de Cálcio e Fosfato .....	18
3.6.1	Cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato.....	20
3.7	Complicações Relacionados a Implantes Aloplásticos em Osso Temporal....	23
3.8	Osteoneogênese em Implantes Ósseos.....	25
4	MÉTODOS .....	27
4.1	Material .....	28
4.1.1	Seleção dos animais .....	28
4.2	Métodos .....	29
4.2.1	Preparação dos animais .....	29
4.2.2	Protocolo anestésico.....	29
4.2.3	Grupos de estudo.....	29
4.2.4	Protocolo cirúrgico .....	30
4.2.4.1	Protocolo cirúrgico grupo cimento .....	30
4.2.4.2	Protocolo cirúrgico grupo controle .....	35
4.2.5	Sacrifício dos animais .....	35
4.2.6	Protocolo de análise clínica .....	36
4.2.7	Protocolo de análise histológica .....	37
4.2.7.1	Procedimento de retirada do osso temporal.....	37
4.2.7.2	Técnica de preparo do material para estudo histopatológico .....	38
4.2.7.3	Estudo histopatológico .....	39
4.2.8	Análise dos dados .....	39
4.2.8.1	Análise da resposta inflamatória.....	40
4.2.8.2	Análise das complicações.....	41
4.2.8.3	Análise do grau de ossificação.....	41
4.3	Análise Estatística .....	43
5	RESULTADOS .....	44
6	DISCUSSÃO .....	52
7	CONCLUSÕES .....	62
8	ANEXOS .....	64
9	REFERÊNCIAS .....	67

## Normas da revista

### Otology & Neurotology

[Online Submission and Review System](#)

### Author Resources

[Instructions for Authors \(this page\)](#)

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

[ePrints](#)

[Reprints](#)

#### SCOPE

Otology & Neurotology is a peer-reviewed, multidisciplinary journal directed to an audience of physicians who are interested in both clinical and basic science aspects of otology, neurotology, and cranial base surgery. The Journal publishes original articles in the form of clinical and basic research and scientific advances. Special features include a clinical forum to discuss controversial patient management issues, brief communications on emerging technology and technical surgical issues, historical issues, and occasional state-of-the-art reviews. Editorials on topics of current interest are welcome but should be discussed with the Editor-in-Chief before submission.

#### MANUSCRIPT SUBMISSION

**Online manuscript submission:** All manuscripts must be submitted online through the Web site at <http://on.editorialmanager.com>. **First time users:** Please click "Author & Reviewer Info" from the menu on the left-hand side of the page. Then on the following page, please click the Register button from the main menu and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, you do not have to register again, even if your status changes (i.e., author, reviewer, or editor). **Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contact Marianna Fiorini, Managing Editor, [marianna.fiorini@wolterskluwer.com](mailto:marianna.fiorini@wolterskluwer.com), phone: (215) 521-8350, fax: (215) 521-8488. Requests for help and other questions will be addressed in the order received.

Electronic files should be submitted in a standard word processing format; Microsoft Word (or Corel WordPerfect) is preferred. Although conversions can be made from other word processing formats, the vagaries of the conversion process may introduce errors. Do not submit ASCII text files. Do not use automatic numbering or footnotes for references. The Journal does not assume responsibility for errors in the conversion of customized software, newly released software, and special characters. Authors preparing manuscripts on Macintosh computers should do a final save by choosing the "Save As" command from the "file" menu.

#### ETHICAL/LEGAL CONSIDERATIONS

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Lippincott Williams & Wilkins. If the work being submitted has been published previously in another language, please disclose this information with the submission of the manuscript.

Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher. A summary of the Journal's policy on redundant publication is available (Otol Neurotol 2003;24:131).

**Authorship:** To qualify for authorship, a contributor must have fulfilled each of the following criteria: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. All persons designated as authors should qualify

for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for its content.

**Disclosure of Competing Interest:** All listed authors are required to disclose any financial support they received that relates in any way to information contained in the manuscript. All authors must also disclose support for the reported research or other financial interests related to the study reported.

**Patient anonymity and informed consent:** It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures.

**Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements:** A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

**IRB Approval:** When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration (*JAMA* 2000;284:3043–3049). When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed.

For experiments on human or animal subjects, please provide the institutional affiliation of the Institutional Review Board or Animal Use Committee that provided consent for the research described in the report. Please also provide the protocol or application number and the name of the Principal Investigator submitted to the Institutional Review Board or Animal Use Committee for review of your research.

**Copyright:** All authors must sign a copy of the Journal's "Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer" form and submit it with the original manuscript. You may fax or mail your copyright form to Adam Nicely at Lippincott Williams & Wilkins, 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106, USA; Fax: (215) 521-8488.

**Permissions:** Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Lippincott Williams & Wilkins.

#### **Preparation of Manuscript**

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

**Title page: Title page must be submitted as a separate file.** Include on the title page (a) complete manuscript title; (b) short running head; (c) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations; (d) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; (e) address for reprints if different from that of corresponding author; (f) sources of support that require acknowledgment; and (g) disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH), Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute (HHMI), and other(s).

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

**Structured Abstract:** A concise abstract of no more than 250 words is required for all original clinical and basic science contributions, including review articles. No reference citations should be included in the abstract. To facilitate rapid indexing and assimilation into the medical literature, abstracts should be organized according to the outlines listed under the Article Types section.

**Text:** Organize the manuscript into four main headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical and industry support, in an

Acknowledgments paragraph. *Authors are required to target a manuscript length of 3500 words or less (this count is for the main text only; it excludes the abstract, references, acknowledgments, figures, and tables).*

**Abbreviations:** For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

**Minimal Reporting Guidelines:** Otolaryngology & Neurotology requires that contributors use a standard format for data presentation for certain subject areas in which well-recognized uniform standards have been developed. The goal of this journal's minimal reporting guidelines policy is to facilitate interstudy comparability by future investigators and thus to permit more meaningful meta-analyses. The data sets required are intended to serve only as guidance. It is not the intention of this policy to discourage innovative data interpretations or the use of novel presentation formats. Authors are welcome to present their data in any format that they consider valid and informative, as long as data also are included in the standardized format. The following reference sources contain the guidelines to be used in presenting data in *Otolaryngology & Neurotology*:

- Minimum reporting standards adopted by *Otolaryngology & Neurotology* (Jackler RK. Comparability in reporting outcomes: a scientific imperative. *Am J Otol* 1996;17:811–2.)
- Grading of facial nerve function (Hous JW, Brackmann DE. Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985;93:146–7.)
- Evaluation of therapy in Ménière's disease (Guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181–5.)
- Results of treatment for conductive hearing loss (Guidelines for the evaluation of results of treatment of conductive hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:186–7.)
- Hearing preservation in acoustic neuroma surgery (Guidelines for the evaluation of hearing preservation in acoustic neuroma (vestibular schwannoma). *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:179–80.)

**References:** The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance. Cite unpublished data—such as papers submitted but not yet accepted for publication and personal communications, including e-mail communications—in parentheses in the text. If there are more than six authors, name only the first three authors and then use et al. Refer to the *List of Journals Indexed in Index Medicus* for abbreviations of journal names, or access the list at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>. Sample references are given below:

*Journal article [follow AMA style]*

1. Harner SG, Driscoll CLW, Facer GW, et al. Long-term follow-up of transtympanic Gentamicin for Ménière's syndrome. *Otol Neurotol* 2001;22:210–5.

*Book:*

2. Nadol JB, Schuknecht HF. *Surgery of the Ear and Temporal Bone*. New York: Raven Press, 1993. 205–56.

*Chapter in a Book:*

3. Jackson CG, Woods CI, Chironis PN. Glomus jugulare tumors. In: Sekhar LN, Janecka IP, eds. *Surgery of Cranial Base Tumors*. New York: Raven Press, 1993;747–62.

*Journal Article in Press:*

4. Adams JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: A technical note. *Otol Neurotol* 2002 (in press).

*Journal Article in a Foreign Language:*

5. Vlahovich B, Frerebeau P, Billet M, et al. Importance of per-operative angiography in cerebral vascular malformation [in French]. *Neurochirurgie* 1969;15:191–201.

*Internet:*

6. Health Care Financing Administration. 2001 statistics at a glance. Available at: <http://www.hcfa.gov/stats/stathili.htm>. Accessed July 1, 2001. [For referencing Internet documents and web sites generally, see *AMA Manual of Style*, p. 45.]

*Abstract, Comment, Letter to the Editor:*

7. Seidman MD. Surgery for malleus and incus fixation. *Otol Neurotol* 2001;22:271 (letter).

*Unpublished Meeting/Conference Presentation:*

8. Laws ER Jr, Smith M. Fibrin tissue adhesive: a role in transsphenoidal neurosurgery for pituitary tumors. Presented at the 42nd Annual Meeting of the Neurosurgical Society of America, Tuckertown, Bermuda, May 10–13, 1998.

**Figures:** Cite figures consecutively in the text, and number them in the order in which they are discussed. Include the figure number and figure part (1A, 1B, 1C), and an arrow to indicate the top edge of the figure, in the figure file.

**Figure legends:** Legends must be submitted for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

**Color figures:** The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will receive an estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

**Digital figures:** All electronic art can be submitted through the Web-based tracking system <http://on.editorialmanager.com/>

**1. Format:** Electronic art should be created/scanned and saved and submitted either as a TIFF (tagged image file format), an EPS (encapsulated postscript) file, or a PPT (Power Point) file. Please note that artwork generated from office suite programs such as Corel Draw and MS Word and artwork downloaded from the Internet (JPEG or GIFF files) cannot be used.

**2. Sizing and Resolution:** Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch), and electronic photographs, radiographs, CT scans, and scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. Figures should be sized to fit either 1 column (20 picas/8.4 cm), 1 1/2 columns (30 picas/12.65 cm OR 2 columns (41 picas/17.5cm) on a page. Sizing and Resolution can be checked through the free Sheridan Digital art checker at <http://dx.sheridan.com/onl>

**3. Fonts:** If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. **Fonts must be 8 pt and be sized consistently throughout the artwork.** The best font to use is Helvetica.

**Tables:** Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Supply the tables together in a separate DOC file. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

### Article Types

*Clinical Studies:*

**Objective:** Brief, clear statement of the main goals of the investigation.

**Study Design:** Specify the type of study (e.g., randomized, prospective double-blind, retrospective case review).

**Setting:** E.g., primary care vs. tertiary referral center, ambulatory vs. hospital.

**Patients:** Primary eligibility criteria and key demographic features.

**Intervention(s):** Diagnostic, therapeutic, and/or rehabilitative.

**Main Outcome Measure(s):** The most essential criterion that addresses the study's central hypothesis.

**Results:** Include statistical measures as appropriate.

**Conclusions:** Include only those conclusions that are directly supported by data generated from the study.

*Basic Science Reports:*

**Hypothesis:** Brief, clear statement of the main goals of the investigation.

**Background:** Concise; designed for orientation of the reader who is unfamiliar with this line of investigation.

**Methods:** Succinct summary of techniques and materials used.

**Results:** Include statistical measures where appropriate.

**Conclusion:** Include only those directly supported by data generated from this study. Emphasize clinical relevance wherever possible.

*Reviews and Meta-Analyses:*

**Objective:** Brief, clear statement of the goals of the review.

**Data Sources:** Specify database, search methodology, languages covered, and time frame.

**Study Selection:** Criteria used to select articles for detailed review.

**Data Extraction:** Means of assessing quality, validity, and comparability of extracted data.

**Data Synthesis:** Specify statistical techniques used for data analysis.

**Conclusions:** Concise statement of primary inferences with any recommendations.

**Key Words, Running Heads:** On the same manuscript page as the structured abstract, list, in alphabetical order, key words (maximum of seven) for indexing, using Medical Subject Headings (MeSH) from *Index Medicus*, and provide a running head of three or four words to be used as the right-hand page running heads in the typeset article.

*Clinical Capsule Report:*

**Objective:** Brief, clear statement of the main goals of the investigation.

**Patients:** Primary eligibility criteria and key demographic features.

**Intervention(s):** Diagnostic, therapeutic, and/or rehabilitative.

**Main Outcome Measure(s):** The most essential criterion that addresses the validity of a diagnostic test or a therapeutic outcome

**Results:** Include statistical measures as appropriate.

**Conclusions:** Include only those conclusions that are directly supported by observations generated from the study and make the report noteworthy.

A report will be considered for acceptance as a Clinical Capsule if it reflects a valid observation or clinical outcome, but is not powered by formal experimental methods (e.g. prospective, controlled observations). As best as possible, the title should state the compelling point that draws the reader's attention. These reports will describe a new disease state (with diagnostic documentation including pathologic findings), identification of a new complication from a treatment or procedure, a new diagnostic technique, a new technology transferred from one field to another, or further elucidate clinical approaches to significant disorders.

A Clinical Capsule should offer new insights and not simply report established information. Novel diagnostic or therapeutic considerations can be effectively conveyed in the context of a Clinical Capsule. If the report provides a new treatment option, the disease should be of such rarity that it is unlikely that a series could be developed that would be amenable to standard analyses. Capsule reports may also be based on seminal observations that provide an understanding of the mechanism of disease, particularly when the pathophysiology involves a rare and not easily retested event. *The text for a clinical capsule should not exceed 1500 words (excluding the abstract and references). Up to 5 tables and/or figures may be included with the submission.*

*Imaging Case of the Month*

**Content:** Content should include 1) a concise description of the imaging characteristics of the lesion citing the key diagnostic point; 2) the optimal imaging modalities for demonstrating the lesion (i.e., CT, MRI, angiography) and parameters (e.g., axial vs coronal, T1- or T2-weighted, with contrast); and 3) a most common radiographic differential diagnosis. Note: Space limitations do not permit discussions of the role imaging plays in the diagnosis and management of the role process.

**Length:** Imaging cases must be brief, preferably contained on 1 journal page. In no case will imaging cases exceed 2 journal pages. As a rule of thumb, this limits contributions to 1-3 images and less than 2 typewritten page (double-spaced). Readers interested in more detailed information can look up the cited reference(s).

**References:** Only a few key references should be provided, preferably 1 or 2 and in no case more than 5.

**Figures:** Images submitted must be of **exemplary quality**. Patient identifiers must be masked. For CT scans, high-resolution, bone-reviewed images are preferred. Include more than one plane of view only when the second perspective adds unique information. For MRI scans, it is preferred that both T1- or T2-weighted images be included. Pre- and postcontrast, fat saturation, and multiplanar images may be submitted as required.

**Originality:** Images and their description must not have been published previously.

*Temporal Bone Histopathology Case of the Month*

**Statement of purpose:** To provide an educational review of important histological temporal bone abnormalities common to the practice of otology. This section is not meant to report unusual case reports but is to provide an overview of histopathology commonly seen in otologic diseases.

**Content:** 1) Concise description of the cardinal histological findings. 2) Photomicrographs(s).

**Length:** Pathology cases must be brief, preferably contained on 1 journal page. In no case will pathology cases exceed 2 journal pages. As a rule of thumb, this limits contributions to 1-3 images and less than 2 typewritten page (double spaced). The text discussion should be confined to the histological features of the disease process.

**References:** Only a few key references should be provided, preferably 1 or 2 and in no case more than 5.

**Figures:** Photomicrographs must be of exemplary quality. Patient identifiers must be masked. A combination of low power (for orientation) and high power (for detail) is preferred. An extensive figure legend should be provided for each photomicrograph. Several sentences providing orientation and describing details of the photomicrograph should be given.



**Originality:** Pathological images and their description must not have been published previously.

#### Article Plus™

**Acceptable File Formats:** The types of materials that may be submitted include, color photographs, data graphs and charts, short audio files, web site URLs, word documents, spreadsheet, and small video or audio files (keeping download time in mind). An expanded list of acceptable file formats follows:

Content Type	Acceptable File Type/Format
Web addresses/URLs	http://www.lww.com
HTML files	.htm
PDF files	.pdf
Image files	.gif, .jpg
Audio files	.wav
Video files	.avi, .mov, .mpg, .dcr
Text files	.doc
Spreadsheets	.xls

**Web Address/URLs (web links):** Must contain the complete path for the destination web site.

**Web Documents (htm files):** Web documents must be submitted already in HTML format and have .htm as the file extension. If embedded images files are present in the HTML file, please supply these separately. Please be sure that all HTML coding is accurate to assure cross-browser display. Again, these files will not be reviewed or edited prior to posting, so authors should review the HTML coding carefully.

**Image Files (.gif, .jpg):** Authors may send black-and-white image files, 4-color images, or a combination of these. All images designated for web site must be supplied in an electronic format. No hard copy images will be accepted. Captions and other explanatory text associated with images submitted must be embedded within the image file.

Authors interested in supplementing black-and-white images but displaying 4-color art on the web site through Article Plus™ must provide the following:

Two hardcopies of every 4-color image, labeled "for Article Plus™ only."

Captions must be embedded within the Article Plus™ image file.

If authors submit color images electronically, they will not be billed for conversion.

Submit the image(s) on a disk in .jpg or .gif format.

The images should be no greater than 144 dpi (dots per inch).

Size the image to accommodate a computer screen set to 600 x 800 resolution. We suggest trying to size your images to a size that is close to 250 pixels high x 350 pixels wide (these dimensions can be reversed to accommodate vertically oriented images).

Submit each image separately.

**Audio and Video Files (.wav, .avi, .mov, .mpg, .dcr):** Short audio and video clips may be submitted for posting on the web site in one of the file formats specified above. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The total size of all clips, along with other submitted files for any given article, should not exceed 5MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for re-submission.

**Text Files and Spreadsheets (.doc, .xls):** Text documents and spreadsheets should be submitted completely formatted for easy viewing and printing. Please be sure that data chart and graph layouts are done correctly so that page run-over is not present and the information is easy to view and read on screen.

**File Editing:** Because all materials submitted for addition to the web site are posted exactly as provided by the author, authors are advised to review their materials carefully. Web site data will be posted as submitted and will not be professionally copyedited or proofread. No additional work or file processing will be performed. The Society and Publisher will not be responsible for errors or omissions.

OR



If the submitted materials require processing, the author will be informed of any associated charge and will be responsible for these costs. For this reason, authors should carefully review their material.

**File Size Limitations:** The Article Plus™ repository for any given article may not exceed 5MB. The repository may consist of one file or any number of related files whose total combined size does not exceed this size specification. Files larger than 5MB will be returned to the author, unposted, for re-submission. File size limitation is strictly enforced.

**Style:** Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (9th edition), *Stedman's Medical Dictionary* (27th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Copyright or trade names of drugs should be capitalized and placed in parentheses after the name of the drug. Names and locations (city, state, country) of manufacturers of drugs, supplies, or equipment cited in a manuscript are required to comply with trademark law and should be provided in parentheses. Units of measure should be expressed in the metric system, and temperatures should be expressed in degrees Celsius. Conventional units should be written as SI units as appropriate.

Address all inquiries regarding manuscripts not yet accepted or published to the Journal's editorial office. The editorial office will acknowledge receipt of your manuscript and will give you a manuscript number for reference.

#### **After Acceptance**

**Page proofs and corrections:** Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (e.g., reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. Those authors without an e-mail address will receive traditional page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

**Reprints:** Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed to the publisher with the corrected proofs, if possible. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201 with any questions.

**Publisher's contact:** Fax corrected page proofs, reprint order form, and any other related materials to Journal Production Editor, Jennifer Aronstein, fax: 410-558-6844. Color proofs should be returned to Journal Production Editor, Jennifer Aronstein, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201.

**Permissions:** Authors interested in reusing or reprinting material from their accepted work are advised to contact the Publisher's permissions department at [journalpermissions@LWW.com](mailto:journalpermissions@LWW.com). In your request, please include 1) your full contact information; 2) the specific material being requested and the citation for the published material; and 3) a statement as to how the material being borrowed will be used.

**ARTIGO**

**Alpha-tricalcium phosphate bone cement in the  
surgical treatment of open mastoid cavity**

Running head: **Using cement in mastoid surgery**

**Robinson Koji Tsuji; MD \***

**Vanda Jorgeti; PhD \*\***

**Rubens Vuono de Brito Neto; PhD \*\*\***

**\* ENT doctor at Clinical Hospital of the Medical University of São Paulo,  
São Paulo – SP, Brazil**

**\* \* Nephrologist doctor at Clinical Hospital of Medical University of São  
Paulo, São Paulo – SP, Brazil.**

**\*\*\* ENT doctor at Clinical Hospital of the Medical University of São Paulo,  
São Paulo – SP, Brazil**

**Adress correspondence to:**

**Robinson Koji Tsuji, MD**

**Alameda Ibérica, 285 house 312**

**Zipcode: 06543-502**

**e-mail: rktsuji@uol.com.br**

**Research support by FAPESP (Sao Paulo Foundation for Research Support)**

## **Abstract**

**Hypothesis:** This study aimed to evaluate the biocompatibility of alpha-tricalcium phosphate bone cement in the obliteration of the mastoid cavity in guinea pigs.

