

**ADRIANA HACHIYA**

**Estudo histológico do tecido conjuntivo areolar  
perifascial implantado em pregas vocais de coelhos**

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. Domingos Hiroshi Tsuji

São Paulo  
2009

**ADRIANA HACHIYA**

**Estudo histológico do tecido conjuntivo areolar  
perifascial implantado em pregas vocais de coelhos**

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. Domingos Hiroshi Tsuji

São Paulo  
2009

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

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

©Reprodução autorizada pelo autor

Hachiya, Adriana

Estudo histológico do tecido conjuntivo areolar perifascial implantado em pregas vocais de coelhos / Adriana Hachiya -- São Paulo, 2009.

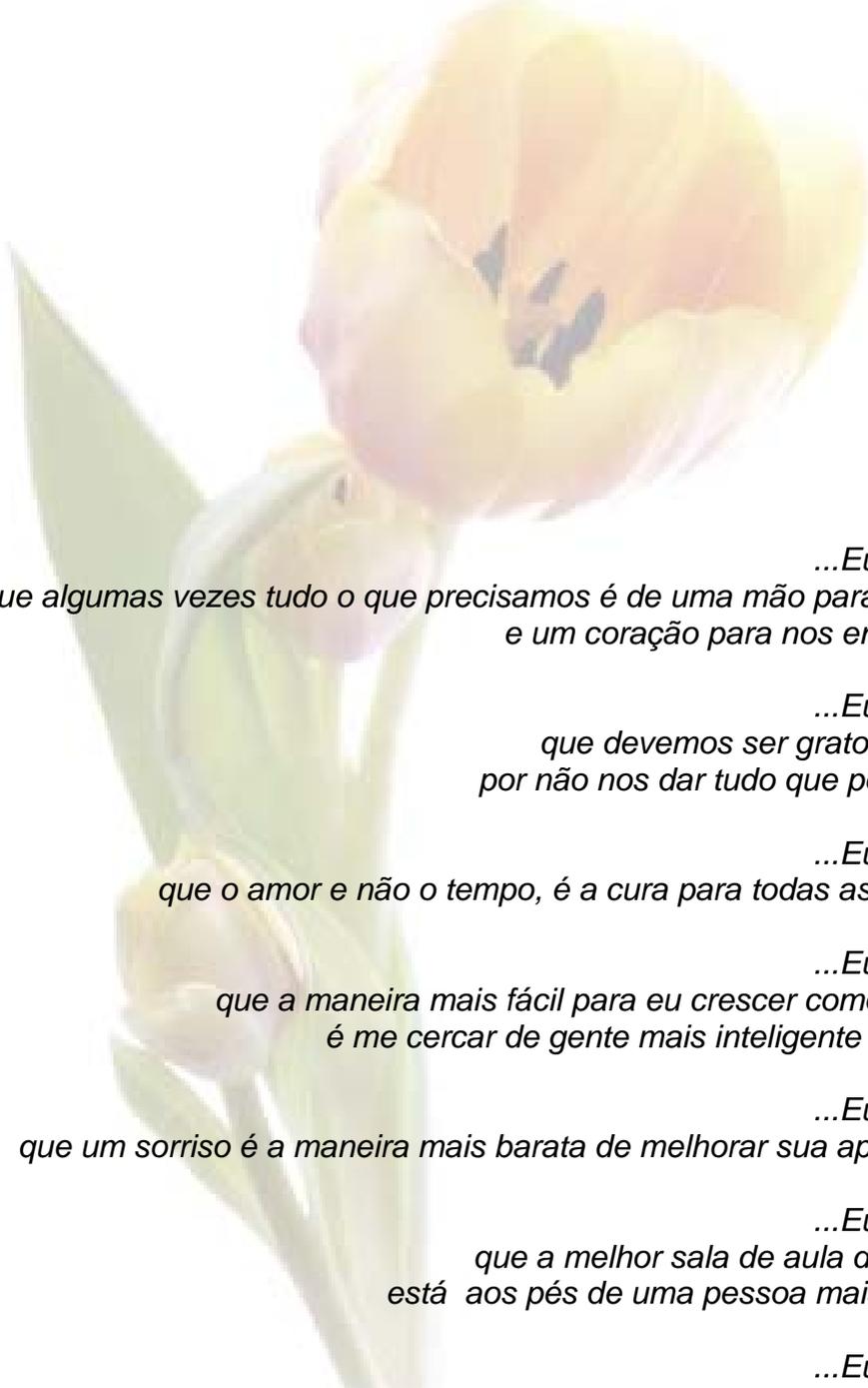
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Domingos Hiroshi Tsuji.

Descritores: 1.Cordas vocais 2.Transplante autólogo 3.Colágeno 4.Cicatriz  
5.Histologia 6.Modelos animais

USP/FM/SBD-320/09



*...Eu aprendi  
que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar  
e um coração para nos entender...*

*...Eu aprendi  
que devemos ser gratos a Deus  
por não nos dar tudo que pedimos...*

*...Eu aprendi  
que o amor e não o tempo, é a cura para todas as feridas..*

*...Eu aprendi  
que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa  
é me cercar de gente mais inteligente que eu...*

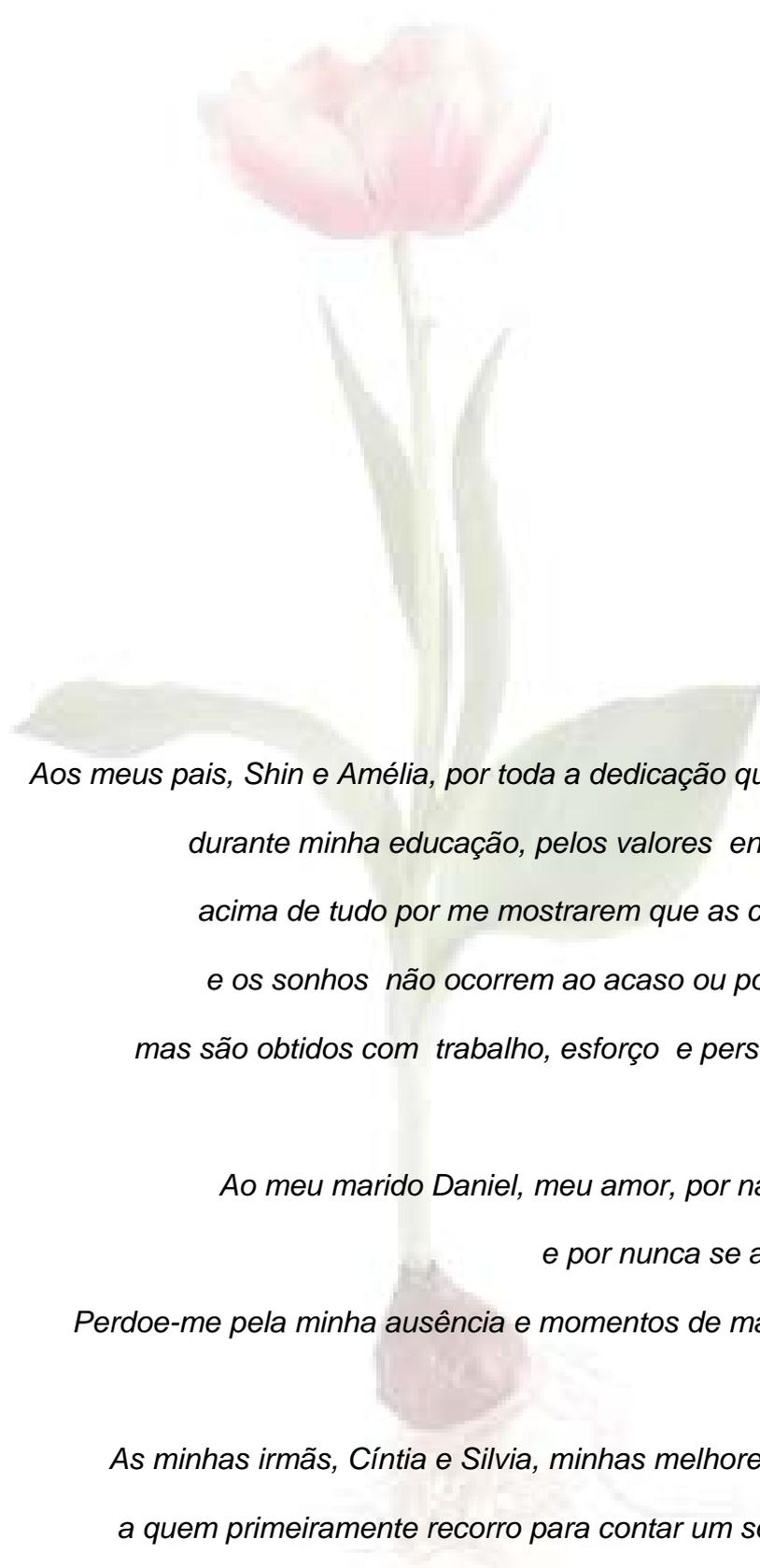
*...Eu aprendi  
que um sorriso é a maneira mais barata de melhorar sua aparência..*

*...Eu aprendi  
que a melhor sala de aula do mundo  
está aos pés de uma pessoa mais velha...*

*...Eu aprendi  
que todos querem viver no topo da montanha,  
mas toda felicidade e crescimento  
ocorre quando você está escalando-a...*

*...Eu aprendi  
que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer...*

**(Trechos do texto "I have learned", atribuído a William Shakespeare)**



*Aos meus pais, Shin e Amélia, por toda a dedicação que tiveram durante minha educação, pelos valores ensinados e acima de tudo por me mostrarem que as conquistas e os sonhos não ocorrem ao acaso ou por destino, mas são obtidos com trabalho, esforço e perseverança.*

*Ao meu marido Daniel, meu amor, por não desistir e por nunca se acomodar.  
Perdoe-me pela minha ausência e momentos de mau-humor.*

*As minhas irmãs, Cíntia e Silvia, minhas melhores amigas, a quem primeiramente recorro para contar um segredo ou compartilhar alegrias e tristezas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji, por me aceitar no Programa de Pós-Graduação como sua aluna. Agradeço imensamente por tudo que tem feito por mim, por sua orientação e pelas oportunidades proporcionadas, mas principalmente por seus conselhos e por seu ombro amigo em todos os momentos que precisei. Você é um grande mestre e amigo.

Ao Prof. Luis Ubirajara Sennes, um professor e uma pessoa brilhante, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Sua ética sempre permeará minhas decisões.

Ao Dr. Rui Imamura por contribuir para realização deste trabalho. Sua inteligência e generosidade em ajudar todos os residentes e pós-graduandos são admiráveis. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento por seu entusiasmo e capacidade de liderança invejáveis, que impulsionam nossa clínica e movem nossa especialidade.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan, que é meu guru, um poço de sabedoria e humildade. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos amigos.

Aos Prof(s). Dr. Richard Voegels, Dr. Edigar Rezende de Almeida, Dr. Ivan Dieb Mizziara, Dr. Rubens Vouno Neto que são referências em suas áreas e que me ensinaram muito ao longo da residência e pós-graduação.

À Prof(a). Tanit Ganz Sanchez e Fga. Elizabete Pedalini cuja empolgação e dedicação me levaram a escolha da otorrinolaringologia como especialidade médica.

Ao Prof. Dr. Samir Cahali e Dr. Florisval Meinão pela perseverança e pela oportunidade em trabalhar no Hospital do Servidor do Estado de São Paulo.

Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas por me ensinar tudo que sei sobre histologia e por sua disponibilidade em me ajudar tão prontamente em todos os momentos que precisei.

À minha amiga e irmã Dra. Luciana Miwa Nita com quem percorri lado a lado todos os anos de residência, pós-graduação e trabalhos profissionais. Sinto por você estar tão longe e por termos, agora, que seguir caminhos diferentes.

À minha amiga Dra. Saramira Bohadana cujo entusiasmo é uma fonte inesgotável de energia e que me motiva cada dia.

Ao meu amigo Dr. Flávio Sakae, meu companheiro de residência e de preceptoria. Nunca conheci alguém tão sincero e centrado como você e te invejo por isso.

Ao meu amigo Dr. Fabio de Rezende Pinna por ser um amigo leal e sempre disposto em ajudar a todos.

Aos amigos Dr. Milton Takeuti, Dra. Lucinda Simoceli, Dr. Ítalo Medeiros, Dra. Patrícia Santoro, Dr. Gilberto Takahashi, Dr. Elder Goto, Fga. Rosiane Yamazaki, Fga. Elaine Shizue Novalo, Fga Juliana Sznifer, Márcia Nakanishi, Roserlei Martins Alves, pela convivência, amizade e por tudo que aprendo com vocês. Tenho a honra de trabalhar com pessoas adoráveis, competentes e sempre dispostas a me ajudar.