**Background:** Treatment with open cavity mastoidectomy can present poor functional results in chronic otitis media with cholesteatoma, especially if the cavity is quite large. Partial or total obliteration of the cavity can correct these problems. Alpha-tricalcium phosphate bone cement has physicochemical characteristics that suggest its potential in mastoid cavity obliteration.

**Methods:** Twenty guinea pigs were studied. All animals underwent surgery involving manipulation of the dorsal tympanic bulla. In the study group animals (n = 10), mastoid cavity obliteration was conducted with alpha-tricalcium phosphate bone cement. In the control group animals (n = 10), the cavity was left unfilled.

On postoperative day 60, the animals were sacrificed and studied for signs of rejection of the material and other complications. Temporal bones were removed for histopathological study, in which the type and degree of inflammatory response, as well as the degree of ossification, were analyzed.

**Results:** The mortality rate was the same in both groups. Deaths were attributed to anesthetic complications in the initial postoperative period. In the animals that survived, there were no complications, and there was good healing of the incision in both groups. There were no clinical signs of rejection of the material, and the histopathological analysis of the cement group revealed no signs of foreign body reaction (inflammatory response).

**Conclusion:** Alpha-tricalcium phosphate bone cement is biocompatible in the mastoid cavity of guinea pigs.

## 1. Introduction

Many authors consider open cavity mastoidectomy the surgical procedure of choice for the treatment of otitis media with cholesteatoma, due to the high incidence of recurrence of the disease.<sup>1-3</sup> This technique allows full removal of the cholesteatoma, as well as better postoperative control, since it allows the aspiration in the eventuality of recurrence of the disease.<sup>4</sup> However, the formation of this single cavity can generate complications such as deafness, persistent otorrhea, dizziness, poor aesthetics and the need for periodic cleaning of the cavity by an otorhinolaryngologist. Therefore, in selected cases, the elimination of the open cavity is indicated in order to improve the quality of life of the patient. The techniques for the elimination of the open cavity consist of the reconstruction of the posterior wall of the external auditory meatus (EAM), cavity obliteration or complete ablation of the middle ear.<sup>5</sup>

Since 1962 with the experiments conducted in 1962 by Mahoney *et al.*,<sup>6</sup> who used methyl methacrylate, various synthetic materials have been tested. Synthetic materials have the advantage of being easily obtained, as well as not submitting the patient to the risk of infectious diseases. However, such materials can present problems of biocompatibility and, consequently, rejection.

A new material similar to hydroxyapatite has been extensively studied for use in the reconstruction of bone defects in orthopedic surgery, neurosurgery, oral surgery and maxillofacial surgery.<sup>7-9</sup> This new material is alpha-tricalcium phosphate cement, which is an apatite carbonate formed by mixing alpha-tricalcium phosphate with calcium carbonate and monocalcium phosphate powder. Mixing these components with a sodium phosphate solution forms a crystalline structure known as dahllite, which is similar to the bone mineral phase.

Although it has been used for more than 10 years, there are no studies in the literature on its application in mastoid cavity obliteration. The objective of this study was to evaluate the biocompatibility of alpha-tricalcium phosphate bone cement in an animal model of mastoid cavity obliteration.

## **2. Materials and Methods**

The study design was approved by the Ethics Committee for the Analysis of Research Projects of the Clinical Board of the University of São Paulo School of Medicine *Hospital das Clínicas*. The experimental study was conducted in accordance with the manual for the care and handling of laboratory animals. A total of 20 young, healthy adult female guinea pigs (*Cavia porcellus*), aged 10-12 months and weighing between 350-450 g, were studied. Animals with signs of external or middle ear infection were excluded, as were pregnant animals and those with congenital malformations.

*C. porcellus* has a cellular aeration of the temporal bone composed of the ventral and dorsal tympanic bullae and retrotympanic cells. Making an analogy with the human temporal bone, the dorsal tympanic bulla would be the equivalent of the epitympanic recess, also known as the attic. The dorsal tympanic bulla is located in the superior posterior portion of the tympanic cavity, inferior to the intracranial cavity, lateral to the petrous portion of the temporal bone, superior to the tympanic cavity and superior to the EAM. The communication between the dorsal tympanic bulla and the tympanic cavity is through a hiatus located in the inferior portion, into which the incudomalleolar joint projects.<sup>10,11</sup> When the upper wall of the EAM is removed, the tympanic bulla communicates with the EAM, forming a single cavity similar to the open mastoid cavity.

The 20 animals were divided into 2 groups of 10 animals each. Animals in both groups were submitted to the same sterile surgical procedure and remained under observation for a period of 60 days. The animals were sacrificed after 60 days, and the temporal bones were removed for histopathological study.

### **2.1. Surgical Technique**

The guinea pigs were anesthetized with a mixture of ketamine (40 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). This anesthetic regimen allows a good level of anesthesia for a period of 60 to 90 min without respiratory depression. During the induction of anesthesia, all animals received 50 mg/kg of the antibiotic cefazolin.

Following local infiltration with lidocaine, at 2% with adrenaline 1:200,000, we made an incision over the auricular pavilion, exposing the temporal muscle. By making a posteriorly based pedicle musculoperiosteal flap, we exposed the membranous part of the squama of the temporal bone. With the use of cutting and diamond drill bits, under constant irrigation, the cortex of the dorsal tympanic bulla was removed, allowing complete exposure of the interior of the cavity. Subsequently, we removed the posterior bone wall of the EAM (Figure 1), which delineates the lower limit of the dorsal tympanic bulla. The cavity was then cautiously cleaned, and the cavity walls were scarified using a diamond drill bit.

The musculoperiosteal flap was rotated to the interior of the tympanic bulla, covering the bone defect of the posterior wall of the EAM. The cavities of the 10 control group animals remained unfilled, whereas those of the 10 study group animals were obliterated with alpha-tricalcium phosphate bone cement (Figure 2).

The cement used comes in two containers: a jar containing sterile calcium

phosphate powder and a flask containing sterile diluted sodium phosphate. The proportion between powder and the solvent need not be calculated: it is only necessary to mix the total contents of both vials. The mixture should be applied and molded within 3 min, at which point the hardening process begins, and the product becomes completely hardened within 10 min.

The incision was closed using subcutaneous polyglactin 910 sutures and cutaneous nylon sutures.

## **2.2. Preparation of the histopathological material**

On postoperative day 60, the animals were sacrificed. The animals were initially anesthetized with ketamine (160 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg), after which a lethal dose of 19.1% KCl was given via intracardiac injection.

Temporal bones were removed using a scope, a hammer and scissors. Each piece was carefully removed, preserving the tympanic bulla and maintaining the cement intact (Figure 3).

The material was then fixed with 70% alcohol and embedded in methyl methacrylate blocks. The blocks were then cut into 1-mm thick sections using a diamond-blade low rotation disc saw (Isomet-Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Subsequently, the sections were polished down to a thickness of 10  $\mu\text{m}$  using a metallographic polishing machine. The cuts were then stained with 0.1% toluidine blue and sent for histopathological analysis.

## **2.3. Data analysis**

Histopathological analysis was carried out under optical microscopy by an experienced pathologist in the Department of Pathology of the University of São Paulo School of Medicine *Hospital das Clínicas*. The slides were initially examined

in panoramic view for the identification of all fields and then at magnifications of  $\times 12.5$ ,  $\times 40$ ,  $\times 50$ ,  $\times 200$  and  $\times 400$ .

Clinical analysis was carried out prior to the removal of the temporal bone. The skin and muscle flap were evaluated macroscopically, and the otoscopy was carried out using a surgical microscope.

The guinea pigs were studied for signs of rejection of the material, as well as to determine the degree of ossification and the incidence of complications.

### ***Biocompatibility analysis***

For the biocompatibility analysis of the alpha-tricalcium phosphate bone cement, the following parameters were evaluated:

- a) Inflammatory response.
- b) Incidence of complications of the procedure.
- c) Osteoneogenesis.

### ***Analysis of the inflammatory response***

As a histopathological parameter for the evaluation of the biocompatibility of the material, the granulomatous inflammatory response and giant cell formation was studied. For the analysis of the inflammatory response and foreign body reaction, a classification system consisting of five categories was created (Table 1).

According to the inflammatory response score given by the pathologist in the histological analysis, we divided the animals into three groups by type (Table 2).

### ***Analysis of the degree of ossification***

For the analysis of the degree of ossification of the mastoid cavity, a previously five-point scale was used (table 3)<sup>13</sup>. Using this classification system, the pathologist



classified the degree of ossification in the control group and cement group samples. The presence of cartilage or chondrocytes, active osteoblasts, osteoid tissue, newly formed bone trabeculae and marrow, were the criteria listed for evidence of process of bone formation.

### ***Analysis of the incidence of complications of the procedure***

For the analysis of the incidence of complications, the guinea pigs were evaluated in terms of the following parameters:

- Death of the animal
- Middle-ear effusion
- Signs of skin or muscle infection
- Signs of skin or muscle necrosis
- Signs of extrusion of the material
- Stenosis of the EAM
- Cutaneous fistula

### **3. Results**

The mean initial weight of the control group animals was 396.8 g, and the mean final weight was 570 g. Therefore, the mean weight gain in the control group during the study period was 173.2 g, an increase of 43.6% over the initial weight.

In the cement group, the mean initial weight of the animals was 398.8 g, and the mean final weight was 574.3 g. Therefore, the mean weight gain in the cement group during the study period was 175.5 g, a 44% increase in relation to the initial weight.

In each group, there were 2 deaths (a 20% incidence), all occurring on postoperative day 1 ( $p = 1.0$ ). The deaths were attributed to anesthetic complications, since they occurred in the immediate postoperative period, and since the same number of

deaths occurred in both groups. The clinical analysis of the remaining animals revealed no signs of other complications: skin or muscle infection; middle ear effusion; EAM stenosis; cutaneous fistula or signs of the extrusion of the material.

After the removal of the temporal bones, we observed that the material was firmly adhered to the mastoid cavity in all cement group samples.

The histological analysis of the degree and type of inflammatory response is shown in Table 4. There were no signs of foreign body reaction in the cement group, 8 (100%) of the samples presenting category I or II inflammatory responses. Only 3 (37.5%) of the control group animals presented a type 3 inflammatory response, whereas the remaining guinea pigs (100% of the cement group and 62% of the control group) presented a type 1 inflammatory response. Despite the difference among the prevalence of the types of inflammatory responses between the groups, this difference was not statistically significant ( $p = 0.2$ ).

As for the study of the degree of ossification, 4 (50%) of the control group samples presented category III ossification of the samples and the remaining 4 control group samples (50%) presented category IV ossification. In the cement group, we observed category I in 8 (100%) samples (Table 5).

When attributing the scores of each animal according to the degree of ossification, we observed that the mean ossification in the control group (3.5) was greater than that shown by the cement group (1.0). The control group showed statistically significant ( $p < 0.001$ ) higher degrees of ossification (mean  $3.5 \pm 0.5$ ) when compared to the cement group ( $1.0 \pm 0.0$ ).

#### 4. Discussion

Several types of material have been used for open mastoid cavity obliteration. The materials most often employed are autologous tissues, such as cartilage, bone, fat, muscle and bone pate, which have the advantage of not being rejected and can be obtained during surgery.<sup>5,12,13</sup> The disadvantage is the difficulty in obtaining a quantity of material sufficient to perform the procedure.

Therefore, since the experiments conducted in 1962 by Mahoney *et al.*,<sup>6</sup> who used methyl methacrylate, several synthetic materials have been tested. Synthetic materials have the advantage of being easily obtained, as well as not submitting the patient to the risk of transmission of infectious diseases. However, they present problems regarding biocompatibility, presenting high rates of rejection.

Among the synthetic materials studied for this objective are silicone, proplast, ionomer cement and bioactive glass cement.<sup>14-17</sup>

Silicone, proplast and ionomer cement are no longer used due to the incidence of complications. In addition, bioactive glass cement is still in the experimental study phase.<sup>18</sup>

More recently, synthetic materials made of calcium and phosphate have been used. These present a biochemical structure similar to the mineral phase of human bone. Alloplastic calcium and phosphate implants are composed of calcium and phosphate in apatite form. Apatite is a compound in the form of crystals that has a chemical structure represented by the formula  $\text{Ca}_5(\text{X})(\text{PO}_4)_3$ . In this structure, the position X can be occupied by ions of fluorine, chlorine, hydroxide or carbonate.<sup>19</sup> Among these, the first material studied was hydroxyapatite, which has presented good results when used in EAM reconstruction or mastoid cavity obliteration.<sup>20-22</sup> From the study of hydroxyapatite, new types of material were developed.

Alpha-tricalcium phosphate cement is a product made of three solutes: alpha-tricalcium phosphate, calcium carbonate and monocalcium phosphate.<sup>23</sup> When these components are mixed with a sodium phosphate solution, they form a crystalline structure of apatite carbonate known as dahllite, which is similar to the mineral phase of the bone.<sup>24,25</sup>

The time involved in preparing the material, which consists of mixing the solid phase with the sodium phosphate solution, is approximately 2 min. The material manipulation time is 5 min. After the placement of the material, the dahllite is formed, and hardening occurs. Hardening time is 10 min at normal body temperature.<sup>24,26,27</sup> After 12 h, between 85 to 90% of the material has turned to dahllite, and its maximum compression force is 55 megapascals.<sup>24</sup> Constantz *et al.* studied the biochemical composition and the crystalline structure of the dahllite formed in this reaction and found that they were similar to those of the dahllite naturally present in the bone. This material has been widely used in the filling of bone defects in orthopedic surgery, neurosurgery, oral surgery and maxillofacial surgery. Studies involving surgical reconstruction of the ossicular chain in guinea pigs with alpha-tricalcium phosphate cement showed good results, with low levels of inflammation and minimal foreign body reaction.<sup>28,29</sup>

For the biocompatibility study, samples were studied using clinical and histopathological parameters. The system of classifying inflammatory response into five categories was adapted from that described by Hoffman *et al.*, who studied the degree of inflammatory response in guinea pigs submitted to surgical reconstruction of the ossicular chain with the use of the alpha-tricalcium phosphate cement.<sup>28</sup> The classification system used by Hoffmann *et al.* was divided into 4 categories. Since

this classification was inappropriate for use with animals presenting an acute inflammatory response, we added a fifth category (category V). We used these five categories to subdivide the animals into three groups by type, designated types 1, 2 and 3. Type 1 corresponds histopathologically to an inflammatory response that normally occurs in tissues submitted to surgical trauma and encompasses categories I and II. Type 2 corresponds histopathologically to a foreign body reaction and encompasses categories III and IV. Type 3 corresponds histopathologically to an acute inflammatory response (Figure 4) with a possible infection and encompasses category V.

In our study, we observed no clinical signs of rejection of the material, such as a granulomatous inflammatory response or implant extrusion. In the histopathological analysis, no samples treated with alpha-tricalcium phosphate cement showed signs of foreign body reaction, which normally occurs during the process of rejection of the material.

The present study also demonstrated that the use of alpha-tricalcium phosphate cement provoked no complications when used for obliteration of the guinea pig mastoid cavity. The absence of effusion in the middle ear is a sign that there was preservation of the middle ear physiology.

As for the degree of ossification, we found significantly less ossification in the cement group than in the control group (Figure 5). This fact confirms the findings of studies demonstrating that this material is not osteoconductive. Alpha-tricalcium phosphate cement is microporous, which allows no internal bone growth.<sup>24</sup> However, there were signs of reabsorption and bone growth in the periphery of the implant (Figure 6), showing that, over longer periods of time, the material can be reabsorbed

and replaced by new bone. Studies in animals have shown that alpha-tricalcium phosphate bone cement undergoes remodeling similar to that occurring in normal bone. This material suffers osteoclastic reabsorption followed by osteoblastic migration and formation of a new bone.<sup>24</sup> The drying properties, even in humid environments, and adherence to the bone may be advantages in relation to hydroxyapatite. The mastoid cavity is humid and often contains blood. Furthermore, the fact that the material adheres to the adjacent bone is a factor that might result in greater stability in the surgical bed. In all other samples studied, the cement was firmly adhered to the interior of the tympanic bulla.

Based on our findings, we can state that alpha-tricalcium phosphate bone cement is biocompatible in the mastoid cavity of guinea pigs.

## References

1. Bento RF, Miniti A, Marone SAM. *Tratado de Otologia*. 1<sup>a</sup> ed., São Paulo: EDUSP;1998.
2. Karmarkar S, Bhatia S, Saleh E, et al. Cholesteatoma surgery: the individualized technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995; 104: 591-5.
3. Chang C, Chen M. Canal-wall-down tympanoplasty with mastoidectomy for advances cholesteatoma. *J Otolaryngol*. 2000; 29: 270-3.
4. Roden D, Honrubia V, Wiet R. Outcome of residual cholesteatoma and hearing in mastoid surgery. *J Otolaryngol*. 1996; 25: 178-81
5. Black B. Mastoidectomy elimination. *Laryngoscope*. 1995; 105(12 Pt 2):1-30.
6. Mahoney JL. Tympanoacryloplasty. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1962; 75:519-22.

7. Mahr MA, Bartley GB, Bite U, et al. Norian Craniofacial Repair System Bone Cement for the Repair of Craniofacial Skeletal Defects. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*. 2000 september; 16(5):393-8.
8. Baker S, Weinzweig, J, Kirschner RE et al. Applications of a New Carbonated Calcium Phosphate Bone Cement: Early Experience in Pediatric and Adult Craniofacial Reconstruction. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2002 may; 109(6):1789-96.
9. Kirschner RE, Karmacharya J, Ong GBS, et al. Repair of the Immature Craniofacial Skeleton With a Calcium Phosphate Cement: Quantitative Assessment of Craniofacial Growth. *Annals of Plastic Surgery*. 2002 july; 49(1):33-8.
10. Goksu N, Hazirolu R, Kemalolu Y, et al. Anatomy of the guinea pig temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1992 Aug;101(8):699-704.
11. Wysocki J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hear Res*. 2005 Jan;199(1-2):103-10.
12. Linthicum FH Jr. The fate of mastoid obliteration tissue: a histopathological study. *Laryngoscope*. 2002 Oct;112(10):1777-81.
13. Leatherman BD, Dornhoffer JL, Fan CY et al. Demineralized bone matrix as an alternative for mastoid obliteration and posterior canal wall reconstruction: results in an animal model. *Otol Neurotol*. 2001 Nov;22(6):731-6.
14. Rosenblut B, Ahlvin RC, Carr CD, et al. Silicone implants in the mastoid portion of the temporal bone. *Ann Rhinol Laryngol*. 1966; 75: 889-9.
15. Shea JJ, Malenbaun BT, Moretz WH. Reconstruction of the posterior wall with proplast. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1984; 92:329-33.

16. Helms J, Geyer G. Closure of the petrous apex of the temporal bone with ionomeric cement following translabyrinthine removal of an acoustic neuroma. *J Laryngol Otol.* 1994; 108: 202–5.
17. Bryan DL, Dornhoffer JL. Bioactive Glass Ceramic Particles as an alternative for mastoid obliteration: results in a animal model. *Otol & Neurotol.* 2002; 23(5):657-60.
18. Jang CH, Cho YB, Bae CS. Evaluation of bioactive glass for mastoid obliteration: a guinea pig model. *In Vivo.* 2007 Jul- Aug;21(4):651-5.
19. Costantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S et al. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg.* 2002 Feb;18(1):13-26.
20. Yung MW. The use of hydroxyapatite granules in mastoid obliteration. *Clin Otolaryngol.* 1996; 21: 408-84.
21. Jahn AF. Experimental applications of porous (coralline) hydroxyapatite in middle and mastoid obliteration. *Laryngoscope.* 1992; 102: 289-99.
22. Hussain A, Ram B, Hilmi OJ. Reconstruction of Mastoid Cavity With Hydroxyapatite Cement and Postauricular Flap. *Laryngoscope.* 2002 march; 112(3):583-5.
23. Frankenburg EP, Goldstein SA, Bauer TW, et al. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80:1112-4.
24. Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995;267:1796-9.
25. Ison I, Fulmer B, Barr B, et al. Synthesis of Dahllite. The Mineral Phase of Bone. Boca Raton, FL: CRC Press Lewis Publishers, 1994.
26. Kopylov P, Jonsson K, Thorngren KG, et al. Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radius fractures. *J Hand Surg. [Br]* 1996;21:768-71



27. Kopylov P, Runnqvist K, Jonsson K, et al. Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop Scand.* 1999;70:1-5.
28. Hoffmann KC, Kuhn JJ, Strasnick N. Bone Cements as Adjuvant Techniques for Ossicular Chain Reconstruction. *Otol & Neurotol.* 2003; 24: 24-8.
29. McDowell MP, Kuhn JJ, Strasnick B. Incudostapedial Joint Reconstruction Using Dahllite Bone Cement in a Chinchilla Model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 133(2) Supplement 1:83-4.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Open tympanic bulla and removal of the wall of the external auditory meatus (trapezium)

**Figure 2:** Mastoid cavity filled with bone cement

**Figure 3:** Guinea pig temporal bone removed. Note the mastoid cavity (blue circle) filled with bone cement (red arrow), and the external auditory meatus (black circle)

**Figure 4:** Temporal bone of a guinea pig in the control group. Inflammatory lymphohistiocytic infiltrate with fibrosis and polymorphonuclear cells (black arrow). Example of type 3 inflammatory response. Material stained with toluidine blue (magnification,  $\times 40$ )

**Figure 5:** Temporal bone of guinea pig in the control group. Intense mastoid cavity ossification. The black circle represents the original size of the cavity. Material stained with toluidine blue (magnification,  $\times 12.5$ )

**Figure 6:** Temporal bone of guinea pig in the cement group. The alpha-tricalcium-phosphate bone cement (amorphous black material) is being invaded by ossification lamellae (white arrow) in its periphery. Material stained with toluidine blue (magnification,  $\times 40$ )

**Table 1:** Classification of inflammatory responses

<i>Category</i>	<i>Histopathological finding</i>
I	Absence of signs of inflammatory response
II	Presence of minimum edema without granuloma formation
III	Presence of granulomatous reaction with giant cells
IV	Presence of granulomatous reaction with giant cells and lymphocytic infiltrate in adjacent soft tissues
V	Presence of inflammatory response with lymphohistiocytic inflammatory infiltrate with neutrophils and cicatricial fibrosis.

**Table 2:** Subdivision of inflammatory responses into three types

<i>Type</i>	<i>Categories</i>	<i>Criteria</i>
1	I and II	Cicatricial alterations expected after surgery
2	III and IV	Inflammation alterations to the extrinsic material (foreign body reaction)
3	V	Acute inflammation (possible infection)

**Table 3:** Histologic degree of ossification

<i>Degree</i>	<i>New bone formation</i>	<i>Score</i>
0	No new bone	0
I	1%-25% of cavity involved in new bone formation	1
II	26% -50% of cavity involved in new bone formation	2
III	51% -75% of cavity involved in new bone formation	3
IV	75% -100% of cavity involved in new bone formation	4

**Table 4:** Results of the histological analysis of the control group and cement group.

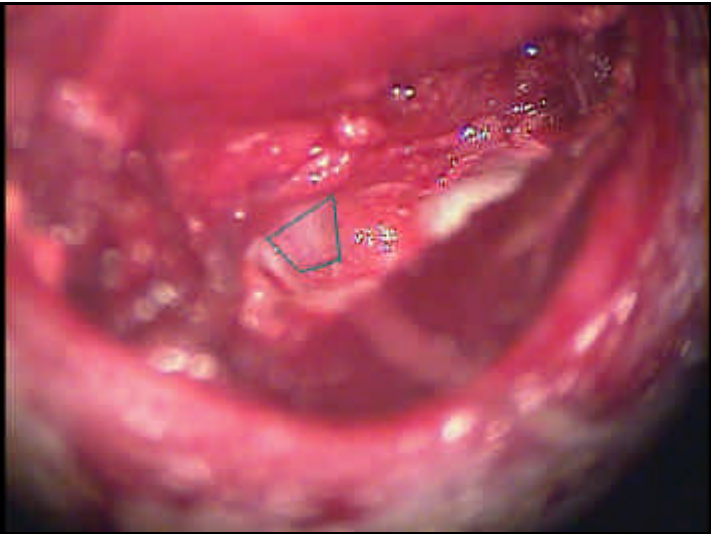
Categories of inflammatory response

	<b>Group</b>		<b>p</b>	<b>Total (n = 16)</b>
	<b>Cement (n = 8)</b>	<b>Control (n = 8)</b>		
<b>Inflammatory response category</b>				
I	7 (87.5%)	3 (37.5%)	0.09	10 (62.5%)
II	1 (12.5%)	2 (25.0%)		3 (18.8%)
III	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)
IV	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)
V	0 (0.0%)	3 (37.5%)		3 (18.8%)
<b>Inflammatory response type</b>				
1	8 (100.0%)	5 (62.5%)	0.2	13 (81.3%)
2	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)
3	0 (0.0%)	3 (37.5%)		3 (18.8%)

**Table 5:** Degree of ossification in the control group and cement group

	Group		p	Total (n = 16)
	Cement (n = 8)	Control (n = 8)		
<b>Degree of ossification</b>				
0	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)
I	8 (100.0%)	0 (0.0%)	0.001	8 (50.0%)
II	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)
III	0 (0.0%)	4 (50.0%)		4 (25.0%)
IV	0 (0.0%)	4 (50.0%)		4 (25.0%)

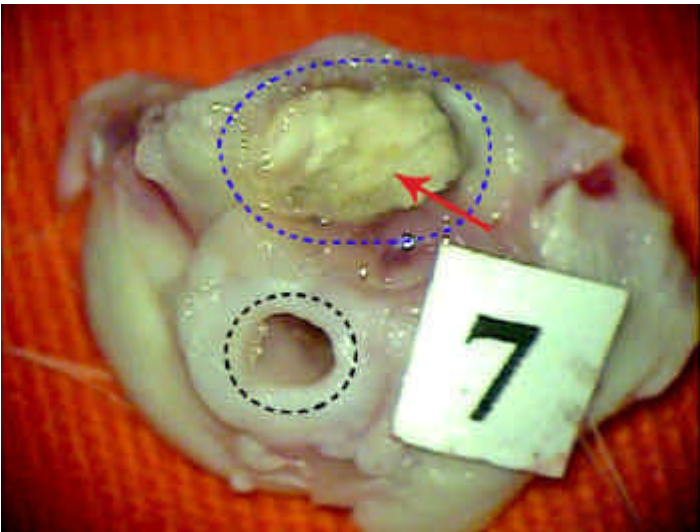
**Figure 1**



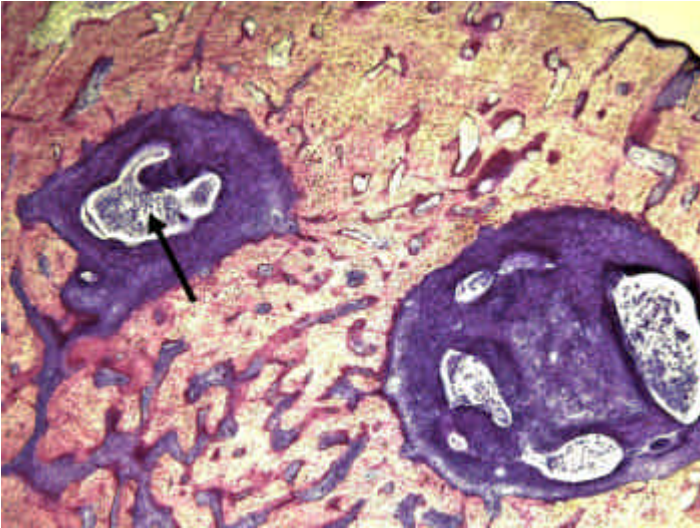
**Figure 2**



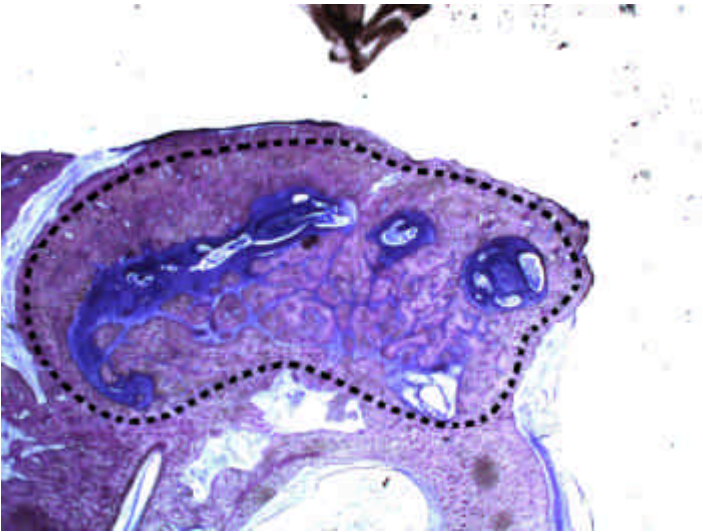
**Figure 3**



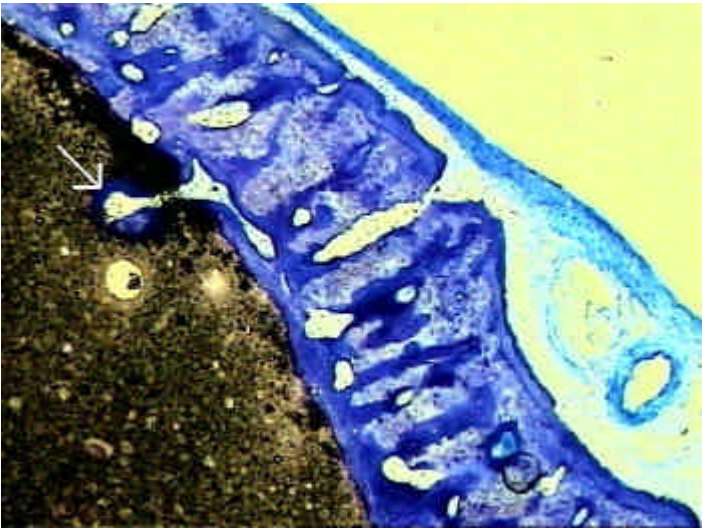
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



## SUBMISSÃO

**De:** Otology and Neurotology  
**Para:** rktsuji@uol.com.br  
**Data:** 21/07/2008 23:14  
**Assunto:** ON Submission Confirmation for Alpha-tricalcium phosphate bone cement in the surgical treatment of open mastoid cavity

---

### Mensagem

Dear M.D. Tsuji,

Your submission entitled "Alpha-tricalcium phosphate bone cement in the surgical treatment of open mastoid cavity" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://on.edmgr.com/>

username: Your username is: rktsuji

password: Your password is: tsuji

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Otology & Neurotology

---

### Anexos



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incisão retroauricular em “C” de 3 cm na orelha esquerda.....	30
Figura 2 -	Orelha esquerda: (A) incisão retroauricular de 3 cm e exposição de músculo temporal. O pavilhão auricular está rebatido anteriormente; (B) representação esquemática demonstrando local da incisão do retalho muscular (pontilhado preto) .....	31
Figura 3 -	Orelha esquerda: (A) retalho músculo periosteal pediculado posteriormente; (B) representação esquemática demonstrando o retalho músculo periosteal (pontilhado amarelo).....	31
Figura 4 -	Orelha esquerda: (A) exposição da cortical da mastóide após afastamento do retalho músculo periosteal; (B) representação esquemática demonstrando retalho músculo periosteal afastado (pontilhado amarelo) e local da cortical da mastóide que será aberta (pontilhado preto) .....	32
Figura 5 -	Orelha esquerda: (A) bula timpânica aberta. (B) representação esquemática demonstrando a bula timpânica (pontilhado azul), cadeia ossicular (pontilhado verde), retalho músculo periosteal afastado (pontilhado amarelo) e parede posterior do MAE (tracejado preto).....	33
Figura 6 -	Orelha esquerda: (A) bula timpânica após remoção da parede posterior do MAE; (B) representação esquemática da bula timpânica aberta (pontilhado azul) e da parede posterior óssea do MAE removida (pontilhado preto) com exposição da pele do MAE .....	33
Figura 7 -	Orelha esquerda: (A) bula timpânica aberta com rotação do retalho músculo periosteal para o interior da bula timpânica cobrindo defeito ósseo da parede posterior do MAE; (B) representação esquemática da bula timpânica (pontilhado azul) e retalho muscular (pontilhado amarelo) .....	34
Figura 8 -	Orelha esquerda: (A) bula timpânica obliterada com cimento de osso; (B) representação esquemática do cimento de osso obliterando a bula timpânica (pontilhado vermelho) e base do retalho músculo periosteal (pontilhado amarelo) .....	35
Figura 9 -	Inspeção da ferida cirúrgica após 60 dias e após tricotomia (orelha esquerda) .....	36

Figura 10 -	Otoscopia após sacrifício do animal e remoção do pavilhão auricular. Note o MAE sem sinais de estenose (círculo preto) e a membrana timpânica normal sem efusão em orelha média; cabo do martelo (seta) e preservação do brilho (ponta de seta) (orelha esquerda).....	36
Figura 11 -	Osso temporal esquerdo da cobaia removido. Note o cimento de osso (seta vermelha) obliterando bula timpânica (pontilhado azul) e o MAE (pontilhado preto) .....	37
Figura 12 -	Corte histológico da bula timpânica corado com azul de toluidina (200x) mostrando trabécula óssea nova. Note presença de osteócitos no interior da trabécula (seta branca) e osteoblastos na periferia da mesma (ponta de seta). Ausência de neutrófilos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho .....	48
Figura 13 -	Corte histológico da bula timpânica do grupo cimento corado com azul de toluidina (100x) mostrando trabécula óssea nova (seta) invadindo o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato (substância amorfa preta) .....	49
Figura 14 -	Corte histológico da bula timpânica do grupo cimento corado com azul de toluidina (100x) mostrando atividade osteogênica ao redor do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato (substância amorfa preta). Note a presença de osteoclasto (seta) e osteoblastos marginais (ponta de seta).....	50
Figura 15 -	Corte histológico da bula timpânica do grupo controle corado com azul de toluidina (12,5x) mostrando intensa ossificação da cavidade (pontilhado).....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação do tipo de resposta inflamatória .....	41
Quadro 2 -	Classificação do grau de ossificação e escore atribuído de acordo com o grau de ossificação da amostra.....	42
Quadro 3 -	Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo cimento (A) de 1 a 5.....	46
Quadro 4 -	Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo cimento (A) de 6 a 10.....	46
Quadro 5 -	Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo controle (B) de 1 a 5.....	46
Quadro 6 -	Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo controle (B) de 6 a 10.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados da análise histológica dos grupos cimento e controle. Graus de reação inflamatória .....	48
Tabela 2 -	Grau de ossificação dos grupos controle e cimento .....	49

## RESUMO

Tsuji RK. *Uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato no tratamento cirúrgico da cavidade mastóidea. Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 78p.

**Introdução:** A mastoidectomia cavidade aberta é considerada por muitos autores o procedimento cirúrgico de escolha para o tratamento da otite média colesteatomatosa, devido à alta incidência de recidiva da doença. Porém, a formação desta cavidade única pode gerar algumas complicações e a obliteração da cavidade mastóidea é uma técnica descrita e estudada para a eliminação desta cavidade. Materiais aloplásticos têm sido estudados em cirurgias de obliteração da cavidade mastóidea, porém estes materiais podem apresentar problemas de biocompatibilidade e de rejeição. O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é um material composto por cálcio e fosfato e apresenta composição bioquímica semelhante à fase mineral do osso. Embora já utilizado em cirurgias há mais de 10 anos, não existem estudos sobre a sua aplicação nas cirurgias de obliteração de cavidade mastóidea na literatura. **Objetivo:** Estudar a biocompatibilidade do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na obliteração da cavidade mastóidea em “guinea pigs”. **Casuística e Métodos:** Vinte *Cavia porcellus* (“guinea pig”) fêmeas foram submetidos a procedimento cirúrgico na bula timpânica esquerda. Em 10 cobaias (grupo cimento) a bula timpânica foi obliterada com o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato e em 10 cobaias (grupo controle) a cavidade foi deixada sem preenchimento. 60 dias após o procedimento os animais foram sacrificados e avaliados quanto à presença de sinais clínicos de rejeição ao material e outras complicações. Os ossos temporais foram removidos e submetidos à análise histopatológica. Foram avaliados o tipo e o grau de resposta inflamatória e o grau de ossificação. **Resultados:** A taxa de mortalidade foi igual em ambos os grupos. As mortes foram atribuídas a complicações anestésicas. Entre as cobaias que completaram o estudo não foram observados sinais de complicações em nenhum caso. Oito animais (100%) do grupo cimento e cinco animais (62,5%) apresentaram resposta inflamatória graus I e II que correspondem histopatologicamente a alterações cicatriciais normais ao procedimento cirúrgico. Não foi observado presença de reação inflamatória crônica tipo corpo estranho em nenhuma amostra de ambos os grupos. Quanto ao grau de ossificação, a média dos

escores de ossificação no grupo controle (3,5) foi maior que o observado no grupo cimento (1,0). O grupo controle ( $3,5 \pm 5$ ) apresentou grau de ossificação estatisticamente maior quando comparado com o grupo cimento ( $1,0 \pm 0,0$ ) ( $p < 0,01$ ). **Conclusões:** 1) O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é biocompatível em osso temporal de cobaia. 2) O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato sofre remodelação óssea, porém não apresenta propriedade de osteocondução.

Descritores: Substitutos ósseos. Cimentos para ossos. Colesteatoma. Processo mastóide. Materiais biocompatíveis. Osseointegração.

## SUMMARY

Tsuji RK. *Alpha-tricalcium phosphate bone cement in the surgical treatment of mastoid cavity. Experimental study* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 78p.

**Introduction:** Many authors consider open cavity mastoidectomy the surgical procedure of choice for the treatment of otitis media with cholesteatoma, due to the high incidence of recurrence of the disease. However, the formation of this open cavity can generate some complications and mastoid cavity obliteration is one type of technique for the elimination of this cavity. Alloplastic materials have been tested in mastoid cavity obliteration, however such materials can present problems of biocompatibility and rejection. Alpha-tricalcium phosphate bone cement is a material composed of calcium and phosphate and presents physicochemical characteristics similar to the bone mineral phase. Although it has been used for more than 10 years, there are no studies in the literature on its application in mastoid cavity obliteration.

**Objective:** This study aimed to evaluate the biocompatibility of alpha-tricalcium phosphate bone cement in the obliteration of the mastoid cavity in guinea pigs. **Methods:** We studied 20 *Cavia porcellus* (guinea pig) submitted to surgical manipulation of the left dorsal tympanic bulla. In the study group animals (n = 10), mastoid cavity obliteration was conducted with alpha-tricalcium phosphate bone cement. In the control group animals (n = 10), the cavity was left unfilled. On postoperative day 60, the animals were sacrificed and studied for signs of rejection of the material and other complications. Temporal bones were removed for histopathological study, in which the type and degree of inflammatory response, as well as the degree of ossification, were analyzed. **Results:** The mortality rate was the same in both groups. Deaths were attributed to anesthetic complications in the initial postoperative period. In the animals that survived, there were no complications. The histological analysis of the degree and type of inflammatory response shown no signs of foreign body in both groups, 8 (100%) of the samples in cement group and 5 (62,5%) of the samples in control group presenting category I or II inflammatory responses that corresponds histopathologically to an inflammatory response that normally occurs in tissues submitted to surgical trauma. There were no histopathological signs of foreign body reaction in none samples of both groups. As for the study of the degree of ossification,

the mean ossification in the control group (3.5) was greater than that shown by the cement group (1.0). The control group showed statistically significant ( $p < 0.01$ ) higher degrees of ossification (mean  $3.5 \pm 0.5$ ) when compared to the cement group ( $1.0 \pm 0.0$ ). **Conclusion:** 1) Alpha-tricalcium phosphate bone cement is biocompatible in the mastoid cavity of guinea pigs 2) Alpha-tricalcium fosfato bone cement undergoes bone remodeling but it doesn't present osteoconductive properties.

Descriptors: Bones substitutes. Bone cements. Cholesteatoma. Mastoid. Biocompatible materials. Osseointegration.



# **1 INTRODUÇÃO**

A otite média crônica colesteatomatosa é uma formação tumoral constituída, predominantemente, por queratina proveniente de epitélio escamoso altamente inflamado. Essa estrutura apresenta uma ação destrutiva, reabsorvendo o osso que o rodeia na medida em que a lesão avança. É uma doença que pode recidivar após a cirurgia, geralmente por remoção incompleta do tumor. O quadro clínico mais comum é a presença de otorréia de odor fétido que não melhora com antibioticoterapia tópica ou sistêmica (Bento *et al.*, 1998). O tratamento é quase sempre cirúrgico e a mastoidectomia é a técnica de escolha (Bento *et al.*, 1998; Gantz *et al.*, 2005). A mastoidectomia basicamente divide-se em dois tipos: mastoidectomia cavidade fechada e mastoidectomia cavidade aberta. A mastoidectomia cavidade fechada é mais conservadora e visa permitir preservar a estrutura anatômica e a fisiologia da orelha. A mastoidectomia cavidade aberta se diferencia da cavidade fechada por criar um espaço único entre a cavidade mastóidea e a orelha externa pela exérese da parede posterior do meato acústico externo (MAE) (Bento *et al.*, 1998; Syms e Luxford, 2003; Gantz *et al.*, 2005).