Aos meus amigos Christian Wiikmann, Flávio Prado, Clarissa Komatsu, Felipe Fortes, Fernando Sasaki, Ali Mahmoud, Gustavo Passerotti, Raquel Tavares, Daniel Chung, Márcia Menezes, Gislaine Ferro Cordeiro, Gabriela Cunha, Rogério Bühler, pelos momentos que compartilhamos juntos nesse interminável e constante processo de formação.

Ao Dr. Ronaldo Frizzarini, pelo seu exemplo de luta e coragem.  
Orgulho-me tanto de ser sua amiga.

Aos funcionários da Disciplina de Otorrinolaringologia Márcia, Luci, Kátia, Marileide, Claudeci e Jorge, pelo carinho que sempre me trataram.

Aos meus queridos amigos de internato, Jerusa Smid, Juliana Folloni, Karen Uemura, Carlos Sakai, Alexandre Pereira de Oliveira, Fabio Ajimura, Alexandre Fabris e João França Lopes e Alex Maia (*in memoriam*).

Aos funcionários do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP Clovis, Donizete e Cláudio, e ao Dr. Eduardo Pompeu, médico veterinário, pela ajuda e prontidão em me ajudar durante a etapa experimental deste trabalho.

Ao Dr. Michel Cahali por sua contribuição e valiosos conselhos durante meu exame de qualificação.

À Profa. Elizabeth de Araújo Otelac por sua generosidade e disposição em me ajudar na correção dos erros de português deste trabalho.

Ao meu tio Sergio Takashi Fujinaka (*in memoriam*) que mesmo com poucas palavras sempre comemorou de perto minhas conquistas, como um pai. Tenho certeza que ficaria orgulhoso de mim.

A todos os mesmos amigos que de uma forma ou de outra me ajudaram nesse projeto. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>Normas para publicação do Annals of Otology, Rhinology and Laryngology</b> .....	xii
<b>Artigo submetido</b> .....	xv
<b>Lista de figuras e quadros</b> .....	xli
<b>Lista de tabelas</b> .....	xlvii
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	xlviii
<b>Lista de símbolos</b> .....	xlix
<b>Resumo</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	lii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	60
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	62
3.1 Histologia da prega vocal humana e da prega vocal de coelhos	63
3.2 Anatomia e Histologia da fáscia muscular .....	66
3.3 Sulco vocal e Fibrose cicatricial .....	68
3.4 Cicatrização .....	71
3.5 Tratamento da rigidez de prega vocal .....	75
3.6 Histomorfometria do colágeno pelo método de Picrossírius- polarização .....	86
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	88
4.1 Procedimento pré-operatório .....	91
4.2 Anestesia .....	91
4.3 Procedimento cirúrgico .....	92
4.3.1 Obtenção do enxerto .....	92
4.3.2 Laringofissura e inserção do enxerto .....	94
4.4 Procedimento pós-operatório .....	97
4.5 Eutanásia dos animais e isolamento da laringe .....	98

4.6 Análise histológica .....	100
4.6.1 Técnica da hematoxilina-eosina e avaliação do processo inflamatório .....	101
4.6.2 Histomorfometria do colágeno .....	102
4.7 Análise estatística .....	111
<b>5 RESULTADOS</b> .....	113
5.1 Características dos animais .....	114
5.2 Distribuição das fibras de colágeno do enxerto e quantificação por morformetria .....	114
5.3 Avaliação do processo inflamatório .....	128
5.4 Comparação da deposição de colágeno entre o grupo enxertado e o grupo controle .....	134
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	138
6.1 Delineamento do estudo e metodologia .....	139
6.2 Alterações histológicas no enxerto .....	146
6.3 Processo inflamatório .....	149
6.4 Fibras colágenas peri-enxerto e na prega vocal controle .....	151
6.5 Perspectivas .....	154
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	156
<b>ANEXOS</b> .....	158
ANEXO A - Resultados da aplicação do <i>Teste de Kolmogorov- Smirnov</i> , para verificação da normalidade das variáveis paramétricas .....	159
ANEXO B - Distribuição dos animais do estudo de acordo com a massa corporal, grupo alocado e complicações pós- operatórias .....	160
ANEXO C - Avaliação semiquantitativa do processo inflamatório .....	161
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	162
<b>APÊNDICE</b>	

## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

### “ANNALS OF OTOTOLOGY, RHINOLOGY AND LARYNGOLOGY”



#### SUBMISSION

Send manuscripts to Richard J. H. Smith, MD, Editor, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, The University of Iowa Hospitals and Clinics, 200 Hawkins Dr, Iowa City, IA 52242. Original manuscripts dealing with clinical or scientific aspects of otolaryngology, bronchoesophagology, head and neck medicine and surgery, maxillofacial and plastic surgery, audiology, speech pathology, or related specialties are considered for publication. All materials submitted for publication undergo peer review. Submit 3 complete copies (including figures) and an electronic version with a signed copyright transfer statement (see “Copyright,” below). Include an e-mail address for notification of receipt of manuscript.

All submitted manuscripts *must* be accompanied by a cover letter. This letter should disclose any financial interests the authors have in relation to the work, or any financial support provided by companies toward the completion of the work. The letter should also indicate whether the manuscript has been presented before any professional otolaryngological association and the place and year of presentation. *Manuscripts submitted without this letter will not be reviewed and will be returned to the author.*

Written permission from both senior author and publisher must be provided to the *Annals* in order to republish tables or illustrations copyrighted elsewhere. Submit this permission with the manuscript.

Papers are scheduled for publication in chronological order of acceptance, but manuscripts received in improper form require longer production time. Manuscripts are edited in accordance with the *AMA Manual of Style*, 10th edition (2007), and with the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals : Writing and Editing for Biomedical Publication* (updated Oct 2007; <http://www.icmje.org>). Manuscripts not accepted for publication are not returned.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

Limit papers to a size that will make up to no more than six printed pages, figuring three double-spaced typewritten pages of text to one journal page; see the journal for estimating space required for references, illustrations, and tables. If a manuscript of greater length is accepted for publication by the Editor, all journal pages over six are charged to the author at the publisher’s cost of \$175 per page. Submit an original and two copies of the manuscript on white bond paper with margins of at least 25 mm (1 inch), double-spaced throughout, including abstract, references, tables, and legends. Use a type size no smaller than 10 points, preferably 12. Begin each component on a new page in the following sequence: title page, abstract, text, acknowledgments, references, tables, and figure legends. Number pages consecutively in the upper rightcorner, beginning with the title page. Avoid the use of tables.

The author is responsible for all statements in the paper, as approved on the copyedited galley proofs. Alterations made by the author after the paper has been typeset are charged to the author.