A mastoidectomia cavidade aberta é considerada, por muitos autores, o procedimento cirúrgico de escolha para o tratamento da otite média colesteatomatosa, devido à alta incidência de recidiva da doença (Karmarkar *et al.*, 1995; Roden *et al.*, 1996; Chang e Chen, 2000). Esta

técnica proporciona maior probabilidade de remoção de todo o colesteatoma e também melhor controle pós-operatório, pois permite a aspiração de eventuais recidivas da doença (Sanna *et al.*, 1984; Bento *et al.*, 1998; McElveen e Hulka, 1998; Gantz *et al.*, 2005).

Assim, a mastoidectomia cavidade aberta é um procedimento cirúrgico muito utilizado no tratamento das otites médias crônicas colesteatomatosas, inclusive no Brasil, país que apresenta alta prevalência de otites crônicas.

Porém, a formação desta cavidade única, pode gerar algumas complicações como: surdez, otorréia persistente, tontura e estética ruim (Saunders *et al.*, 1992; Gopalakrishnan *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003; Gantz *et al.*, 2005). Desse modo, costuma-se eliminar a cavidade aberta para melhora da qualidade de vida do paciente.

As técnicas para eliminação da cavidade aberta consistem na reconstrução da parede posterior do MAE, obliteração da cavidade ou ablação completa da orelha média (Palva, 1979; Mercke, 1987; Charachon *et al.*, 1988; Linthicum, 2002; Gantz *et al.*, 2005).

Diversos tipos de materiais têm sido utilizados para a obliteração da cavidade radical e a reconstrução do muro do facial. Os materiais mais empregados são os autólogos como cartilagem, osso, gordura, músculo e patê de osso que apresentam a vantagem de não sofrerem rejeição e podem ser conseguidos durante a cirurgia (Black, 1995). A desvantagem é a dificuldade de obtenção de material em quantidade suficiente para o procedimento.

As técnicas de obliteração da cavidade são as mais antigas técnicas de eliminação da cavidade mastóidea aberta, e são utilizadas até hoje. São divididas em técnicas que utilizam enxertos ou retalhos vascularizados (Mercke, 1987; Saunders *et al.*, 1992; Linthicum, 2002).

Os enxertos podem ser alógenos (orgânicos) ou aloplásticos (sintéticos). Os enxertos alógenos podem ser autólogos, homólogos ou heterólogos (Black, 1995).

Os enxertos autólogos são enxertos orgânicos obtidos no próprio indivíduo. Os enxertos homólogos são enxertos orgânicos obtidos de outro indivíduo da mesma espécie do receptor. Os enxertos heterólogos são enxertos orgânicos obtidos de indivíduos de outra espécie. Os enxertos aloplásticos são enxertos sintéticos produzidos laboratorialmente (Black, 1995).

Estes mesmos materiais podem ser obtidos de cadáver (homólogo) ou até mesmo de outras espécies (heterólogo), porém apresentam o inconveniente de risco de rejeição e transmissão de doenças infecciosas. Os materiais orgânicos também apresentam o inconveniente de sofrerem reabsorção ao longo do tempo (Black, 1995).

Desde 1962, com os experimentos de Mahoney (1962), que utilizou o metilmetacrilato, vários materiais sintéticos têm sido testados. As vantagens destes novos materiais seriam a facilidade de obtê-los e de não submeter o paciente ao risco de transmissão de doenças infecciosas. Por outro lado, apresentam problemas quanto à biocompatibilidade com altos níveis de rejeição (Hambley e Horn, 1981; Renard *et al.*, 1994; Rosenblut *et al.*, 1996; Kupperman e Tange, 1997 e 2001).

Mais recentemente, têm sido utilizados materiais sintéticos a base de cálcio e fosfato que apresentam estrutura bioquímica semelhante à fase mineral do osso humano. O primeiro material deste grupo estudado foi a hidroxiapatita. Este material tem apresentado bons resultados quando utilizado na reconstrução do MAE ou obliteração da cavidade mastóidea (Jahn, 1992; Yung, 1996; Hussain *et al.*, 2002). A partir do estudo da hidroxiapatita novos tipos de materiais foram desenvolvidos.

Um novo material similar à hidroxiapatita tem sido estudado para a reconstrução de defeitos ósseos em cirurgias ortopédicas, neurocirurgias e cirurgias bucomaxilofaciais (Mahr *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002; Kirschner *et al.*, 2002; Losee *et al.*, 2003). Trata-se do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato, que é um carbonato apatita formado pela mistura do alfa-tricálcio-fosfato com carbonato de cálcio e pó de monohidrato de monocálcio. Quando esses componentes são misturados a uma solução de fosfato de sódio formam uma estrutura cristalina, semelhante à fase mineral do osso, o dahllite (Mahr *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002; Kirschner *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003; Losee *et al.*, 2003).

Embora já utilizado em cirurgias, há mais de 10 anos, não existem estudos sobre a sua aplicação nas cirurgias de obliteração de cavidade mastóidea ou reconstrução do muro do facial na literatura indexada.

Delineamos este estudo experimental para testar a seguinte hipótese: o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é biocompatível em osso temporal de cobaia.

## **2 OBJETIVOS**

Estudar a biocompatibilidade do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na obliteração da cavidade mastóidea em cobaias por meio da:

- a) Análise da resposta inflamatória local.
- b) Análise da incidência de complicações.
- c) Análise da ossificação local.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**



### **3.1 Histologia Óssea**

O tecido ósseo é formado de células e matriz óssea (material intercelular calcificado). As células ósseas constituem uma pequena fração do tecido ósseo; contudo, são responsáveis por sua remodelação e pela homeostase mineral. São três tipos: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (Junqueira e Carneiro, 1990).

Os osteócitos são células achatadas em forma de amêndoa, e estão presentes no interior da matriz óssea, ocupando lacunas das quais partem canalículos. Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz (Junqueira e Carneiro, 1990).

Os osteoblastos são células mononucleares basófilas, com características de células secretoras. Originam-se de células mesenquimais osteoprogenitoras e são encontrados na superfície de formação óssea. Eles são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea: colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. São também capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando na mineralização da matriz (Puzas, 1996).

Segundo Mundi (1996) os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, originárias de monócito circulantes derivados de células hematopoiéticas localizadas na medula óssea. São responsáveis pela reabsorção óssea, entrando em contato com a superfície calcificada e formando as lacunas de reabsorção. Os osteoclastos são células ricas em

enzimas lisossômicas e colagenases, secretadas pela borda em escova da célula. Nesta borda está presente um grupo de proteínas contráteis que facilitam a adesão dos osteoclastos ao tecido, formando o compartimento de reabsorção.

Segundo Junqueira e Carneiro. (1990) e Landis *et al.* (1993) a matriz extracelular é composta de uma fase orgânica e outra inorgânica. A fase orgânica da matriz óssea é formada por fibras colágenas (95%) e substância fundamental amorfa que contém proteoglicanas e glicoproteínas. A fase inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, que se depositam em formas de cristais.

Os cristais que compõem a fase inorgânica da matriz óssea apresentam a estrutura de hidróxidoapatita, que possui a seguinte composição bioquímica:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Termine e Robey, 1996).

Segundo John (2002), estudos mais recentes têm demonstrado que os cristais não são puros e que cerca de 4 a 6% do fosfato ( $\text{PO}_4$ ) é substituído por um grupo carbonato ( $\text{CO}_3$ ). Desta forma, acredita-se que os cristais são, na verdade, carbonato apatitas. Estes cristais de carbonato apatita recebem a denominação de dahllite.

### 3.2 Biocompatibilidade

Segundo Williams (1991), a biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de apresentar uma resposta apropriada a uma aplicação específica.

Segundo Lemons (1996), os materiais biocompatíveis são divididos de acordo com a sua interação com o receptor como inertes, bioativos e biodegradáveis.

Blokhuis *et al.* (2000) em artigo de revisão, descrevem as características dos materiais biocompatíveis. Segundo estes autores, os materiais biocompatíveis inertes são aqueles nos quais não existe reação química entre o material e o tecido do receptor, materiais biocompatíveis bioativos são aqueles em que ocorre interação entre o material e o tecido do receptor ao redor do implante, e materiais biocompatíveis biodegradáveis são aqueles parcialmente ou completamente reabsorvidos.

Segundo Costantino *et al.* (2002) as características necessárias para um bom implante ósseo são: ser quimicamente inerte, não apresentar reação de hipersensibilidade ou de corpo estranho, ser moldável, manter a forma, não ser carcinogênico e apresentar bioatividade.

Para Kumar *et al.* (1999) a reação inflamatória do tipo corpo estranho é uma reação inflamatória crônica granulomatosa que ocorre nos tecidos devido à presença de corpos estranhos. Histopatologicamente caracteriza-se pela presença de células epitelióides e células gigantes do tipo corpo estranho. As células epitelióides são macrófagos transformados em células semelhantes a células epiteliais. As células gigantes tipo corpo estranho são

células multinucleadas formadas a partir da fusão de várias células epitelióides. Estas células podem ser visualizadas em cortes histopatológicos corados com hematoxilina-eosina ou azul de toluidina.

Jarcho *et al.* (1976) *apud* Blokhuis *et al.* (2000) definem a bioatividade de um implante ósseo pelas suas propriedades de osteocondução e osteointegração.

Segundo Urist *et al.* (1984), a osteocondutibilidade é a propriedade de um material funcionar como molde ou arcabouço para crescimento ósseo, permitindo que vasos e células da linhagem óssea oriundas das bordas da lesão invadam o material. Desse modo, ocorre formação óssea no interior do cimento. Esta propriedade depende da composição química, da porosidade e da estrutura geométrica do material. A porosidade é um dos fatores mais importantes para a osteocondutividade.

Segundo Lane e Bostrom (1998) o tamanho dos poros, a interconectividade entre eles e a relação entre o volume dos poros e o volume total do material são fatores importantes para propriedade osteocondutiva.

Daculsi e Passuti (1990) estudaram a osteocondutibilidade de materiais de cálcio e fosfato e concluíram que o diâmetro de poro mais apropriado para a osteocondutividade encontra-se no intervalo de 150 a 500  $\mu\text{m}$ .

Boyde *et al.* (1999) e Oonishi *et al.* (1999) estudaram a osteocondutibilidade da hidroxidoapatita e do beta-tricálcio-fosfato. Concluíram que a hidroxidoapatita e o beta-tricálcio-fosfato apresentam propriedades osteocondutivas.

Para Berghaus *et al.* (1984) a osteointegração refere-se à capacidade do material em apresentar uma ligação química direta entre a superfície do osso, sem a formação de um tecido fibroso entre eles. A presença de osteointegração permite maior rigidez entre o osso e o implante prevenindo a ocorrência de infecção e reabsorção do osso sob o implante.

### **3.3 Técnicas de Obliteração da Cavidade Mastóidea**

Black (1995) em seu artigo de revisão cita Blake como o primeiro autor a descrever uma tentativa de obliteração da cavidade mastóidea em 1889.

Linthicum *et al.* (2002) cita Del Canizo Suárez como o autor que descreveu a técnica de obliteração de cavidade mastóidea com enxerto de gordura em 1948.

Linthicum *et al.* (2002) analisando ossos temporais de cadáver que haviam sido submetidos à cirurgia de obliteração da mastóide com gordura, descreveram a presença de gordura viável após 13 anos da cirurgia.

Palva (1973) *apud* Mercke (1987) descreveu a técnica de obliteração da cavidade mastóidea com retalho de músculo e periósteo pediculado anteriormente.

Mercke (1987) descreveu uma técnica de cirurgia de colesteatoma na qual fez uma mastoidectomia cavidade aberta, removendo em bloco a parede posterior do MAE. Após a remoção do colesteatoma, a parede posterior do MAE foi reposicionada anatomicamente e, em seguida, a cavidade mastóidea foi obliterada com patê de osso. O autor observou bom

resultado após um ano de seguimento. Segundo ele a vantagem de obliterar a cavidade seria o menor risco de formação de bolsas de retração na membrana timpânica no pós-operatório tardio.

Saunders *et al.* (1992) realizaram 28 cirurgias de obliteração da cavidade mastóidea com uso de retalho de palva vascularizado associada à timpanoplastia e encontraram completa obliteração da cavidade mastóidea em 93% dos casos. Também observaram incidência de colesteatoma residual em quatro (19%) casos e perfuração da membrana timpânica em dois (9,5%) casos.

Leatherman *et al.* (2001) estudaram o uso de matriz óssea desmineralizada em obliterações de cavidade mastóidea em 20 ratos. Observaram que não houve incidência de complicações e que houve um processo de ossificação no interior do enxerto após nove semanas de estudo.

Ramsey *et al.* (2004) realizaram um estudo retrospectivo com 71 pacientes, portadores de OMC colesteatomatosa, que foram submetidos à cirurgia de mastoidectomia cavidade aberta mais obliteração da cavidade mastóidea com patê de osso e retalho de músculo e pericôndrio. Observaram bom resultado funcional em 82% dos casos sem nenhum caso de recorrência do colesteatoma. As principais complicações encontradas neste estudo foram: estenose do MAE (7%) e abscesso (1,4%).

Lee *et al.* (2005), realizaram um estudo retrospectivo com 151 pacientes que foram submetidos à cirurgia de mastoidectomia cavidade fechada associada à obliteração do epítimpano e antro com patê de osso e gordura abdominal. Relataram resultado satisfatório em 75,4% dos casos e

ausência de casos de retração da membrana timpânica. As complicações observadas pelos autores foram: perfuração de membrana timpânica (6,6%), infecção da ferida cirúrgica (11,9%), infecção do patê de osso (2%) e fístula cutânea (2%). Não observaram recorrência do colesteatoma.

Gantz *et al.* (2005), em estudo retrospectivo em 127 pacientes submetidos à cirurgia de reconstrução de MAE seguida de obliteração da cavidade utilizando-se da técnica descrita por Mercke em 1987, encontraram bom resultado funcional sem recorrência da doença em 98,5% dos casos. Em todos os casos o colesteatoma não erodia a parede posterior do MAE, possibilitando a sua reconstrução com a própria parede que havia sido removida.

### **3.4 O Modelo Animal**

O “guinea pig” (*cavia porcellus*) é um animal freqüentemente utilizado em modelos animais para estudos do osso temporal e orelha, devido às características de sua anatomia e histologia (Wysocki, 2005).

Goksu *et al.* (1992) e Wysocki (2005), realizaram estudos anatômicos em osso temporal de cobaia e observaram que o osso temporal do “guinea pig” é composto de três partes: petrosa, timpânica e esquamosa. A parte esquamosa em comparação ao homem é pouco desenvolvida. No entanto, as partes petrosa e timpânica são bem desenvolvidas. Apresentam também espaços aerados que se comunicam com a cavidade timpânica como as células mastóideas do ser humano. A cadeia ossicular possui diferenças em relação ao ser humano, pois o martelo e a bigorna apresentam-se fundidos, formando um complexo incudomaleolar. O sistema de aeração celular do

osso temporal da “guinea pig” é composto pelas bulas timpânicas ventral e dorsal e as células retrotimpânicas. A maior célula do osso temporal do “guinea pig” é a bula timpânica ventral seguida da bula timpânica dorsal. As células retrotimpânicas se dividem em três grupos: inferior, pósteros superior e ântero superior. A presença de uma bula timpânica bem desenvolvida permite que, quando aberta, tenhamos um acesso amplo à cavidade timpânica. Este acesso possibilita uma boa visualização da cadeia ossicular e das estruturas da orelha interna e média, permitindo a realização de estudos da cadeia ossicular, membrana timpânica e cóclea. A comunicação entre a bula timpânica dorsal e a cavidade timpânica é através de um hiato localizado em sua porção inferior, no qual se projeta o complexo incudomaleolar (Anexo A).

Takahashi e Nakano (1996) utilizaram o “guinea pig” como modelo animal de obliteração de cavidade mastóidea. Os autores obliteraram a bula timpânica dorsal da cobaia com grânulos de hidróxidoapatita e observaram que a hidróxidoapatita foi biocompatível.

Kayhan e Algün (2003) estudaram histologicamente o osso temporal do “guinea pig” e observaram que a cavidade timpânica e as células mastóideas apresentavam revestimento mucoso composto por epitélio simples pavimentoso não ciliado.



### 3.5 Materiais Aloplásticos

Mahoney (1962) descreveu pela primeira vez o uso de um material aloplástico em osso temporal. O material utilizado foi o polimetilmetacrilato, que atualmente é um implante amplamente utilizado em cirurgias ortopédicas. É um material biocompatível com mínima reação de corpo estranho (Lykins *et al.*, 1994). Durante o processo de endurecimento, apresenta o inconveniente de sofrer uma reação exotérmica (Cohen *et al.*, 1999).

Segundo Shea *et al.* (1984), o uso do proplast em cirurgias de obliteração de cavidade mastóidea foi introduzido por Shea e Holms em 1974. Em 1984 estes autores publicaram um estudo retrospectivo, analisando resultados tardios de reconstrução de MAE com uso de proplast e encontraram resultados satisfatórios em 63% dos casos.

Helms e Geyer (1994) utilizaram o cimento ionomérico em cirurgias de remoção de neurinoma do acústico em 12 pacientes para o fechamento de acessos translabirínticos. Descrevem bom resultado pós-operatório após três anos de seguimento, não apresentando nenhum caso de fístula liquórica ou complicação.

Leatherman *et al.* (2002) estudaram o uso de partículas de vidro bioativo na obliteração de cavidade mastóidea em cobaias. Foram implantadas 10 cobaias e sacrificadas nove semanas após. Estes autores não observaram complicações e o estudo histopatológico dos ossos temporais demonstrou que o material foi biocompatível não apresentando reação inflamatória granulomatosa.

Jang *et al.* (2007) repetiram os estudos de Bryan com o uso de partículas de vidro bioativo. Utilizaram como modelo animal o “guinea pig” e também encontraram bons resultados. O estudo histopatológico não demonstrou sinais de processo inflamatório e houve crescimento de tecido ósseo no interior do implante. Apesar dos bons resultados apresentados em estudos experimentais, ainda não existem estudos clínicos em cavidades mastóideas de seres humanos.

### **3.6 Implantes Aloplásticos de Cálcio e Fosfato**

Os implantes aloplásticos de cálcio e fosfato são aqueles compostos de cálcio e fosfato na forma de apatita. A apatita é um composto em forma de cristais que possui estrutura química representada pela fórmula  $Ca_5(X)(PO_4)_3$ . Nesta estrutura a posição X pode ser ocupada por íons flúor (F), cloro (Cl), hidróxido (OH), ou meio carbonato ( $CO_3$ ) (Costantino, 2001 e 2002). Os cimentos de cálcio e fosfato mais utilizados são: hidroxidoapatita, beta-tricálcio-fosfato e alfa-tricálcio-fosfato e são todos bioativos (Costantino, 2001; LeGeros, 2002).

Yung (1996) realizou um estudo com 34 pacientes que foram submetidos à cirurgia de obliteração de cavidade mastóidea aberta com uso grânulos de hidroxidoapatita. Observou apenas um caso (3%) de resultado insatisfatório com manutenção da otorréia.

Hussain *et al.* (2002) utilizaram cimento de hidroxidoapatita na obliteração de cavidade mastóidea aberta em 29 pacientes. Observaram apenas um caso (3,5%) de resultado insatisfatório, que foi devido à estenose da meatoplastia gerada por intensa granulação no implante.

LeGeros (2002), realizou uma revisão de literatura e relatou que os implantes de cálcio e fosfato têm sido produzidos na forma de cerâmica ou cimento. Os implantes na forma de cerâmica são sólidos e podem ser utilizados na forma de placas, blocos, grânulos ou próteses de diferentes formas. Segundo ele, os implantes na forma de cimento são compostos de duas fases, uma sólida (pó) e outra líquida, que quando misturados formam uma pasta que após algum tempo se solidifica. O tempo de solidificação varia de acordo com o tipo de cimento utilizado.

Dornhoffer e Simmons (2003) em um estudo experimental com 10 cobaias, obliterando a cavidade mastóidea com hidroxidoapatita não encontraram nenhum caso de complicação, e a análise histológica mostrou ausência de reação inflamatória tipo corpo estranho e presença de intensa ossificação.

Kveton e Coelho (2004), em estudo retrospectivo com 102 pacientes submetidos à reconstrução de osso temporal com uso de hidroxidoapatita relataram sucesso na correção cirúrgica em 97% dos casos. Em três pacientes (3%) houve infecção do implante com necessidade de retirada do implante.

Burstein *et al.* (2006) estudaram 150 pacientes submetidos à reconstrução de defeitos crânio orbitais com uso de hidroxidoapatita e encontraram complicações em 9% dos casos, como formação de seroma e fragmentação do implante.

Segundo Chow *et al.* (2002) a hidroxidoapatita é um mineral que possui a estrutura química  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e é o principal componente do osso. Compõe 60% de todo esqueleto humano. Tem sido produzida desde

1970 e utilizada clinicamente há mais de 25 anos. É biocompatível e não causa reação inflamatória crônica ou resposta granulomatosa com células gigantes de corpo estranho.

Minoda *et al.* (2007) estudaram 12 pacientes submetidos à cirurgia de obliteração de cavidade mastóidea com cimento de osso beta-tricálcio-fosfato. Observaram melhora da otorrêa em 100% dos casos, e o estudo histopatológico da biópsia realizado nas bordas da superfície da cavidade obliterada, demonstrou a presença de intensa ossificação.

### **3.6.1 Cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato**

O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é composto de três solutos: alfa-tricálcio-fosfato, carbonato de cálcio e fosfato de monocálcio (Frankenburg *et al.*, 1998). Quando esses componentes são misturados a uma solução de fosfato de sódio formam uma estrutura cristalina de carbonato apatita semelhante à fase mineral do osso, o dahllite (Constantz *et al.*, 1995; Ison *et al.*, 1994). O tempo de preparo do material, que consiste na mistura da fase sólida com a solução de fosfato de sódio é de aproximadamente dois minutos, e o tempo para manipulação do material é de cinco minutos. Após a colocação do material, ocorre o seu endurecimento com a formação de dahllite. O tempo de endurecimento na temperatura corpórea normal é de 10 minutos (Constantz *et al.*, 1995; Kopylov *et al.*, 1996 e 1999).

Constantz *et al.* (1995), estudaram a composição bioquímica e a estrutura cristalina do dahllite formado na reação de solidificação do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato, e constataram que é semelhante ao dahllite

naturalmente presente no osso. O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é biocompatível, osteointegrado, mas não osteocondutivo. O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é microporoso, o que não permite o crescimento ósseo interno (LeGeros, 2002). Estudos em animais demonstram que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato sofre remodelação óssea semelhante ao que ocorre no osso normal. Este material sofre reabsorção osteoclástica seguida de migração osteoblástica e formação de osso novo (Constantz *et al.*, 1995; Frankenburg *et al.*, 1998).

Frankenburg *et al.* (1998) utilizaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em reparo de lesões ósseas de tíbia de cães e observaram que o cimento endurece mesmo em ambiente úmido numa reação isotérmica. Os autores também concluíram que o material é biocompatível por não apresentarem reação inflamatória tipo corpo estranho e é gradualmente reabsorvido e substituído por osso novo.

Mahr *et al.* (2000), utilizaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na reconstrução de defeitos do crânio em três pacientes e observaram bons resultados cirúrgicos em todos os pacientes.

Baker *et al.* (2002), utilizaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na reconstrução de defeitos do crânio em 16 pacientes e observaram um caso de infecção do material e dois casos de microfragmentação. Para os autores estas complicações não são graves e concluem o estudo recomendando o uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato nas cirurgias reconstrutivas de crânio.

Hoffmann *et al.* (2003) estudaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na reconstrução da cadeia ossicular em animais. Os resultados

demonstraram baixos níveis de inflamação e reação de corpo estranho. O tempo de estudo foi de duas semanas. Os autores observaram que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato endurece mais rápido que a hidroxiapatita, e também que este cimento endurece melhor em ambiente úmido que a hidroxiapatita.

Tañag *et al.* (2004), utilizaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em cirurgias de reconstrução de assoalho de órbita em cobaias e observaram bom resultado clínico e ausência de reação inflamatória tipo corpo estranho à análise histopatológica.

Elshahat e Shermak (2004) fizeram um estudo comparativo utilizando o vidro bioativo, a matriz óssea desmineralizada e o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em cirurgias de correção de defeitos ósseos da calota craniana de cobaias. Observaram que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é mais rígido e estável que os outros dois materiais, porém demora mais tempo para ser substituído por osso novo por não ser osteocondutivo.

McDowell *et al.* (2005) estudaram o uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em cadeia ossicular de cobaias. Este estudo foi realizado com 16 cobaias e não encontraram reação inflamatória significativa em nenhuma orelha estudada.

### **3.7 Complicações Relacionados a Implantes Aloplásticos em Osso Temporal**

Hambley e Horn (1981) estudaram seis pacientes que foram submetidos à obliteração da cavidade mastóidea com proplast. Observaram que em quatro casos (67%) ocorreu otorrêia persistente com necessidade de remoção do material. Estes autores concluíram que o proplast não é indicado para este tipo de cirurgia.

Renard *et al.* (1994) e Reusche *et al.* (1995), descreveram casos fatais de encefalopatia por alumínio em pacientes que receberam implantes de cimento ionomérico.

Rosenblut *et al.* (1996) estudaram o uso de silicone em cavidades mastóideas de macacos. Os autores obliteraram a cavidade mastóidea de macacos com silicone e encontraram grande incidência de reação inflamatória tipo corpo estranho.

Kupperman e Tange (1997) estudaram a obliteração da cavidade mastóidea de ratos com o cimento ionomérico. Foram implantados 17 ratos e acompanhados por um período de 12 meses. Encontraram incidência de morte por infecção do material em 29% dos casos e formação de tecido de granulação ao redor do implante em todos os ratos após 12 meses da implantação do cimento.

Estrem e Highfill (1999) estudaram 31 pacientes que foram submetidos à cirurgia de obliteração de cavidade mastóidea ou reconstrução de parede posterior de MAE com uso de hidróxidoapatita. Observaram incidência de reação granulomatosa no sítio do implante em 13% dos casos e um caso de extrusão do implante (3%).

Kupperman e Tange (2001) utilizaram o cimento ionomérico para obliteração de cavidade mastóidea em um estudo clínico com 23 pacientes. Este estudo demonstrou alto grau de extrusão do material (39%) até dois anos de seguimento.

Poetker *et al.* (2004) realizaram um estudo com 76 pacientes submetidos à cranioplastia com hidroxidoapatita e cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato para fechamento de acessos cirúrgicos de tumores de ângulo ponto cerebelar e observaram uma incidência de infecção com necessidade de retirada do implante em 2,63% dos casos.

Mahendran e Yung (2004) realizaram um estudo com oito pacientes que foram submetidos à cirurgia de obliteração de cavidade mastóidea com cimento de hidroxidoapatita e encontraram alta incidência de complicações. Observaram presença de reação granulomatosa com conseqüente necessidade de remoção do implante em 50% dos casos.



### 3.8 Osteoneogênese em Implantes Ósseos

Segundo Junqueira e Carneiro. (1990) a osteoneogênese que ocorre após a lesão do osso, depende do perióstio e do endóstio próximos à área lesada. O perióstio e o endóstio respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células que constitui um colar em torno da fratura e penetra em direção à lesão. Neste anel ou colar conjuntivo, ocorre a formação de tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam quanto por ossificação intramembranosa. A matriz óssea que ainda não está calcificada recebe o nome de osteóide ou pré-osso.

Frankenburg *et al.* (1998), estudaram histopatologicamente defeitos ósseos de tíbia que foram preenchidos com cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato. Observaram presença de osteoclastos adjacentes a áreas de reabsorção do cimento, sugerindo que a substituição do cimento seria por uma ação osteoclástica seguida de formação de osso novo.

Edwards *et al.* (1998) estudaram o grau de ossificação que ocorre em implantes de matriz óssea desmineralizada. Como sinais histopatológicos de ossificação, consideraram a presença de condrócitos, cartilagem, osteoblastos ativos, tecido osteóide, trabéculas ósseas e medula óssea no interior do implante. As amostras foram coradas com azul de toluidina. Fizeram uma análise semi-quantitativa do grau de ossificação utilizando-se de uma escala que variava de 0 a 4.

Leatherman *et al.* (2001) estudaram histopatologicamente ossos temporais de ratos que foram submetidos à obliteração de cavidade

mastóidea com implante composto de matriz óssea desmineralizada. Observaram presença de tecido osteóide, osteoblastos ativos, condrócitos, cartilagem e medula óssea nas áreas com neoformação óssea no interior do implante. Estudaram ainda o grau de ossificação no interior do implante após nove semanas. Utilizando-se de uma escala que variava de 0 a 4 o escore médio de neosteogênese nas amostras foi de 3,5.

Leatherman *et al.* (2002) estudaram histopatologicamente ossos temporais de cobaias que foram submetidas à obliteração de cavidade mastóidea com implante composto de cerâmica de vidro bioativo. Observaram que houve ossificação em 100% da área do implante com neovascularização, trabéculas ósseas e medula óssea.

Tañag *et al.* (2004) estudaram histopatologicamente o osso orbitário de cobaias que foram submetidas à cirurgia de reconstrução de rebordo orbitário com implante composto de cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato. Observaram que após dois meses da colocação do implante havia áreas de ossificação na periferia do implante com intensa neovascularização e reabsorção do material. As áreas reabsorvidas formavam invaginações que estavam preenchidas por tecido osteóide.

## **4 MÉTODOS**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob protocolo nº 918/03 (Anexo B). O estudo experimental foi realizado em concordância com o manual sobre cuidados de animais de laboratório (National Research Council, 2003).

O experimento foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) da FMUSP. A pesquisa foi financiada por verba de auxílio à pesquisa, aprovada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 04/10074-2.

## **4.1 Material**

### **4.1.1 Seleção dos animais**

Foram estudados “guinea pig” (*Cavia porcellus*) obtidos a partir de criadores especializados e mantidos pelo próprio criador. Os animais ficaram alojados em jaulas individuais em um biotério e receberam água à vontade e ração uma vez ao dia.

Foram selecionados, inicialmente, 20 animais adultos, jovens e saudáveis, todas fêmeas, com idade entre 10 e 12 meses e peso entre 350 e 450 g. Foram excluídos animais com sinais de infecção em orelha externa ou média, gestantes e portadores de mal formação congênita.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparação dos animais**

Cada animal selecionado foi identificado com dispositivo numerado, grampeado no pavilhão auricular contralateral ao procedimento. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas previamente a cada procedimento anestésico.

### **4.2.2 Protocolo anestésico**

As cobaias foram anestesiadas com uma mistura de ketamina (40 mg/kg) e xilasina (8 mg/kg) intramuscular. Permitindo, assim, bom nível anestésico por período de 60 a 90 minutos sem depressão respiratória. Se o procedimento durar mais que 90 minutos ou o animal começar a reagir pode-se complementar a anestesia utilizando-se metade da dose.

Todos os animais receberam antibioticoterapia profilática no momento da indução anestésica com cefazolina (50 mg/kg) intramuscular.

### **4.2.3 Grupos de estudo**

Uma amostra de 20 cobaias, selecionadas de acordo com os critérios de seleção, foram divididas aleatoriamente em dois grupos. Um grupo receberá o cimento alfa-tricálcio-fosfato e o outro não.

- a) Grupo cimento (A): Submetido à obliteração da cavidade mastóidea com o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato.
- b) Grupo controle (B): Submetido ao procedimento cirúrgico sem obliteração da cavidade mastóidea.

#### 4.2.4 Protocolo cirúrgico

Os animais foram posicionados sobre a mesa cirúrgica, em decúbito lateral direito e recobertos por campo estéril. O procedimento foi estéril de acordo com as normas de assepsia cirúrgica. Todos os passos foram realizados sob visualização com microscópio cirúrgico.

##### 4.2.4.1 Protocolo cirúrgico grupo cimento

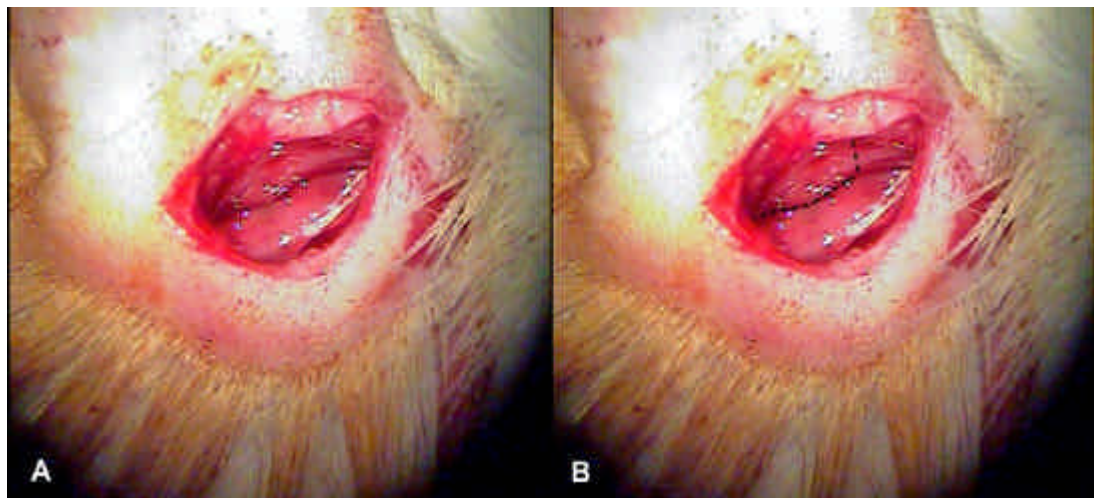
a) Infiltração de região retroauricular com lidocaína a 2% com vasoconstritor.

b) Incisão retroauricular próximo ao sulco retroauricular em formato de “C” (Figura 1).

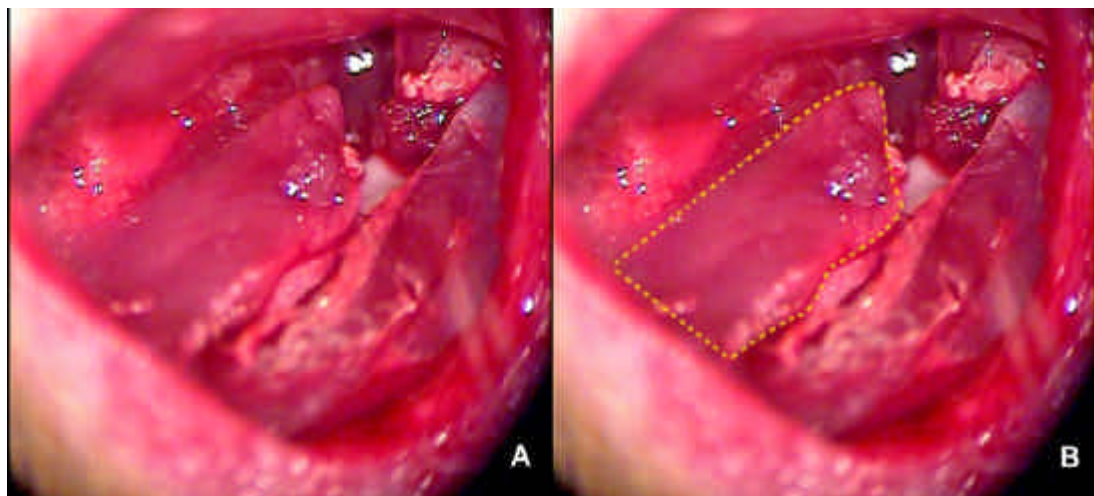


Figura 1 - Incisão retroauricular em “C” de 3 cm na orelha esquerda

c) Confeção de retalho muscular pediculado posteriormente: após a incisão cutânea é rebatido um retalho de pele e subcutâneo anteriormente e posteriormente deixando músculo e perióstio abaixo. A seguir, incisa-se o músculo e perióstio de modo a formar um retalho retangular de 5 mm de largura com a sua base voltada posteriormente, sendo assim o retalho muscular permanecerá pediculado recebendo irrigação sanguínea (Figuras 2 e 3).

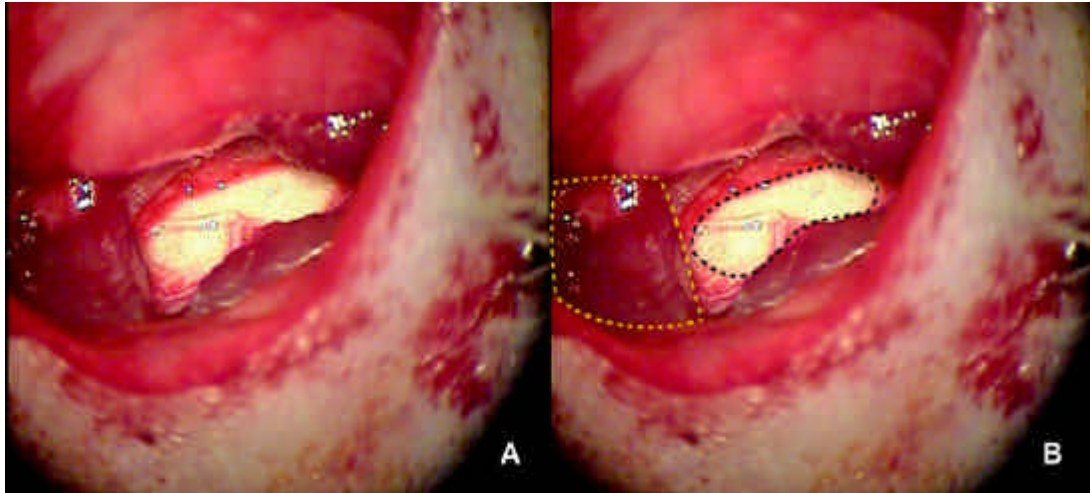


**Figura 2 - Orelha esquerda: (A) incisão retroauricular de 3 cm e exposição de músculo temporal. O pavilhão auricular está rebatido anteriormente; (B) representação esquemática demonstrando local da incisão do retalho muscular (pontilhado preto)**



**Figura 3 - Orelha esquerda: (A) retalho músculo periosteal pediculado posteriormente; (B) representação esquemática demonstrando o retalho músculo periosteal (pontilhado amarelo)**

d) Exposição do osso temporal: após as incisões, o retalho muscular é descolado com uma rugina da cortical do osso temporal expondo-o (Figura 4).

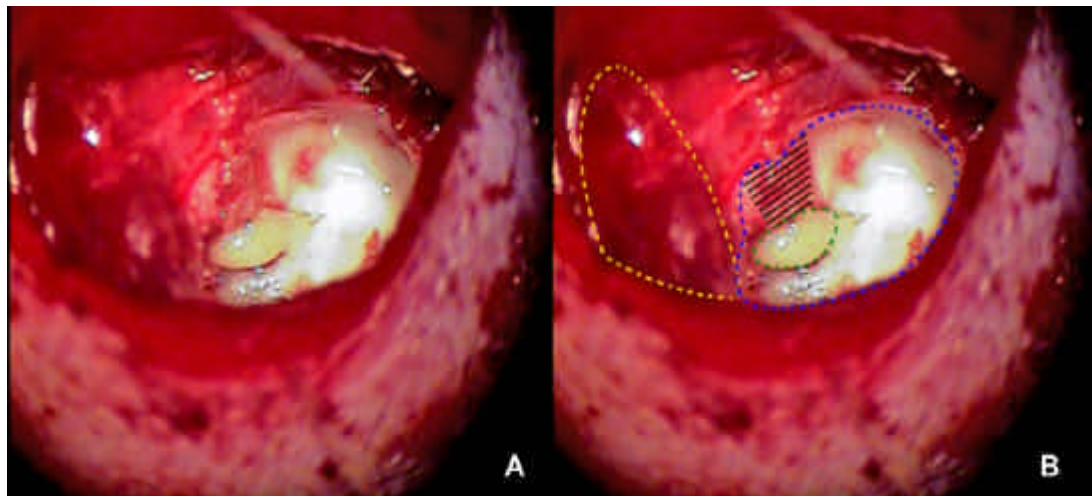


**Figura 4 - Orelha esquerda: (A) exposição da cortical da mastóide após afastamento do retalho músculo periosteal; (B) representação esquemática demonstrando retalho músculo periosteal afastado (pontilhado amarelo) e local da cortical da mastóide que será aberta (pontilhado preto)**

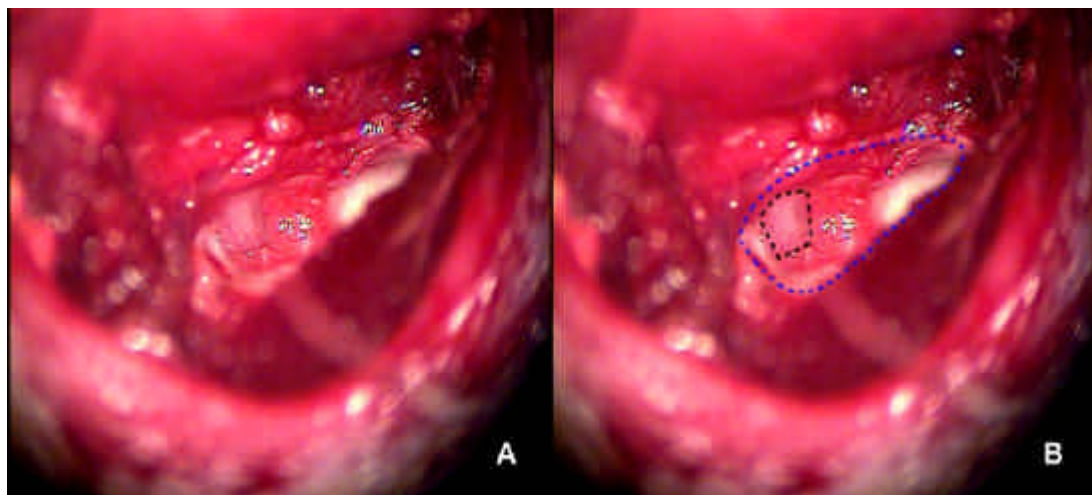
d) Broqueamento da cortical da mastóide: com o uso de um micromotor cirúrgico e broca cortante inicia-se o broqueamento da cortical da mastóide sob irrigação constante com soro fisiológico e abertura da bula timpânica dorsal.

e) Exposição e identificação da bula timpânica dorsal e broqueamento da parede posterior do MAE. Na medida em que se progride o broqueamento da mastóide atinge-se uma grande célula aerada, que é denominada bula timpânica dorsal nas cobaias. Após a abertura da cavidade mastóidea broca-se a parede posterior do MAE tomando-se o cuidado de preservar a pele do MAE. Foram preservados o anel timpânico, a membrana timpânica e as estruturas da orelha média. (Figuras 5 e 6).