Use standard abbreviations given in the *Uniform Requirements*. Express all measurements in metric terms; if original measurements were made in another system, include these parenthetically. Plot audiograms according to ISO standards. Use generic names whenever possible.

*Title page* must include 1) a concise but informative title, worded to facilitate indexing; 2) an abbreviated form of the title to be used as a running head; 3) authors' full names (inclusion of more than five authors requires written explanation to the Editor at time of submission ) and no more than two academic degrees per author; 4) department(s) and institution(s) to which the work is attributed, with authors' present affiliations and addresses, if different, separately noted; 5) statement of grant or other support; 6) name and address of author to whom reprint requests should be sent; and 7) name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of corresponding author. Manuscripts that report animal research performed in the United States must carry the following statement on the title page: "This study was performed in accordance with the PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, and the Animal Welfare Act (7 U.S.C. et seq.); the animal use protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of \_\_\_\_\_ University (or institution)."

*Abstracts* must be less than 200 words and structured to include objectives, methods, results, and conclusions.

*Key Words*, chosen as far as possible from the National Library of Medicine medical subject headings, are listed after the abstract. A maximum of 6 are permitted.

*References*, double-spaced, are numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. Primary references should be used whenever possible. The author is charged \$2.00 for each reference over 30. Use the style of references given in the *Uniform Requirements* or a current issue of the *Annals*. Include the names of all authors and the inclusive page numbers of an article. If a manuscript accepted but not yet published is included in the reference list, give the accepting journal's name, followed by "in press." Manuscripts still in review or not yet accepted formally should be cited within the text as "unpublished observations." A reference to a personal communication is also placed in the text, accompanied by a date (year). Papers presented at scholarly meetings but not published are considered "unpublished observations." Papers published only in abstract form are listed as references with "[Abstract]" after the title.

*Tables* should be on separate sheets, numbered consecutively and headed by a concise title. Put explanatory matter in footnotes. Tables are adjuncts to the text and should not repeat material presented therein. *The cost of preparing tables is billed to the author.* *Illustrations* must be submitted in three complete sets, unmounted. Only professional-quality glossy photographs and black-and-white line drawings are acceptable. Multi-part illustrations should be labeled (A, B, etc) on the reverse side, not on the illustration itself. Put legends (detailed explanations) to the photographs on a separate page in the manuscript. Affix a label to the reverse side of each illustration, indicating figure number, first author's name, and top of the figure. Cite each figure in the text in consecutive order. Written permission from identifiable subjects is required. *The cost of preparing illustrations for publication (scanning if necessary, sizing, lettering, etc) is charged to the author without exception.* Color illustrations are accepted; cost estimates for color separations and printing are provided on an individual basis. Illustrations should enhance, not repeat, material presented in the manuscript and should be kept to a minimum.

## **ELECTRONIC SUBMISSION**

*Software and format* must be Microsoft Word. Do not use complex formatting or desktop publishing software. Do not deliver files that contain hidden text. For example, do not use

your word processor's automated features to create footnotes and reference lists. Submit text, tables, and figure legends as a single file. Do not include illustrations in this file.

*Illustrations* should be in TIFF, EPS, JPEG, or PSD formats. Do not submit illustrations in Powerpoint. Do not submit native application formats. Journal quality reproduction will require grayscale and color files at resolutions of at least 300 dpi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions of at least 600 dpi. (These resolutions refer to the output size of the file.)

Send files to: [annals-ori@uiowa.edu](mailto:annals-ori@uiowa.edu)

## REPRINTS

Rates are quoted when galley proofs are sent to the author. Orders are signed by the author and returned with the proofs.

## COPYRIGHT

The following statements *must* accompany the manuscript, signed by all authors (only *original* signatures are acceptable: 1) "I warrant that my contribution to the work is original and that I have full power to enter into this agreement. The content of this paper, all or in part, has not been published, has not been submitted for publication elsewhere, and is not in press elsewhere." 2) "I verify that I have met all of the following criteria for authorship and am qualified to be listed as an author of this work by my substantive contribution to the conception and design of the project *or* analysis of the data, my drafting *or* critical revision of the content of this manuscript, and my approval of the final version to be published." 3) "In consideration of the *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* taking action in reviewing and editing my (our) submission, I hereby transfer, assign, or otherwise convey all copyright ownership to Annals Publishing Company in the event such work is published in the *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*." After acceptance, no author may be added to or removed from a paper.

## SUPPLEMENTS

A manuscript too long for inclusion in the *Annals* (over 12 typeset pages) may be published as a supplement if approved by the Editor. All costs are borne by the author, and estimates are provided upon request. Supplements have the advantages of separate identification and rapid publication, but undergo the same peer review as journal articles.

## REVIEWS OF SOFTWARE AND COMPUTER APPLICATIONS

Programs submitted for review must be compatible with one of the following operating systems: Windows 2000 and above; or Macintosh OS 9.0 and above. The author must specify hardware and system requirements. Submit the software on CD. If the program is a template, submit also a runtime version of the source program. Software considered for review includes educational software, artificial intelligence software to aid in the diagnosis of otolaryngic disorders, software for logging operations, software to aid in research, and software that addresses specific problems in otolaryngology. Also, manuscripts reviewing software and computer applications relating directly to otolaryngology are considered for publication.

February 2008.

**Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit vocal folds: an experimental study**

This work was supported by CNPQ (Brazilian National Research Council) and HC- FMUSP

From the Department of Otolaryngology (Adriana Hachiya, MD; Rui Imamura, MD; Luiz Ubirajara Sennes, MD, PhD; Domingos Hiroshi Tsuji, MD, PhD) and Department of Pathology (Edwin Roger Parra Cuentas, MD), The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil)

Presented at XIX World Congress of Oto-rhino-laryngology, São Paulo, Brazil, June 2, 2009.

Send correspondence to Adriana Hachiya, Rua Doutor Barachisio Lisboa, 88; 05441-090, São Paulo, SP, Brasil. E-mail:adrihachiya@uol.com.br

**Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit  
vocal folds: an experimental study**

This animal use protocol was approved by the guidelines of the National Institutes of Health, after the Institutional Review Board Approval for Animal Experiments.

## **ABSTRACT**

**Objective:** The purpose of this study is to examine the histological changes in the graft as well as in the host tissue after placing a strip of PAT into the rabbit vocal fold.

**Study Design:** Experimental study.

**Methods:** The grafts were implanted in pockets that were surgically created in the right vocal fold. The left vocal fold was used as the control. Thirty animals were divided into three groups for evaluations at 15 days, and 3 and 6 months, and their larynx tissues were subsequently reviewed by histology.