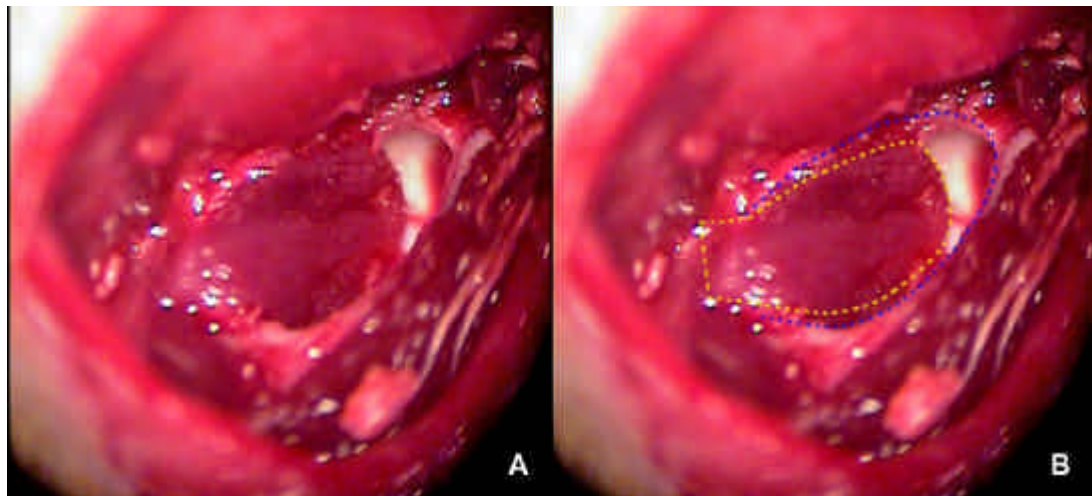
**Figura 5 - Orelha esquerda: (A) bula timpânica aberta. (B) representação esquemática demonstrando a bula timpânica (pontilhado azul), cadeia ossicular (pontilhado verde), retalho músculo periosteal afastado (pontilhado amarelo) e parede posterior do MAE (tracejado preto)**



**Figura 6 - Orelha esquerda: (A) bula timpânica após remoção da parede posterior do MAE; (B) representação esquemática da bula timpânica aberta (pontilhado azul) e da parede posterior óssea do MAE removida (pontilhado preto) com exposição da pele do MAE**

f) Limpeza da cavidade: limpeza cuidadosa da cavidade mastóidea com a remoção de toda a mucosa e restos de osso.

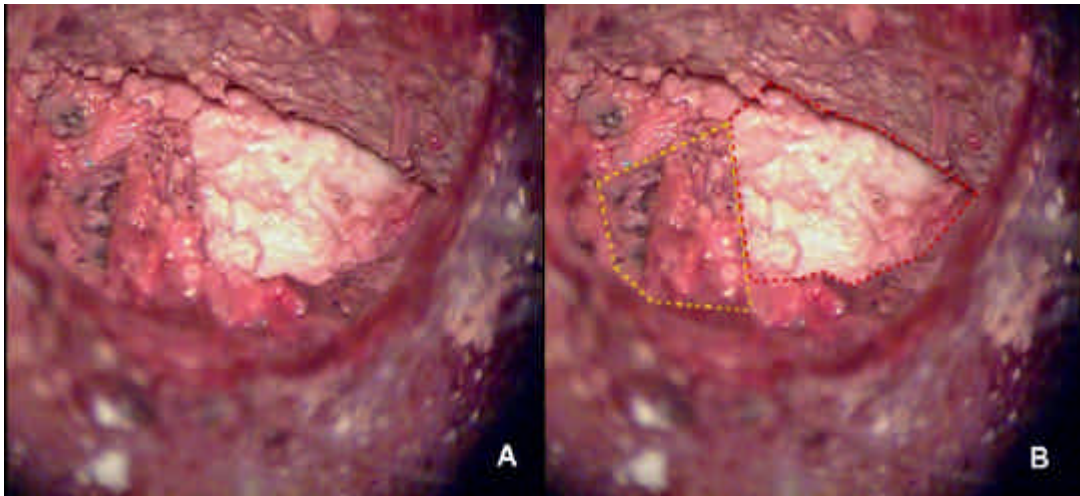
g) Rotação do retalho muscular: o retalho muscular é rodado de modo a cobrir a falha óssea do MAE que foi previamente removida (Figura 7).



**Figura 7 - Orelha esquerda: (A) bula timpânica aberta com rotação do retalho músculo periosteal para o interior da bula timpânica cobrindo defeito ósseo da parede posterior do MAE; (B) representação esquemática da bula timpânica (pontilhado azul) e retalho muscular (pontilhado amarelo)**

h) Preparo do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato: o produto vem acondicionado em dois recipientes, um copo contendo pó de fosfato de cálcio estéril e um frasco contendo fosfato de sódio diluído estéril. A proporção entre o pó e o solvente não precisa ser calculado, bastando misturar o conteúdo total de ambos os frascos. A mistura deve ser aplicada e moldada em até três minutos, quando se inicia o endurecimento do produto que se completa em 10 minutos.

i) Obliteração da bula timpânica com cimento ósseo e confecção de nova parede posterior do MAE: após o preparo do cimento ósseo, este é colocado obliterando totalmente a bula timpânica (Figura 8).



**Figura 8 - Orelha esquerda: (A) bula timpânica obliterada com cimento de osso; (B) representação esquemática do cimento de osso obliterando a bula timpânica (pontilhado vermelho) e base do retalho músculo periosteal (pontilhado amarelo)**

j) Fechamento por planos: reposicionando o retalho de pele e subcutâneo e sutura em dois planos com catgut 4-0 em subcutâneo e nylon 5-0 em pele.

#### **4.2.4.2 Protocolo cirúrgico grupo controle**

No grupo controle foram realizados os mesmos tempos cirúrgicos do grupo cimento com exceção à obliteração da bula timpânica com o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato, deixando a cavidade vazia.

#### **4.2.5 Sacrifício dos animais**

As cobaias foram sacrificadas 60 dias após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram inicialmente anestesiados com ketamina 160 mg/kg e xilasina 16 mg/kg. Após 10 minutos de sedação profunda, foi administrado injeção letal de KCl 19,1% intracardíaco.

#### 4.2.6 Protocolo de análise clínica

Após sacrificados, as cobaias foram submetidas a análise clínica da cicatriz operatória, do MAE, da membrana timpânica, da orelha média e da cavidade mastóidea.

A otoscopia para estudo do MAE, da membrana timpânica e da orelha média foi realizada com uso de um microscópio cirúrgico após a remoção do pavilhão auditivo (Figuras 9 e 10).



Figura 9 - Inspeção da ferida cirúrgica após 60 dias e após tricotomia (orelha esquerda)

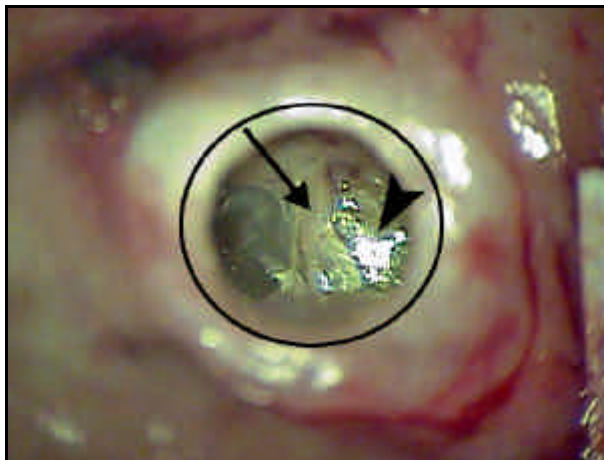


Figura 10 - Otoscopia após sacrifício do animal e remoção do pavilhão auricular. Note o MAE sem sinais de estenose (círculo preto) e a membrana timpânica normal sem efusão em orelha média; cabo do martelo (seta) e preservação do brilho (ponta de seta) (orelha esquerda)

#### 4.2.7 Protocolo de análise histológica

Após a avaliação clínica das cobaias, realizamos a retirada do osso temporal de todos os animais dos grupos cimento e controle. Após a retirada do osso temporal foram preparados cortes histopatológicos para estudo deste material.

##### 4.2.7.1 Procedimento de retirada do osso temporal

Os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos à incisão interauricular. A pele, o tecido subcutâneo as fáscias e os músculos foram dissecados de modo que toda a face lateral do osso temporal da cobaia esteja exposto.

Após a exposição do osso, com o uso de um escopo, martelo e bisturi, o osso temporal previamente operado é totalmente removido (Figura 11).

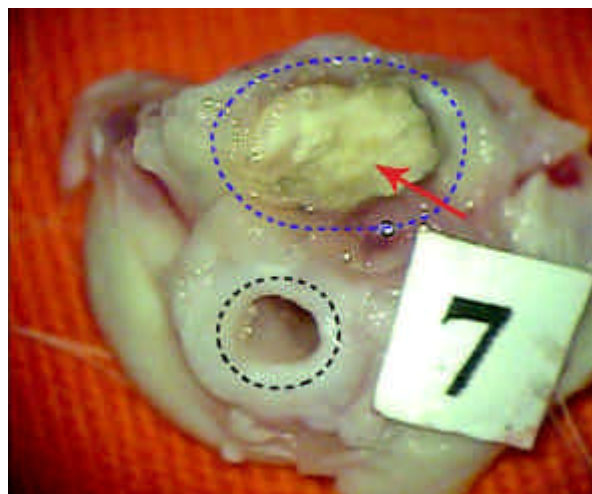


Figura 11 - Osso temporal esquerdo da cobaia removido. Note o cimento de osso (seta vermelha) obliterando bula timpânica (pontilhado azul) e o MAE (pontilhado preto)

#### 4.2.7.2 Técnica de preparo do material para estudo histopatológico

O osso temporal removido é limpo em água corrente e retirado todos os restos de tecidos moles de sua superfície como fáscia, músculo e nervos. A peça então é fixada com etanol a 70% por três dias a 4°C. A seguir a peça é desidratada em etanol absoluto (100%) por cinco dias e mantida em tolueno por mais um dia.

A peça então é impregnada com resina segundo o protocolo:

a) Solução A (três a cinco dias)

25% de Dibutilftalato (Merck  $C_{16}H_{22}O_4$  - nº 814157) - (25 mL de Dibutilftalato)

75% de Metilmetacrilato 1 - 75 mL de Metilmetacrilato

b) Solução a 1 % (três a cinco dias) - Solução A + 1 gr de Peróxido de Benzoíla<sup>2</sup>

c) Solução a 2% (três a cinco dias)

Solução A + 2 gramas de Peróxido de Benzoíla<sup>2</sup>

A seguir a peça é incluída em blocos, estando pronta para ser cortada.

As peças foram submetidas à corte transversal paralela ao maior eixo da bula timpânica.

Com o uso de uma serra com disco diamantado de baixa rotação (Isomet-Buehlerum), foram confeccionados cortes de 1 mm de espessura. Posteriormente, a peça resultante do segundo corte é colada a uma placa de acrílico de 2 x 40 x 70 mm.

---

<sup>1</sup> Merck  $C_5H_8O_2$  - 800590

<sup>2</sup> Sigma  $C_{14}H_{10}O_4$  B2030



Utilizando-se de uma polimetriz metalográfica e lixas abrasivas de carbeto e silício não ferroso, nas granulações de 1000, 2500 e 4000, os cortes foram afinados e polidos até atingirem a espessura de 10 µm. Concluídos estes procedimentos, as lâminas foram coradas com azul de toluidina e encaminhadas para o estudo histopatológico.

Os cortes foram desplastificados em Metilmetacrilato puro por 20 - 40 minutos e desidratados em etanol absoluto.

#### **4.2.7.3 Estudo histopatológico**

O estudo histopatológico foi realizado por patologista experiente do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de São Paulo que utilizou um microscópio óptico. As lâminas foram analisadas histologicamente com a coloração de azul de toluidina e examinadas inicialmente em um aumento panorâmico para identificação de todos os campos, e a seguir em aumentos de 12,5, 40, 50, 200 e 400x.

#### **4.2.8 Análise dos dados**

Para a análise da biocompatibilidade do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato foram estudados os seguintes parâmetros:

- a) Resposta inflamatória.
- b) Incidência de complicações.
- c) Grau de ossificação.

#### 4.2.8.1 Análise da resposta inflamatória

Como parâmetro histopatológico para a avaliação da biocompatibilidade do material foi estudado a presença ou não de resposta inflamatória granulomatosa com células gigantes. Para a análise da reação inflamatória com células gigantes utilizamos uma classificação adaptada da classificação proposta por Hoffmann *et al.* (2003). Eles graduaram a resposta inflamatória em 4 graus de acordo com a intensidade de sinais de inflamação crônica. Como esta classificação não é adequada nos casos em que há infecção aguda do material, incluímos mais uma subclassificação que nós denominamos grau V. Desse modo, a classificação que será utilizada neste estudo será a seguinte:

Grau I: Ausência de sinais de reação inflamatória.

Grau II: Presença de edema mínimo sem a formação de granulomas.

Grau III: Presença de reação inflamatória granulomatosa com células gigantes.

Grau IV: Presença de reação inflamatória granulomatosa com células gigantes e infiltrado linfocitário em tecidos moles adjacentes.

Grau V: Presença de reação inflamatória com infiltrado inflamatório linfocitário com neutrófilos e fibrose cicatricial.

De acordo com o grau de resposta inflamatória dado pelo patologista na análise histológica, dividimos os pacientes em três tipos de acordo com o tipo de reação inflamatória encontrada (Quadro 1).

Os dados quanto ao grau e tipo de reação inflamatória serão comparados entre os grupos cimento e controle e submetido à análise estatística.



**Quadro 1 - Classificação do tipo de resposta inflamatória**

<b>Tipo</b>	<b>Grau</b>	<b>Significado</b>
1	I e II	Presença de alterações cicatriciais normais ao procedimento cirúrgico
2	III e IV	Presença de alterações de inflamação ao material extrínseco (reação de corpo estranho)
3	V	Presença de inflamação aguda (possível infecção)

**4.2.8.2 Análise das complicações**

Para a análise da presença de complicações relacionadas ao cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato foram estudados a incidência dos seguintes eventos:

- Morte do animal.
- Efusão em orelha média.
- Sinais de infecção da pele ou músculo.
- Sinais de necrose da pele ou músculo.
- Extrusão do material.
- Estenose do MAE.
- Fístula cutânea.

**4.2.8.3 Análise do grau de ossificação**

Para a análise do grau de ossificação, as lâminas foram analisadas por um patologista que avaliou sinais de ossificação no interior da cavidade mastóide. Como sinais histopatológicos de ossificação consideramos a presença de condrócitos, cartilagem, osteoblastos ativos, tecido osteóide, trabéculas ósseas e medula óssea no interior da cavidade.

A análise do grau de ossificação no interior da cavidade foi semi-quantitativa, no qual adotamos uma classificação em 5 graus de 0 a 4 (Quadro 2) proposta por Edwards *et al.* (1998) e utilizada por Leatherman *et al.* (2002) em seus estudos de ostenoegênese em materiais aloplásticos.

A cada amostra atribuímos um escore de 0 a 4 de acordo com o grau de ossificação. A partir da soma dos escores das amostras, obtivemos a média dos escores de ossificação para os grupos cimento e controle. A partir da média dos escores analisamos estatisticamente a presença ou não de diferença na intensidade de ossificação entre os dois grupos.

**Quadro 2 - Classificação do grau de ossificação e escore atribuído de acordo com o grau de ossificação da amostra**

<b>Grau</b>	<b>Achado histopatológico</b>	<b>Escore</b>
O	Ausência de sinais de ossificação	0
I	1% - 25% da cavidade com sinais de ossificação	1
II	26% - 50% da cavidade com sinais de ossificação	2
III	51% - 75% da cavidade com sinais de ossificação	3
IV	75% - 100% da cavidade com sinais de ossificação	4

### 4.3 Análise Estatística

O cálculo do tamanho da amostra foi feito tomando-se como 0 % a incidência de reação de corpo estranho ou de inflamação crônica da cavidade de cobaias submetidas à mastoidectomia sem obliteração da mesma, a um nível de significância de 5%, e poder (erro tipo II) de 80 % em um teste de hipótese monocaudal. Foram necessários 10 cobaias em cada grupo (estudo e controle) para se detectar uma diferença mínima de 6,5 % de incidência de reação de corpo estranho ou de inflamação crônica da cavidade após a obliteração com cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato (Lwanga e Lemeshow, 1991).

As variáveis qualitativas foram descritas por meio de sua frequência e as semi-quantitativas de suas médias e desvios-padrão. Para a comparação das prevalências dos diferentes graus de inflamação e ossificação e incidência de complicações entre os grupos foi utilizado o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. As médias dos escores atribuídos a cada grau de ossificação foram também comparadas entre os grupos utilizando-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Admitiu-se nível de significância de  $p = 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando-se o software SPSS for Windows versão 10.0<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> SPSS Inc - Chicago, IL

## **5 RESULTADOS**

A média do peso inicial dos animais de grupo controle foi de 396,8 g e a média do peso final foi de 570 g. A média de ganho de peso no grupo controle foi de 173,3 g durante o período de estudo. A porcentagem de ganho de peso sobre o peso inicial no período foi de 43,7%.

A média do peso inicial dos animais de grupo cimento foi de 398,8 g e a média do peso final foi de 574,3 g. A média de ganho de peso no grupo cimento foi de 175,5 g durante o período de estudo. A porcentagem de ganho de peso sobre o peso inicial no período foi de 44,0%.

Em ambos os grupos, a incidência de morte após o procedimento foi de 2 (20,0%) animais no primeiro dia pós-operatório ( $p = 1,0$ ), provavelmente por complicações anestésicas, pois ocorreram no primeiro pós-operatório e foram iguais nos dois grupos. A análise clínica dos animais restantes não identificou sinais de reação inflamatória granulomatosa ao redor do cimento. Também não foram observados sinais de outras complicações - infecção da pele e músculo, sinais de efusão em orelha média, estenose de MAE, extrusão do material ou fístula cutânea - em nenhuma amostra dos grupos controle e cimento.

Os dados de peso, sobrevivência, sinais de infecção da pele e músculo, sinais de necrose da pele e músculo, sinais de efusão em orelha média, estenose de MAE e fístula cutânea estão relacionados nos Quadros de 3 a 6.

**Quadro 3 - Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo cimento (A) de 1 a 5**

Número	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
Sobrevivência	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Peso inicial	380	400	440	400	390
Peso final	557	580	590	570	-
Efusão em orelha média	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de infecção da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de necrose da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Extrusão do material	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Estenose do MAE	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Fístula cutânea	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-

Aus. - Ausente

**Quadro 4 - Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo cimento (A) de 6 a 10**

Número	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10
Sobrevivência	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Peso inicial	380	380	400	410	390
Peso final	560	566	-	590	584
Efusão em orelha média	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.
Sinais de infecção da pele ou músculo	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.
Sinais de necrose da pele ou músculo	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.
Extrusão do material	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.
Estenose do MAE	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.
Fístula cutânea	Aus.	Aus.	-	Aus.	Aus.

Aus. - Ausente

**Quadro 5 - Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo controle (B) de 1 a 5**

Número	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5
Sobrevivência	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Peso inicial	390g	414g	390g	380g	360g
Peso final	564g	592g	594g	546g	-
Efusão em orelha média	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de infecção da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de necrose da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Extrusão do material	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Estenose do MAE	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Fístula cutânea	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-

Aus. - Ausente

**Quadro 6 - Avaliação clínica das cobaias. Animais grupo controle (B) de 6 a 10**

<b>Número</b>	<b>B 6</b>	<b>B 7</b>	<b>B 8</b>	<b>B 9</b>	<b>B 10</b>
Sobrevivência	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Peso inicial	440g	400g	380g	380g	350g
Peso final	556g	594g	554g	560g	-
Efusão em orelha média	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de infecção da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Sinais de necrose da pele ou músculo	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Extrusão do material	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Estenose do MAE	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-
Fístula cutânea	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	-

Aus. - Ausente

Após a remoção dos ossos temporais, observamos que em todas as amostras do grupo cimento o material estava firmemente aderido à cavidade mastóidea.

As análises histológicas do grau e do tipo de reação inflamatória entre os grupos cimento e controle estão apresentadas na Tabela 1. Não houve sinais de presença de reação inflamatória tipo corpo estranho no grupo cimento com oito (100%) das amostras apresentando reação inflamatória graus I e II (Figura 12). Apenas três animais do grupo controle (37,5%) apresentaram reação inflamatória do tipo 3, enquanto todos os demais (100% do grupo cimento e 62,5% do grupo controle) apresentaram resposta inflamatória do tipo 1. Apesar da diferença apresentada entre as prevalências dos tipos de reação inflamatória entre os grupos, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,2$ ).

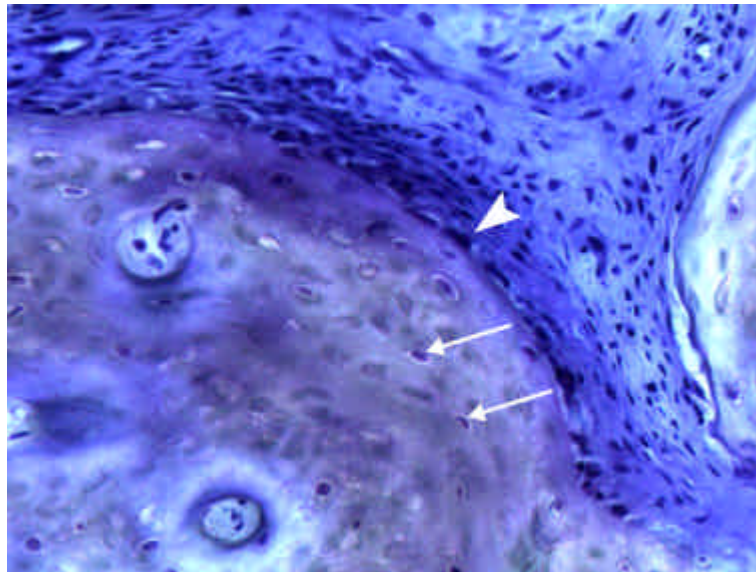


Figura 12 - Corte histológico da bula timpânica corado com azul de toluidina (200x) mostrando trabécula óssea nova. Note presença de osteócitos no interior da trabécula (seta branca) e osteoblastos na periferia da mesma (ponta de seta). Ausência de neutrófilos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

Tabela 1 - Resultados da análise histológica dos grupos cimento e controle. Graus de reação inflamatória

	Grupo		p	Total (n = 16)
	Cimento (n = 8)	Controle (n = 8)		
<b>Grau de Reação Inflamatória</b>				
I	7 (87,5 %)	3 (37,5 %)	0,09	10 (62,5 %)
II	1 (12,5 %)	2 (25,0 %)		3 (18,8 %)
III	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		0 (0,0 %)
IV	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		0 (0,0 %)
V	0 (0,0 %)	3 (37,5 %)		3 (18,8 %)
<b>Tipo de Reação Inflamatória</b>				
1	8 (100,0 %)	5 (62,5 %)	0,2	13 (81,3 %)
2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		0 (0,0 %)
3	0 (0,0 %)	3 (37,5 %)		3 (18,8 %)

Quanto ao estudo do grau de ossificação, o grupo controle apresentou ossificação grau III em 4 (50%) amostras e grau IV (50%) em quatro amostras estudadas (Figura 13). No grupo cimento observou-se ossificação grau I em 8 (100%) das amostras (Tabela 2, Figuras 14 e 15).



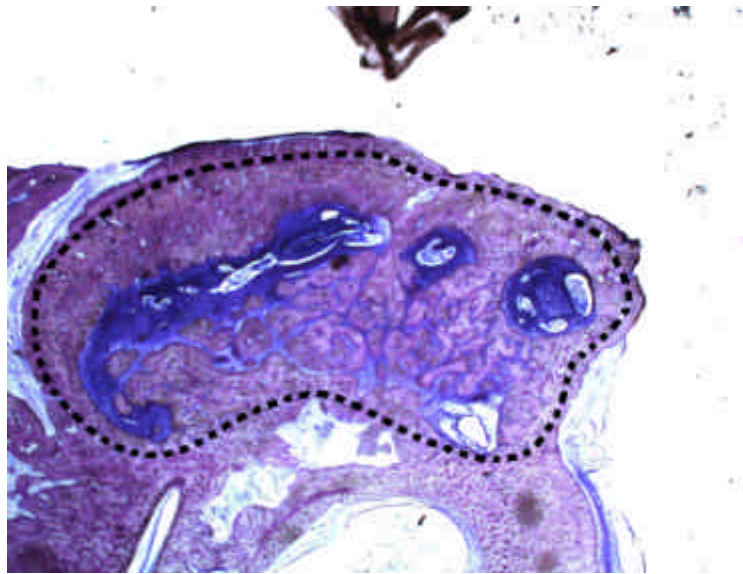
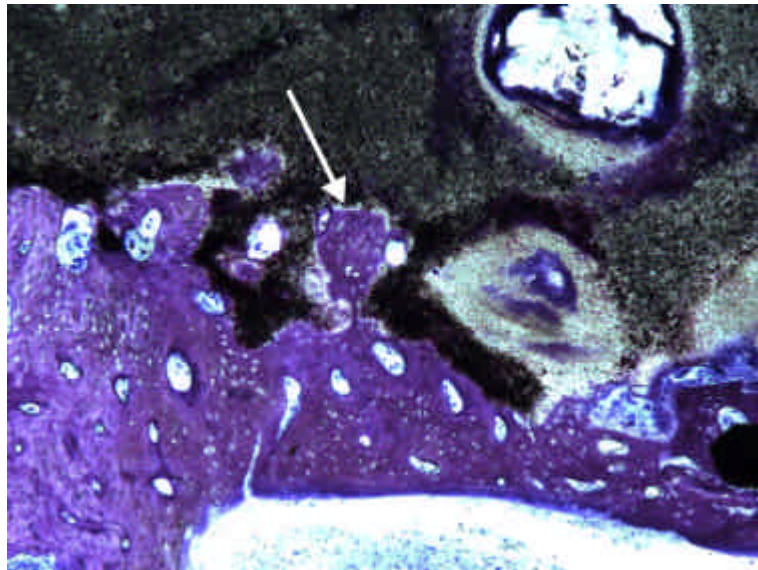


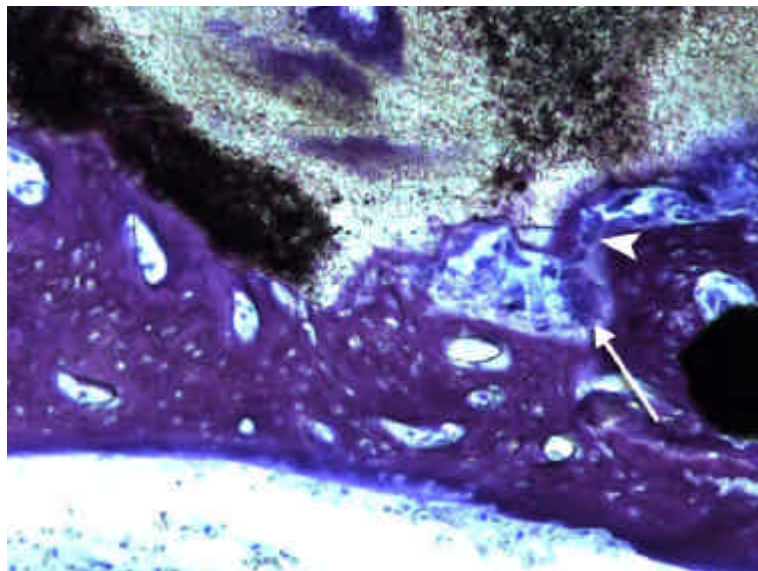
Figura 13 - Corte histológico da bula timpânica do grupo controle corado com azul de toluidina (12,5x) mostrando intensa ossificação da cavidade (pontilhado)

Tabela 2 - Grau de ossificação dos grupos controle e cimento

Grau	Grupo		p	Total (n = 16)
	Cimento (n = 8)	Controle (n = 8)		
0 - ausente	0 (0,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)
I - 1% - 25% da cavidade	8 (100%)	0 (0,0 %)		8 (50 %)
II - 26% - 50% da cavidade	0 (0,0%)	0 (0,0 %)	0,001	0 (0,0 %)
III - 51% - 75% da cavidade	0 (0,0 %)	4 (50,0 %)		4 (25,0 %)
IV - 76% - 100% da cavidade	0 (0,0 %)	4 (50,0 %)		4 (25,0 %)



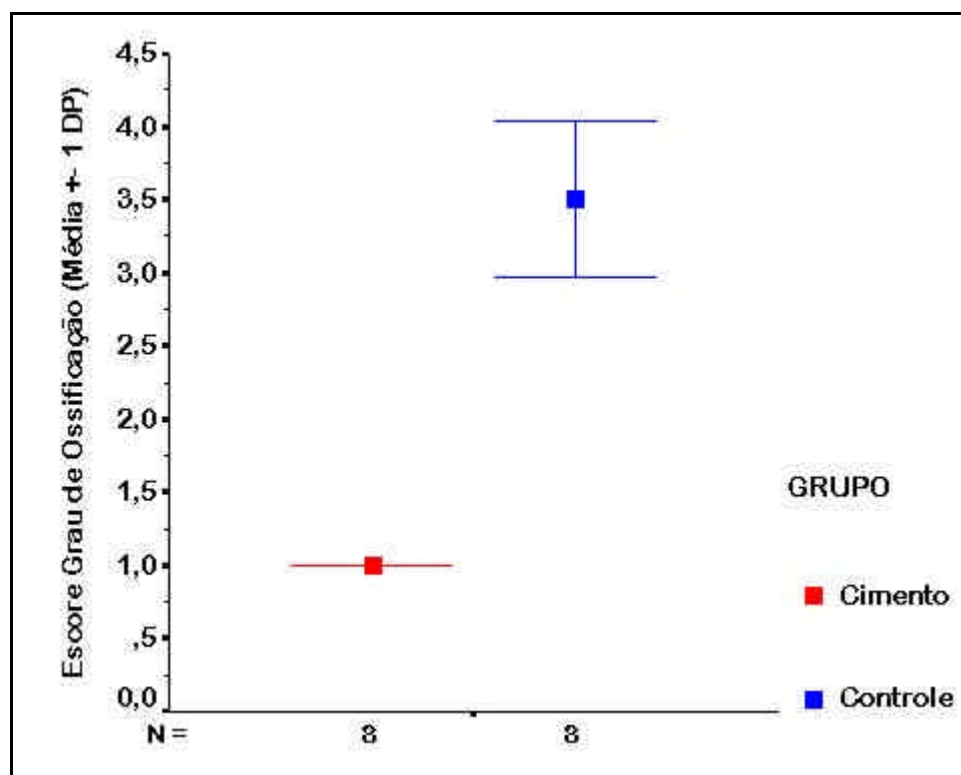
**Figura 14 -** Corte histológico da bula timpânica do grupo cimento corado com azul de toluidina (100x) mostrando trabécula óssea nova (seta) invadindo o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato (substância amorfa preta)



**Figura 15 -** Corte histológico da bula timpânica do grupo cimento corado com azul de toluidina (100x) mostrando atividade osteogênica ao redor do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato (substância amorfa preta). Note a presença de osteoclasto (seta) e osteoblastos marginais (ponta de seta)

Somando-se os escores de ossificação obtidos por cada amostra, observamos que o grau de ossificação médio do grupo controle (3,5) foi maior que o verificado no grupo cimento (1). O grupo controle apresentou de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) graus mais intensos de ossificação (média  $3,5 \pm 0,5$ ) do que o grupo cimento (média  $1 \pm 0,0$ ) (Gráfico 1).

**Gráfico 1 - Média dos escores de grau de ossificação dos grupos controle e cimento**



## **6 DISCUSSÃO**

A obliteração da cavidade mastóidea aberta é uma técnica utilizada há muitos anos em cirurgias de otite média crônica colesteatomatosa (Mercke, 1987; Saunders *et al.*, 1992; Black, 1995; Linthicum, 2002; Ramsey *et al.*, 2004; Gantz *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Os materiais utilizados para o preenchimento da cavidade mastóidea em cirurgias de obliteração podem ser classificados em orgânicos ou sintéticos (aloplásticos) (Black, 1995).

Implantes aloplásticos têm a vantagem de poderem ser obtidos em quantidade suficiente a cada cirurgia e apresentar menor risco de transmissão de doenças infecciosas, no entanto, podem apresentar maiores riscos de infecção e rejeição (Hambley e Horn, 1981; Rosenblut *et al.*, 1996; Kupperman e Tange, 1997; Mahendran e Yung, 2004).

Estudos experimentais e clínicos realizados com cimento ionomérico, proplast e o silicone; observaram alta incidência de complicações (Hambley e Horn, 1981; Renard *et al.*, 1994; Rosenblut *et al.*, 1996; Kupperman e Tange, 1997 e 2001). Devido à alta taxa de incidência de complicações o cimento ionomérico, o proplast e o silicone deixaram de ser utilizados em cirurgias de obliteração da cavidade mastóidea.

Com o surgimento dos materiais de cálcio e fosfato com estrutura bioquímica semelhante à fase inorgânica do osso, novos materiais como a hidroxiapatita e os cimentos de cálcio fosfato têm sido estudados, porém

até este momento não existe na literatura nenhum trabalho que estudou especificamente a biocompatibilidade do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em cavidades mastóideas.

Segundo a definição de Willians (Williams, 1991) para biocompatibilidade, o material biocompatível é aquele que apresenta uma resposta apropriada a uma aplicação específica. No caso de cirurgias de obliteração da cavidade mastóidea, além do material não sofrer rejeição, ele deve permitir a manutenção da fisiologia da orelha média, pois existem técnicas de mastoidectomia cavidade aberta que permitem a manutenção da estrutura e da fisiologia da orelha média (Mercke, 1987; Gantz *et al.*, 2005).

A escolha da “guinea pig” neste estudo experimental foi devido às características anatômicas do osso temporal deste animal. Este animal possui uma grande bula timpânica dorsal que, fazendo uma analogia com o osso temporal humano, a bula timpânica dorsal seria o equivalente ao recesso epitimpânico e ao ático. Esta bula localiza-se póstero superiormente à cavidade timpânica e possui relações com a cavidade intracraniana superiormente, com a porção petrosa do osso temporal medialmente, e com a cavidade timpânica e o MAE inferiormente (Goksu *et al.*, 1992; Wysocki, 2005).

A presença de uma grande cavidade aerada e facilmente acessível cirurgicamente (Goksu *et al.*, 1992; Wysocki, 2005), permitiu a aplicação do cimento de osso em um ambiente com características análogas a cavidade mastóidea dos seres humanos. Ou seja, uma cavidade delimitada por osso, apresentando íntima relação com a orelha média e a região intracraniana, além de possuírem revestimento mucoso semelhante ao da cavidade

mastóidea do homem (Kayhan e Algün, 2003). Quando realizado a retirada da parede posterior do MAE, a bula timpânica se comunica com o MAE, formando uma cavidade única semelhante àquela encontrada nas cavidades mastóideas abertas.

Outros fatores que influenciaram na escolha da “guinea pig” foram: a existência de estudos que aplicaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato na cadeia ossicular deste animal (Hoffmann *et al.*, 2003; McDowell *et al.*, 2005), e um estudo que obliterou a bula timpânica da guinea pig com a hidroxiapatita (Takahashi e Nakano, 1996). Todos estes estudos apresentaram bons resultados.

Embora não existam estudos sobre modelos experimentais de cavidade mastóidea aberta em “guinea pig”, o modelo por nós adotado é semelhante ao utilizado por outros autores em *Meriones unguiculatus*, um roedor semelhante a um rato originário da Mongólia (Leatherman e Dornhoffer, 2002; Dornhoffer e Simmons, 2003). Neste modelo animal, confecciona-se cirurgicamente uma cavidade mastóidea aberta contígua ao MAE com preservação da membrana timpânica e estruturas da orelha média. No nosso modelo, diferentemente do que ocorre na cavidade mastóidea aberta, nós preservamos a pele do MAE. A decisão de preservar a pele do MAE deve-se a preocupação de evitar infecção do material por microorganismos presentes no MAE.

O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato quando se solidifica forma cristais de dahllite com a mesma estrutura bioquímica do dahllite naturalmente presente no osso (Constantz *et al.*, 1995; Termine e Robey,

1996; John, 2002; LeGeros, 2002). A formação de uma substância presente naturalmente no osso sugere fortemente que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato seja biocompatível em cirurgias de reparos ósseos.

O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato já tem sido amplamente utilizado no preenchimento de defeitos ósseos em cirurgias ortopédicas, neurocirurgias e cirurgias bucomaxilofaciais e a sua biocompatibilidade demonstrada em diversos estudos experimentais e clínicos (Berghaus *et al.*, 1984; Frankenburg *et al.*, 1998; Mahr *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002; Tañag *et al.*, 2004; Elshahat e Shermak, 2004).

A escolha do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato para este estudo foi fundamentada pela existência de estudos que comprovam a sua segurança e aplicabilidade em seres humanos (Mahr *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002). Além disso, as características físico-químicas de secagem rápida mesmo em local úmido (Frankenburg *et al.*, 1998) e aderência ao osso (Hoffman, 2003) sugerem bom uso clínico em cirurgias de obliteração de cavidade mastóidea. Outros fatores que determinaram a escolha deste material foram as publicações dos estudos de Hoffmann *et al.* (2003) e McDowell *et al.* (2005) que aplicaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em cadeia ossicular da guinea pig. Os ossículos com cimento foram depositados na bula timpânica e não apresentaram reação inflamatória tipo corpo estranho no local. Além disso, apesar de utilizado em outras regiões do corpo como calota craniana e mandíbula, não existem estudos que utilizaram o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato em obliteração de cavidade mastóidea. A cavidade mastóidea possui características diferentes das



cavidades originadas de falhas ósseas na mandíbula ou na calota craniana. Na cavidade mastóidea o cimento poderia não apresentar a mesma biocompatibilidade de quando é utilizado em outras regiões do corpo, motivo pelo qual estudos específicos em cavidade mastóidea são necessários.

Para o estudo da biocompatibilidade, as amostras foram estudadas utilizando-se de parâmetros clínicos e histopatológicos. A classificação em 5 graus de reação inflamatória utilizada neste estudo para mensuração do grau de reação inflamatória, foi criada a partir da adaptação da classificação utilizada por Hoffmann *et al.* (2003), que estudaram o grau de reação inflamatória em cirurgia de reconstrução de cadeia ossicular em cobaias com uso do cimento alfa-tricálcio-fosfato. Esta classificação que foi utilizada por Hoffmann *et al.* (2003) era dividida em 4 graus. Como esta classificação era inadequada nos casos de presença de reação inflamatória aguda, acrescentamos um quinto grau (grau 5). A partir desta classificação em 5 graus subdividimos em três grupos que denominamos tipos 1, 2 e 3. O tipo 1 corresponde, histopatologicamente, à presença de reação inflamatória que normalmente ocorre em tecidos submetidos a trauma cirúrgico e engloba os graus I e II. O tipo 2 corresponde, histopatologicamente, à presença de reação inflamatória tipo corpo estranho e engloba os graus III e IV. O tipo 3 corresponde, histopatologicamente, à presença de reação inflamatória aguda com possível infecção e engloba o grau V.