**Results:** The grafts were characterized by disorganized and thick collagen bundles that were seen at 15 days after the operation. There was an acute inflammatory response induced by the graft at 15 days. This did not exist in the specimens taken at 3 and 6 months. Active remodeling of collagen fibers was observed, starting at 15 days after the operation, and was more intense in the experimental group compared to that in the control group.

**Conclusion:** Our findings indicated that the PAT is an effective material for volumetric augmentation of scarred vocal fold. However the loss of its original histoarchitectural characteristics suggests it is not an ideal material for Reinke's Space replacement.

**Key words:** *vocal fold, scar, collagen, graft, histology, animal model*

## INTRODUCTION

Vocal fold stiffness may be caused by either scar tissue or associated minor structural alterations that are mainly represented by deep sulcus vocalis<sup>1</sup>. The two conditions share the characteristics of refractory dysphonia, glottal insufficiency and difficulty of repair. The most problematic issue is the histological changes that are primarily responsible for altering the viscoelasticity of the vocal fold mucosa. In both cases, there is a loss of extracellular matrix components in the superficial layer of the lamina propria (Reinke's space). The matrix components are replaced by a layer of fibrotic tissue that makes the epithelium adhere to the vocal ligament and to the thyroarytenoid muscle<sup>2</sup>. Such deviations interfere with the vibration of the vocal folds, impede mucosal wave propagation and cause air leakage during phonation<sup>3</sup>.

The main goals to achieve for patients with vocal fold scarring are better vocal fold closure and functional recovery of the trilaminar structure<sup>4</sup>. Many different materials are used in order to restore the viscoelastic properties of the lamina propria. These include fat<sup>5,6</sup>, fascia<sup>7,8</sup>, collagen<sup>9,10</sup> and hyaluronic acid<sup>11</sup>. However, each substance has individual properties that limit its use. For instance, using bovine collagen requires the patient to undergo a prior allergy test, which can often postpone the procedure<sup>12</sup>. Moreover, several of the main problems faced in using this form of augmentation include the unpredictable course that collagen reabsorption takes as well as the fibrosis that can be induced by collagen in the host tissue<sup>2,11,13</sup>.

In recent years, the perifascial areolar tissue (PAT), which can be found alongside fascias, muscles or periosts, has become a new alternative for treating stiffness associated with vocal cord fibrosis. In fact, several promising results have been found in our own practice (data not published) as well as by other authors<sup>15</sup>.

In the field of plastic surgery, the PAT has been used in burn injuries to minimize cicatricial adhesion between the skin and the musculature. This corrects volumetric abnormality that can be caused by tecidual loss and thus enables gliding of the skin and subcutaneous cellular tissues on deeper structures<sup>16,17</sup>.

Compared to the other autografts commonly used for vocal fold augmentation, PAT appears to have dynamic viscoelasticity properties that are more similar to those found in the vocal folds. Therefore, it may be an ideal material for implantation into the Reinke's space<sup>18</sup>.

However, there has been no data in the literature that assess histological changes taking place in the PAT graft or host tissue after implantation of the tissue in the vocal fold. Thus, the purpose of our study was to assess the progression of histoarchitectural changes produced by the graft and the surrounding tissues after inserting this material into rabbit vocal folds.

## **MATERIALS AND METHODS**

The experiments were carried out according to the guidelines of the National Institutes of Health, after the Institutional Review Board Approval for

Animal Experiments (Research Protocol No.1017/05).

### ***Experimental Design***

Thirty male New Zealand White rabbits (body weight 2.8 to 3.8 kg) were used in the experiment.

The animals were sedated with a combination of xylazin hydrochloride (1 mg/Kg) and ketamine hydrochloride (5 mg/Kg) that was given via intramuscular injection. The animals were then maintained under a state of anesthesia with spontaneous ventilation. A piece of the PAT measuring 10 mm in diameter was harvested from the right leg. The graft consisted of a thin and pliable gliding tissue that covered the fascia lata. Histologically, the perifascial tissue was characterized as a loose areolar tissue that showed a delicate network of thin collagen fibers with few fat islands and blood vessels.

The donor site was closed with a 4.0 nylon suture. The PAT pad was preserved in saline gauze for later implantation. The vocal fold was accessed via an anterior laryngeal fissure. A submucosal pocket was created with a Holleback 3s instrument by making a 0.3 cm long incision on the superior surface of the right true vocal fold. The incision was expanded by blunt and sharp dissections to create a submucosal pocket along the medial edge of the vocal fold. The autogenous PAT pad, which measured 2 mm in diameter, was placed into the submucosal pocket with cup forceps. The mucosal flap was then placed into position. The graft was kept in place solely by the difference in size between the small incision and the PAT block. The left vocal fold, which served as an internal control, underwent the exact same procedure except for the implantation of the graft.

The rabbits were randomized into groups of 10 animals and were euthanized 15 days (Group 1), 3 months (Group 2) and 6 months (Group 3) after the procedure. The larynx tissues were then harvested for pathological inspection.

The larynx was fixed in 10% formalin, dehydrated and processed for histology. It was mounted and cut in the mid-region of the membranous portion of the vocal fold in a coronal direction. Sections were made in 5- $\mu$ m increments. Histological sections were obtained at the same level for both control (left) and implanted (right) vocal folds through the membranous vocal folds.

Histological sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and with Picrosirius-red. The Sirius red molecules of this stain bind to collagen in an oriented fashion such that collagen birefringence is enhanced several times<sup>19</sup>.

### ***Histomorphometric Study***

Collagen fibers in the vocal folds and tissue grafts were quantified by optical density using an image analysis system. The system consisted of an Olympus DX5 camera that was coupled to an Olympus microscope, and from which the images were sent to a monitor (LG, Miami, USA). By using a digitizing system (Oculus TCX, Coreco inc; St Laurent, Quebec, Canada) loaded on a computer (1330 Mhz Pentium), the images were processed on a Image Pro-Plus 6.0 software (Media Cybernetic Inc., Bethesda, Maryland, USA). Ten fields per case for the vocal folds, and all area in the tissue graft were analyzed at x400 magnification. The thresholds for all types of collagen

fibers [orange (thick) and greenish-yellow (thin) fibers] were established for each slide after the contrast was optimized to allow easy identification of the fibers. The results were expressed as the percentage of the vocal or graft area occupied by the collagenous fibers.

Semi-quantitative analysis was used to establish the intensity of the inflammatory process, and this was categorized into four different groups: (i) absent (ii) mild (less than 25% of inflammatory cells) (iii) moderate (25-50% of inflammatory cells) and (iv) intense (more than 50% of inflammatory cells).

### ***Statistical analysis***

Results obtained from the quantification of the collagen fibers were considered as parametric variables with normal distribution after using the Kolmogórov-Smírnov Test. The degree of inflammatory process was characterized as an ordinal categorical variable.

Comparisons among several groups were made with Analysis of Variance, which was controlled by the Levene Test of homogeneity of variance with a factor for numerical variables. This analysis was further complemented by the Bonferroni Test when the variances were homogeneous, and by the Dunnet Test when the variances were not homogeneous. Categorical variables were analyzed by using the Chi-square Test.

In order to compare the parametric variables between the right and left vocal folds, we used the Student's T-test. Finally, the Chi-square Test was used for the nonparametric variables.

The confidence interval used was 95%, and P-value <0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

From the initial sample of thirty animals, four died from diarrhea and cervical infection before completion of the examination period. Thus, the final study consisted of 26 animals distributed into three different groups: Group I (n=8), Group II (n=9) and Group III (n=9)

### ***Histological Findings***

Figures 1 to 4 illustrate the histological changes observed in the graft and in the surrounding tissue of the vocal fold among the different groups.

Fifteen days after the surgical procedure, Group I presented with important histological changes in the graft that were characterized by an increase in birefringence of collagen fibers, moderate decrease in vascularization and slight increase in inflammatory infiltrate with a predominance of neutrophils (Figure 1). In the tissue surrounding the graft, an important inflammatory process was observed with a predominance of neutrophils in the mucosal layer in the graft inlet area and in the surgical incision site in the control vocal fold. This process reached some of the lamina propria regions surrounding the graft. Edema and foreign body-type giant cells were sporadically seen in some animals within this group. Macrophages and lymphocytes were also found in moderate quantities.

The increase in collagen fibers was even more apparent in Groups II (three months) and III (six months). The graft changes in these groups were

characterized by an important hyaline degeneration process (Figure 2). Such histological changes were defined by a color change in the graft to an amorphous and glass-pinkish aspect when seen under H&E stain, as well as by an increase in birefringence of collagen fibers. The birefringence caused the fibers to appear red and orange when observed with the Picrosirius-red filter under polarized light (Figure 3).

As far as the inflammatory process is concerned, there was a decrease in inflammation in Group II as well as a predominance of lymphomononuclear infiltrate in the vocal fold that was mostly limited to the superficial area of the lamina propria in both the experimental and control conditions. The inflammatory infiltrate in the vocal folds in Group III was sparse except for some remainder lymphocytes and macrophages that were diffusely distributed in the lamina propria.

The inner part of the graft did not show inflammatory infiltration for animals in Groups II and III.

### ***Histomorphometric study of the collagen fibers***

The histological changes described above were confirmed by a quantitative analysis of the collagen fibers. The gradual change that occurred in the collagen fibers in the graft is illustrated in Figure 4.

When we statistically assessed the collagen density of the graft in the host vocal fold, we observed that there was not a significant increase in density between the original tissue and Group I ( $p=0.190$ ), and between Groups II and III ( $p=0.964$ ). However, we noticed a significant difference in the total collagen density between the animals in Groups I and II ( $p=0.004$ ).

When the percentage of thin collagen fibers was statistically analyzed among the groups, there was no significant difference between the control group and Group I ( $p=0.997$ ), and between Groups I and II ( $p=0.263$ ). Nevertheless, there was a significant difference between Groups II and III ( $p=0.011$ ). This result was consistent with previous findings that showed clear changes in the fiber patterns, particularly in the grafts of animals six months after the operation.

The collagen density in the area surrounding the graft in the host vocal fold was significantly higher than that in the surgical incision area in the control vocal fold (Table 1). Finally, collagen deposition was stable in both the right and left vocal folds throughout the study period.

### **Semi-quantitative analysis of inflammatory process**

Table 2 shows the semi-quantitative analysis of the inflammatory process. A comparison between the host and control vocal folds did not show any statistically significant difference for any of the studied groups. Nonetheless, when the inflammatory process of each vocal fold was individually assessed on a long-term basis, a significant decrease in the inflammatory process was seen between Groups I and II in both the host ( $p=0.032$ ) and the control vocal folds ( $p=0.035$ ). However, this was not observed between Groups II and III in both the host ( $p=0.261$ ) and control vocal folds ( $p=0.287$ ).

## DISCUSSION

Several materials have been used to treat vocal fold scars. These include fat<sup>5,6</sup>, fascia<sup>7,8</sup>, collagen<sup>9,10</sup> and hyaluronic acid.<sup>11</sup> However, none of them has proved to be successful in restoring the lamina propria and its mucosal pliability during vocal fold vibration.

The PAT has been used as a promising material to treat patients with vocal fold scars due to its clinical efficacy<sup>15</sup> and its viscoelastic properties, which are similar to those of the vocal folds.<sup>18</sup>

In the present study, we described the progressive, histoarchitectural changes that occurred in the graft and in the lamina propria after implanting PAT into the vocal folds of rabbits. We described the changes at 15 days, 3 months and 6 months after surgery.

When we examined the PAT after its implantation into the three studied groups, we identified important histological changes that took place. These included a loss of structural organization of the collagen fibers, a progressive increase of fibers density and changes to the birefringence of the fibers when they were assessed via the picosirius-polarization staining method. The yellow-greenish fibers, which were predominant in the original grafts, had gradually changed to a more orange-reddish color. The changes in fiber patterns further increased the rate of collagen fiber reduction and tissue dehydration. Some authors have attributed the degree of birefringence in the collagen fibers to the diameter of the fibers and their three-dimensional structural organization. Orange-reddish fibers were thought to represent the thick and densely gathered fibers while the yellow-greenish ones represented

the thin, sparsely distributed fibers<sup>19,20</sup>.

When a temporal fascia or fascia lata graft is harvested from its donor site, there is usually a reduction in its size and an increase in thickness.<sup>21</sup> Thus, we were expecting to find increased collagen density in the interior of the graft after its implantation.

An even greater level of compactness of the fibers should have occurred in our experiment since the PAT was composed of organized, pliable fibers with a large component of water and a fundamentally amorphous substance. When we investigated the inflammatory process, we identified changes that were consistent with other experiments that used autologous grafts in the vocal folds<sup>22-24</sup>. In particular, we saw acute inflammatory reactions in the perifascial areolar tissue, which indicated that the harmful stimulus was of short duration and did not persist. Since there was no statistically significant difference between the implanted and the control vocal fold tissues at any period, we assumed that the inflammatory process was caused by the surgical procedure and that the graft did not maintain the inflammatory reaction.