Em nosso estudo observamos que não houve sinais clínicos de rejeição ao material como presença de sinais de reação inflamatória granulomatosa e sinais de extrusão do implante em nenhuma das amostras

estudadas. A análise histopatológica, todas as amostras que receberam o cimento alfa-tricálcio-fosfato, não apresentaram sinais de reação inflamatória tipo corpo estranho, que normalmente ocorre nos processos de rejeição ao material (Kumar *et al.*, 1999).

Estes achados são compatíveis com os estudos publicados por outros autores que observaram que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato não induz a formação de reação inflamatória tipo corpo estranho quando implantado em ossos do corpo (Frankenburg *et al.*, 1998; Mahr *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003; Tañag *et al.*, 2004; Elshahat e Shermak, 2004; McDowell *et al.*, 2005).

Este estudo também demonstrou que o uso do cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato não apresentou complicações como infecção do sítio operatório, necrose da pele adjacente ao cimento implantado, estenose do MAE ou fístula cutânea. Estes achados são semelhantes aos encontrados em estudos com outros materiais aloplásticos, como o cimento de vidro bioativo (Leatherman *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2007) e a hidroxidoapatita (Takahashi e Nakano, 1996; Dornhoffer e Simmons, 2003). A incidência de morte foi igual em ambos os grupos e foi devido a complicações anestésicas.

A ausência de efusão em orelha média é sinal de que houve preservação de parte da fisiologia da orelha média. Este resultado também foi observado por Hoffmann *et al.* (2003) e McDowell *et al.* (2005) que colocaram uma pequena quantidade de cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato no interior da bula timpânica da “guinea pig”.

Para o estudo do grau de ossificação utilizamos a mesma metodologia que foi utilizada por Edwards *et al.* (1998) e Leatherman *et al.* (2001 e 2002) em seus estudos de ossificação com materiais aloplásticos. Os sinais histopatológicos de ossificação adotados por estes autores são os mesmos descritos por Junqueira e Carneiro (1999), ou seja, presença de tecido osteóide, osteoblastos ativos, condrócitos, cartilagem e medula óssea. A substância utilizada para a coloração das lâminas neste estudo foi o azul de toluidina, a mesma substância utilizada por Edwards *et al.* (1998) e Leatherman *et al.* (2001 e 2002) em seus estudos.

A ossificação ocorreu em todas as amostras do grupo cimento, embora em menor intensidade quando comparado com o grupo controle. Este achado de menor grau de ossificação do grupo cimento está de acordo com os estudos que demonstram que o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato não é osteocondutivo (Constantz *et al.*, 1995). O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato não é osteocondutivo por ser microporoso, o que não permite o crescimento ósseo interno (Urist *et al.*, 1984; Daculsi e Passuti, 1990; Lane e Bostrom, 1998). Esta característica é uma das diferenças entre o cimento alfa-tricálcio-fosfato e a hidróxidoapatita que é osteocondutiva (Boyde *et al.*, 1999).

No grupo cimento observamos à análise histopatológica sinais de reabsorção e crescimento ósseo somente na periferia do implante. Estes achados são compatíveis com os estudos que demonstram que apesar de não ser osteocondutivo, o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato sofre remodelação óssea semelhante ao que ocorre no osso normal (Puzas, 1996;

Mundi, 1996). Este material sofre reabsorção osteoclástica seguida de migração osteoblástica e formação de osso novo (Constantz *et al.*, 1995; Frankenburg *et al.*, 1998; Tañag *et al.*, 2004), ou seja, se o implante permanecer no local por mais tempo além dos 60 dias deste estudo, poderá haver substituição de todo o implante por osso novo. Estes achados demonstram que apesar de não ser osteocondutivo, o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é bioativo e osteointegrado (Berghaus *et al.*, 1984; Lemons, 1996; Blokhuis *et al.*, 2000; Costantino *et al.*, 2002).

Não podemos afirmar se o maior tempo necessário para substituição do implante por osso novo representa uma vantagem ou uma desvantagem ao procedimento. Se por um lado uma maior velocidade de ossificação pode representar menor tempo de resolução do processo cicatricial, por outro lado, um maior tempo de permanência do implante pode representar maior estabilidade e manutenção do formato da área reconstruída. Esta maior estabilidade evitaria retrações e colapamento da área obliterada.

Quando comparamos nossos resultados obtidos com o cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato com os resultados obtidos por autores que estudaram a cerâmica de vidro bioativo e a hidroxidoapatita em modelos experimentais, vemos que os resultados em termos de biocompatibilidade são igualmente bons. O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato, a hidroxidoapatita e a cerâmica de vidro bioativo não induziram formação de resposta inflamatória granulomatosa tipo corpo estranho e não foram observados incidência de complicações (Takahashi e Nakano, 1996; Leatherman *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2007).

As propriedades de secagem mesmo em ambiente úmido (Frankenburg *et al.*, 1998) e aderência ao osso (Hoffmann *et al.*, 2003) podem constituir em vantagens em relação à hidroxidoapatita. A cavidade mastóidea é úmida e muitas vezes com presença de sangue. Além disso, o fato do material se aderir ao osso adjacente é um fator que pode representar maior estabilidade no leito cirúrgico.

Apesar dos bons resultados encontrados neste estudo, ainda não podemos afirmar se este material terá resultado satisfatório em cirurgias de obliteração de cavidade mastóidea em humanos. Em cirurgias de colesteatoma existem fatores como infecção da cavidade e a presença do próprio colesteatoma, que não existem nos modelos animais. Podemos utilizar como exemplo a hidroxidoapatita que possui composição bioquímica semelhante ao cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato. Apesar dos bons resultados encontrados em estudos experimentais de obliteração de cavidade mastóidea com a hidroxidoapatita (Takahashi e Nakano, 1996; Dornhoffer e Simmons, 2003), quando utilizado em seres humanos em cirurgias de colesteatoma apresenta resultados controversos (Jahn, 1992; Estrem e Highfill, 1999; Hussain *et al.*, 2002; Poetker *et al.*, 2004; Mahendran e Yung, 2004; Kveton e Coelho, 2004; Burstein *et al.*, 2006).

## **7 CONCLUSÕES**

Com este trabalho podemos concluir que:

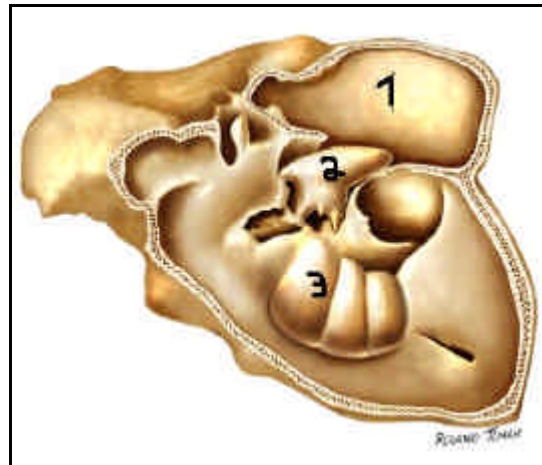
a) O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato é biocompatível em cavidade mastóidea de cobaias.

b) O cimento de osso alfa-tricálcio-fosfato sofre remodelação óssea, porém não apresenta propriedade de osteocondução.

## **8 ANEXOS**



**Anexo A - Desenho esquemático de osso temporal de “guinea pig” em corte transversal**



- Onde:
- 1 - bula timpânica dorsal
  - 2 - cadeia ossicular
  - 3 - cóclea

**Anexo B - Aprovação do Projeto de Pesquisa**

DIRETORIA CLÍNICA


Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**APROVAÇÃO**

A 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, em sessão de 10.12.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **918/03**, intitulado: "Utilização de Cimento de Osso Dahllite Norian Cranial Repair System (CRS) no Tratamento Cirúrgico da Cavidade Mastóidea Aberta. Estudo Experimental em Cobaias" apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**.

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Rubens Vuono de Brito Neto

Pesquisador(a) Executante: Dr. Robinson Koji Tsuji

CAPPesq, 10 de Dezembro de 2003.

  
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

**OBSERVAÇÃO:** Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

## **9 REFERÊNCIAS**

Baker S, Weinzweig, J, Kirschner RE, Bartlett SP. Applications of a new carbonated calcium phosphate bone cement: early experience in pediatric and adult craniofacial reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109(6):1789-96.

Bento RF, Miniti A, Marone SAM. *Tratado de otologia.* 1ª ed., São Paulo: EDUSP; 1998.

Berghaus A, Mulch G, Handrock M. Porous polyethylene and proplast: their behavior in a bony implant bed. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1984; 240:115-9.

Black B. Mastoidectomy elimination. *Laryngoscope.* 1995; 105(12 Pt 2):1-30.

Blokhuis T, Termaat M, Den Boer F, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma.* 2000; 48 (1): 179-86.

Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P. Osteoconduction on large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone.* 1999; 24:579-89.

Burstein FD, Williams JK, Hudgins R, Boydston W, Reisner A, Stevenson K, Cohen S. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction: experience in 150 patients. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(2):484-9.

Chang C, Chen M. Canal-wall-down tympanoplasty with mastoidectomy for advances cholesteatoma. *J Otolaryngol*. 2000; 29:270-3.

Charachon R, Gratacap B, Tixier C. Closed versus obliteration technique in cholesteatoma surgery. *Am J Otol*. 1988; 9(4):286-92.

Chow LC, Takagi S, Costantino PD, et al. Self setting CaP cements. *Mater Res Symp Proc*. 1991; 179:3-24, *Clin Orthop Relat Res*. 2002; (395):81-98. Review.

Cohen MS, Costantino PD, Friedman CD. Biology of implants used in head and neck surgery. *Fac Plast Surg Clin North Am*. 1999; 7:17-33.

Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*. 1995; 267:1796-9.

Costantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S, Moche J. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg*. 2002; 18(1):13-26.

Costantino PD, Hiltzik DH, Sen C, Friedman CD, Kvetnos JF, Snyderman CF, Noy AR. Sphenoid cerebrospinal fluid leak repair with hydroxyapatite cement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;127:588-93.

Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1990; 11:86-7.

Dornhoffer J, Simmons O. Canal wall reconstruction with Mimix hydroxyapatite cement: results in an animal model and case study. *Laryngoscope*. 2003; 113(12):2123-8.

Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; (357):219-28.

Elshahat A, Shermak MA, Inoue N, Chao EY, Manson P. The use of novabone and norian in cranioplasty: a comparative study. *J Craniofac Surg.* 2004; 15(3):483-9.

Estrem SA, Highfill G. Hydroxyapatite canal wall reconstruction/mastoid obliteration. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 120(3):345-9.

Frankenburg EP, Goldstein SA, Bauer TW, Harris SA, Poser RD. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80:1112-24.

Gantz BJ, Wilkinson EP, Hansen MR. Canal wall reconstruction tympanomastoidectomy with mastoid obliteration. *Laryngoscope.* 2005; 115:1734-40.

Goksu N, Hazirolu R, Kemaloglu Y, Karademir N, Bayramoglu I, Akyildiz N. Anatomy of the guinea pig temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992; 101(8):699-704.

Gopalakrishnan S, Chadha SK, Gopalan G, Ravi D. Role of mastoid obliteration in patients with persistent cavity problems following modified radical mastoidectomy. *J Laryngol Otol.* 2001; 115(12):967-72.

Hambley WM, Horn KL. Failure of proplast in mastoid obliteration. *Am J Otol.* 1981; 2(3):286-8.

Helms J, Geyer G. Closure of the petrous apex of the temporal bone with ionomeric cement following translabyrinthine removal of an acoustic neuroma. *J Laryngol Otol.* 1994; 108: 202-5.

Hoffmann KC, Kuhn JJ, Strasnick. N. Bone cements as adjuvant techniques for ossicular chain reconstruction. *Otol Neurotol.* 2003; 24:24-8.

Hussain A, Ram B, Hilmi OJ. Reconstruction of mastoid cavity with hydroxyapatite cement and postauricular flap. *Laryngoscope.* 2002; 112(3):583-5.

Ikeda M, Yoshida S, Ikui A, Shigihara S. Canal wall down tympanoplasty with canal reconstruction for middle-ear cholesteatoma: post-operative hearing, cholesteatoma recurrence, and status of re-aeration of reconstructed middle-ear cavity. *J Laryngol Otol.* 2003; 117(4):249-55.

Ison I, Fulmer B, Barr B, et al. Synthesis of Dahllite. The mineral phase of bone. Boca Raton, FL: CRC Press Lewis Publishers, 1994.

Jahn AF. Experimental applications of porous (coralline) hydroxyapatite in middle and mastoid obliteration. *Laryngoscope.* 1992; 102: 289-99.

Jang CH, Cho YB, Bae CS. Evaluation of bioactive glass for mastoid obliteration: a guinea pig model. *In Vivo.* 2007; 21(4):651-5.

John DC. *Bones: structure and mechanics*. 2<sup>a</sup> ed. Princeton: Princeton University Press, 2002. p. 1-26.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p. 101-9.

Karmarkar S, Bhatia S, Saleh E, DeDonato G, Taibah A, Russo A, Sanna M. Cholesteatoma surgery: the individualized technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995; 104: 591-5.

Kayhan FT, Algün Z. A histologic study on the temporal bone of guinea pigs. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2003; 10(2):51-7.

Kirschner RE, Karmacharya J, Ong GBS, Gordon AD, Hunenko OBA, Losee J, Gannon FH, Bartlett SP. Repair of the Immature craniofacial skeleton with a calcium phosphate cement: quantitative assessment of craniofacial growth. *Ann Plast Surg*. 2002; 49(1):33-8.

Kopylov P, Jonsson K, Thorngren KG, Aspenberg P. Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radius fractures. *J Hand Surg. [Br]* 1996; 21:768-71.

Kopylov P, Runnqvist K, Jonsson K, Aspenberg P. Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop Scand*. 1999; 70:1-5.

Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins & Cotran *pathologic bases of disease*, 7<sup>th</sup> ed. Elsevier. 1999.



Kupperman D, Tange RA. Ionomeric cement in the human middle ear cavity: long-term results of 23 cases. *Laryngoscope*. 2001; 111(2):306-9.

Kupperman D, Tange RA. Long-term results of glass ionomer cement, Ionocem, in the middle ear of the rat. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1997; 51(1):27-30.

Kveton JF, Coelho DH. Hydroxyapatite cement in temporal bone surgery: a 10 year experience. *Laryngoscope*. 2004; 114(1):33-7.

Landis WJ, Song MJ, Leith A. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. *J Struct Biol*. 1993; 110:39-54.

Lane JM, Bostrom MP. Bone grafting and new composite biosynthetic graft materials. *Instr Course Lect*. 1998; 47:525-34.

Leatherman BD, Dornhoffer JL, Fan CY, Mukunyadzi P. Demineralized bone matrix as an alternative for mastoid obliteration and posterior canal wall reconstruction: results in an animal model. *Otol Neurotol*. 2001; 22(6):731-6.

Leatherman BD, Dornhoffer JL. Bioactive glass ceramic particles as an alternative for mastoid obliteration: results in an animal model. *Otol Neurotol*. 2002; 23(5):657-60.

Lee WS, Choi JY, Song MH, Son EJ, Jung SH, Kim SH. Mastoid and epitympanic obliteration in canal wall up mastoidectomy for prevention of retraction pocket. *Otol Neurotol*. 2005; 26(6):1107-11.

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (395):81-98. Review.

Lemons JE. Ceramics: past, present, and future. *Bone.* 1996; 19:121S-128S.

Linthicum FH Jr. The fate of mastoid obliteration tissue: a histopathological study. *Laryngoscope.* 2002; 112(10):1777-81.

Losee JE, Karmacharya J, Gannon FH, Slemp AE, Ong, GBS, Hunenko O, Gorden AD, Bartlett SP, Kirschner RE. Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement: interaction with bioresorbable mesh. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(1):117-24.

Lwanga SK, Lemeshow S. *Sample size determination in health studies: a practical manual.* Geneva, World Health Organization, 1991.

Lykins CL, Friedman CD, Ousterhout DK. Polymeric implants in craniomaxillofacial reconstruction. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994; 27:1015-33.

Mahendran S, Yung MW. Mastoid obliteration with hydroxyapatite cement: the Ipswich experience. *Otol Neurotol.* 2004; 25(1):19-21.

Mahoney JL. Tympanoacryloplasty. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1962; 75:519-22.

Mahr MA, Bartley GB, Bite U, Clay RP, Kasperbauer JL, Holmes JM. Norian Craniofacial Repair System Bone Cement for the Repair of Craniofacial Skeletal Defects. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 16(5):393-8.

McDowell MP, Kuhn JJ, Strasnick B. Incudostapedial joint reconstruction using dahllite bone cement in a chinchilla model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133(2) Supplement 1:P83-P84.

McElveen JT Jr, Hulka GF. Reversible canal wall down tympanomastoidectomy. An alternative to intact canal wall and canal wall down mastoidectomy procedures. *Am J Otol.* 1998; 19(4):415-9.

Mercke U. The cholesteatomatous ear one year after surgery with obliteration technique. *Am J Otol.* 1987; 8(6):534-6.

Minoda R, Hayashida M, Masuda M, Yumoto E. Preliminary experience with beta-tricalcium phosphate for use in mastoid cavity obliteration after mastoidectomy. *Otol Neurotol.* 2007; 28(8):1018-21.

Mundi GR. Bone-resorbing cells: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 3<sup>a</sup>. ed. New York: Lippincott-Ravin, 1996 p. 16-24.

National Research Council. *Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório.* 1<sup>a</sup> ed. Goiânia: National Academy Press; 2003.

Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44(1):31-43.

Palva T. Mastoid obliteration. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1979; 360:152-4.

Poetker DM, Pytynia KB, Meyer GA, Wackym PA. Complication rate of transtemporal hydroxyapatite cement cranioplasties: a case series review of 76 cranioplasties. *Otol Neurotol*. 2004; 25(4):604-9.

Puzas JE. Osteoblast cell biology - linkage and functions. In: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 3<sup>a</sup>. ed. New York: Lippincott-Ravin, 1996. p. 11-5.

Ramsey MJ, Merchant SN, McKenna MJ. Postauricular periosteal-pericranial flap for mastoid obliteration and canal wall down tympanomastoidectomy. *Otol Neurotol*. 2004; 25(6):873-8.

Renard JL, Felten D, Bequet D. Post-otoneurosurgery aluminium encephalopathy. *Lancet*. 1994; 344: 63-4.

Reusche E, Rohwer J, Forth W, Helms J, Geyer G. Ionomeric cement and aluminium encephalopathy. *Lancet* 1995; 345(8965):1633-4.

Roden D, Honrubia V, Wiet R. Outcome of residual cholesteatoma and hearing in mastoid surgery. *J Otolaryngol*. 1996; 25: 178-81.

Rosenblut B, Ahlvin RC, Carr CD, Senturia BH. Silicone implants in the mastoid portion of the temporal bone. *Ann Rhinol Laryngo*. 1966; 75: 889-902.

Sanna M, Zini C, Scandellari R, Jemmi G. Residual and recurrent cholesteatoma in closed tympanoplasty. *Am J Otol*. 1984; 5(4):277-82.

Saunders JE, Shoemaker DL, McElveen JT Jr. Reconstruction of the radical mastoid. *Am J Otol.* 1992; 13(5):465-9.

Shea JJ, Malenbaun BT, Moretz WH. Reconstruction of the posterior wall with proplast. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1984; 92:329-3.

Syms MJ, Luxford WM. Management of cholesteatoma: status of the canal wall. *Laryngoscope.* 2003; 113(3):443-8.

Takahashi S, Nakano Y. A morphological study on obliteration of the temporal dorsal bullae using hydroxyapatite granules. *Am J Otol.* 1996; 17(2):197-9.

Tañag MA, Yano K, Hosokawa K. Orbital floor reconstruction using calcium phosphate cement paste: an animal study. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(7):1826-31.

Termine JD, Robey PG. *Bone matrix proteins and the mineralization process.* In: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 3 ed. New York: Lippincott-Ravin Publishers, 1996. p.24-8.

Urist MR, Lietze A, Dawson E: Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* 1984; 187:277-80.

Williams DF (Ed.). *Concise encyclopedia of medical and dental materials.* Oxford, UK: Pergamon Press; 1991.

Wysocki J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hear Res.* 2005; 199(1-2):103-10.

Yung MW. The use of hydroxyapatite granules in mastoid obliteration. *Clin Otolaryngol.* 1996; 21: 408-84.