A comparison in collagen concentration between the graft and the surgical scar region in the control group revealed a greater deposition of collagen in the experimental group than the control in all three examined times. However, this increase did not persist over time.

As the inflammatory process did not increase in the experimental group, we deduced that the greater collagen deposition found in the experimental group only indicated that the graft was isolated in the host site

by a collagen capsule, especially as there was no sign of immune rejection.

Even though the viscoelastic assessment was not included in this study, we believed that the collagen increase in the graft and in the surrounding areas should increase the viscoelasticity of the tissue, especially since previous experiments have associated increased density and increased loss of collagen fiber structure with increased viscoelastic properties for the vocal fold<sup>25-27</sup>.

It has been showed that there is a replacement of the Reinke's space by a collagen fiber-rich tissue during the cicatricial fibrosis process<sup>2,28</sup> as there is an increase in viscoelasticity. It is possible that the histoarchitectural changes that took place in the vocal fold and graft resulted in a smaller impact on vocal fold vibration than the presence of fibrous scar tissues in the vocal fold. This would explain the improvement that was reported by other authors<sup>15</sup> and that we saw in our clinical practice (data not published) after PAT was implanted in patients with vocal fold scar and sulcus vocalis.

Moreover, the graft could be filling in the volumetric deficit in the patients' vocal folds, and this may have corrected the glottic closure and reduced the breathiness in the patients' voice.

Another aspect that should be noted is that the cicatricial process in humans must differ in some degree from the experimental animal models used in the present study, because we know that the biomechanical forces that take place during vocal fold vibration affect the protein synthesis of the extracellular matrix<sup>29,30</sup>.

## **CONCLUSION**

We observed that the perifascial areolar tissue exhibited some remarkable characteristics useful in the treatment of vocal fold stiffness. It showed similar histological and viscoelastic properties as those found in the Reinke's space and promoted little inflammatory reaction. Moreover, it was not reabsorbed for at least six months.

However, our findings revealed that there was a loss in its original histoarchitecture characteristics after its implantation into the rabbit vocal folds. Thus, new studies that investigate its viscoelastic properties after implantation into scarred vocal folds of other animal models, or examination of vocal fold vibration in larger species such as dogs and pigs are necessary to determine whether histological changes due to the use of PAT would have a smaller impact than the changes that occur with vocal fold scarring.

## REFERENCES

1. Berninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, Sataloff RT, Spiegel JR, Woo P. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;115(5):474-82.
2. Ford CN, Inagi K, Khidr A et al. Sulcus vocalis: a rational analytical approach to diagnosis and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105:189-200.
3. Hansen JK, Thibeault SL. Current understanding and review of literature: vocal fold scarring. *J Voice* 2006; 20:110-20.
4. King JM, Simpson CB. Modern injection augmentation for glottic insufficiency. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:153-8.
5. Duprat AC, Costa HO, Lancelotti C, Almeida RR, Caron R. Histologic Behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113:636-640.
6. Woo P, Rahbar R, Wang Z. Fat implantation into Reinke's Space: a histologic and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:738-44.
7. Tsunoda K, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold. *Laryngoscope* 2000; 110:680-2.
8. Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope* 1999; 109:504-8.

9. Ford CN, Bless DM, Campbell D. Studies of injectable soluble collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:237-47.
10. Remacle M, Lawson G, Degols JC, et al. Microsurgery of sulcus vergeture with carbon dioxide laser and injectable collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000; 109:141-9.
11. Hertegard S, Dahlqvist A, Goodyer EN, Maurer F. Viscoelastic measurements after vocal fold scarring in rabbits: short term results after hyaluronan injection. *Acta Otolaryngol* 2006; 126:758-763.
12. Takayama E, Ikeda M, Tsuru S, et al. Is injectable collagen truly safe? *J Laryngol Otol* 1992, 106:704-708.
13. Zaretsky LS, Shindo ML, deTar M et al. Autologous fat injection for vocal fold paralysis: long-term histological evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:1-4.
14. Hazleman B, Riley G, Speed C. *Soft tissue rheumatology*. Oxford: Oxford University Press; 2004.
15. Costa JO, Gama ACC, Oliveira JB, Neto AO. Avaliação acústica e perceptiva da voz nos momentos pré e pós-operatório da cirurgia de implante de pré-fáscia do músculo temporal. *Rev CEFAC*. 2008;10:76-83
16. Clodius L. Free grafts of gliding tissue – principles and practice. *Eur J Plast Surg* 2002; 25:123-9.
17. Kouraba S, Sakamoto T, Kimura C, Honda K, Yoshida T, Kumakiri M, Sugihara T. Perifascial areolar tissue (PAT) graft. *ANZ J Surg* 2003; 73(Suppl2):A260.

18. Wiikmann C, da Silva MA, Áreas EPG, Imamura R, Tsuji DH, Sennes LU. A baixa viscosidade dinâmica da camada superficial da fáscia temporal sugere que ela seja um material promissor para implantação em prega vocal. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74(Suppl):35.
19. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis J, Wolman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Hist and Cell Biol* 1989; 93:27-9
20. Hirshberg A; Buchner A, Dayan D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picrosirius red and polarization microscopy. *J Oral Pathol Med* 1996;25:125-7.
21. Indorewala S. Dimensional Stability of the free fascia grafts: an animal experiment. *Laryngoscope* 2002; 112(4): 727-30.
22. Perazzo PS, Coelho FS, Pontes PAL. Estudo experimental sobre a utilização de fáscia cervical autóloga com gordura no espaço de Reinke de minipigs. *ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia* 2007;25:238-42.
23. Lee BJ, Wang SG, Goh EK, Chon KM, Lee CH. Intracordal injection of autologous cartilage in paralyzed canine vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 2004;131:34-43.
24. Duprat AC, Costa HO, Lancelotti C, Almeida RR, Caron R. Histologic Behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113:636-640.
25. Rousseau B, Hirano S, Chan R, Welham N, Thibeault S, Ford C, Bless D. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice* 2004;18:116-24.

26. Rousseau B, Hirano S, Scheidt T, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, Bless DM. Characterization of vocal fold scarring in canine model. *Laryngoscope* 2003;113:620-7.
27. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan W, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002;16:96-104.
28. Sato K, Hirano M. Electron microscopic investigation of sulcus vocalis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998;107:56-60.
29. Parsons M, Kessler E, Laurent GJ, Brown RA, Bishop JE. Mechanical load enhances procollagen processing in dermal fibroblast by regulating levels of procollagen C-proteinase. *Exp Cell Res* 1999; 252:319-31.
30. Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today* 1998;4:64-75.

## TABLES

**TABLE 1.** Mean of 10 fields and Standard Deviation (SD) of the collagen density of the implanted vocal fold (S) and control (C) in the three study groups.

Group	Variable	n	Mean	SD	Significance (p)
I	Mean of 10 fields (S)	8	0.07361	0.01685	< 0.001
	Mean of 10 fields (C)	8	0.02496	0.00816	
II	Mean of 10 fields (S)	9	0.08961	0.02980	0.001
	Mean of 10 fields (C)	9	0.02766	0.01094	
III	Mean of 10 fields (S)	9	0.07178	0.00734	< 0.001
	Mean of 10 fields (C)	9	0.02979	0.01027	

**TABLE 2.** Semi quantitative analysis comparing the inflammatory grade of the implanted vocal fold (S) and control (C) in the three study groups.

INFLAMMATORY GRADE	GROUP I 15 DAYS n=8		GROUP II 3 MONTHS n=9		GROUP III 6 MONTHS n=9	
	S	C	S	C	S	C
i	0 (0%)	0 (0%)	3 (33.3%)	4 (44.4%)	3 (33.3%)	4 (44.4%)
ii	0 (0%)	1 (12.5%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)	5 (55.6%)
iii	3 (37.5%)	4 (50.0%)	2 (22.2%)	2 (22.2%)	0 (0%)	0 (0%)
iv	5 (62.5%)	3 (37.5%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Significance (p) between S and C	0.571		0.645		0.750	

*Chi square non parametric test (Fisher's test)*

## FIGURE LEGENDS

Fig 1. Transversal histological sections of the right vocal fold 15 days after the procedure. The tissues were stained with Picrosirius and observed under polarized light. Note the more densely organized collagen fibers inside the graft (G). (A) Magnification 100x. (B) Close up view. Magnification 200X.

Fig 2. Transversal histological sections of the right vocal fold 3 months after the procedure. The tissues were stained with Picrosirius and observed under conventional light. Note the more densely packed collagen fibers inside the graft (E) and the process of hyaline degeneration. (A) Magnification 100x. (B) Close up view of the graft. Magnification 400X.

Fig 3. Transversal histological sections of the right vocal fold 6 months after the procedure. (A) A panoramic view of the tissue stained with Picrosirius and observed under conventional light shows the graft (E) and the lamina propria. Magnification 100x (B) Close up view of the graft stained with Picrosirius and observed under polarized light. Magnification 400X.

Fig 4. Transversal histological sections of the graft that was stained with Picrosirius and observed under polarized light. The tissues show histological changes in the collagen fibers. (A) The graft before its implantation. (B) The graft 15 days after the procedure. (C) The graft three months after the procedure. (D) The graft six months after the procedure. Magnification 400X.

Figure 1

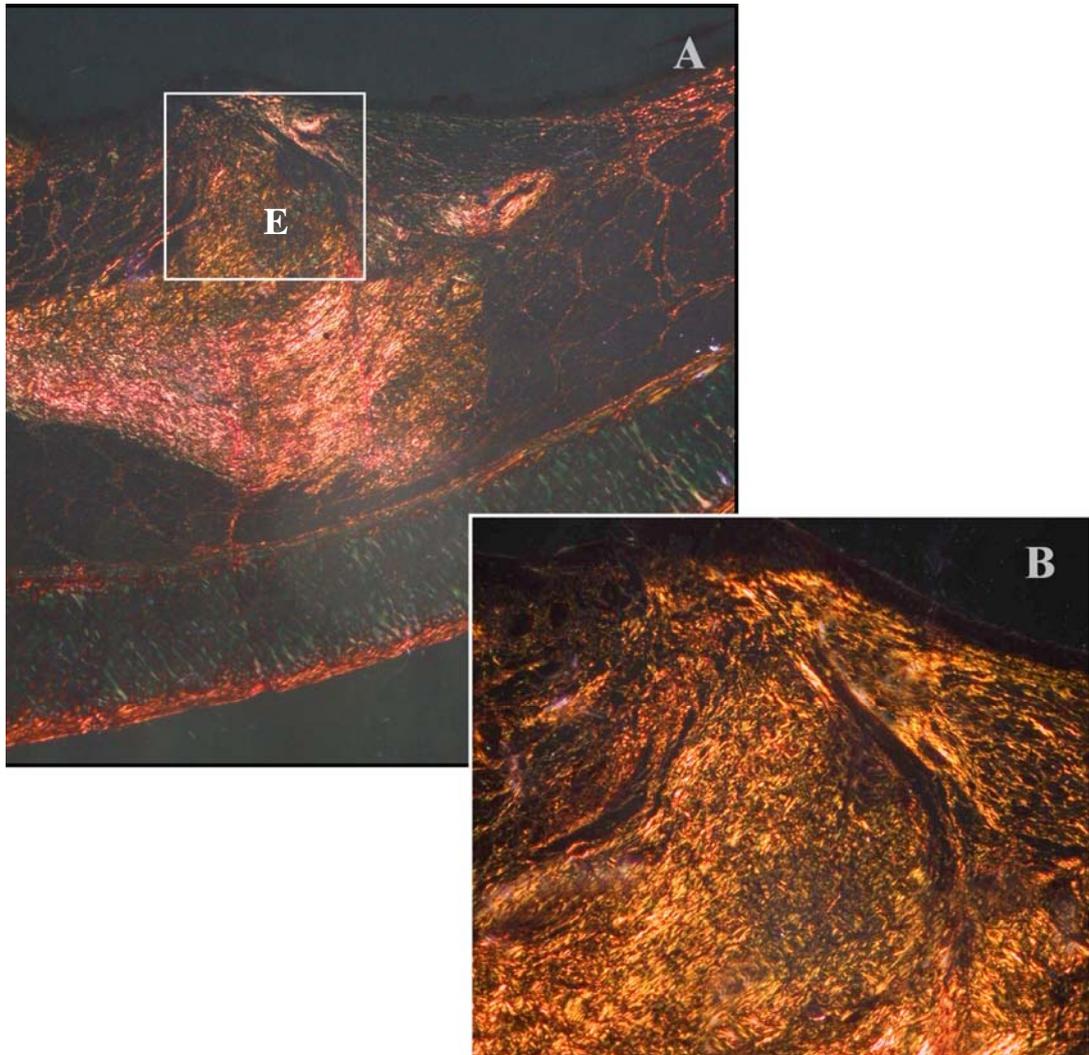


Figure 2

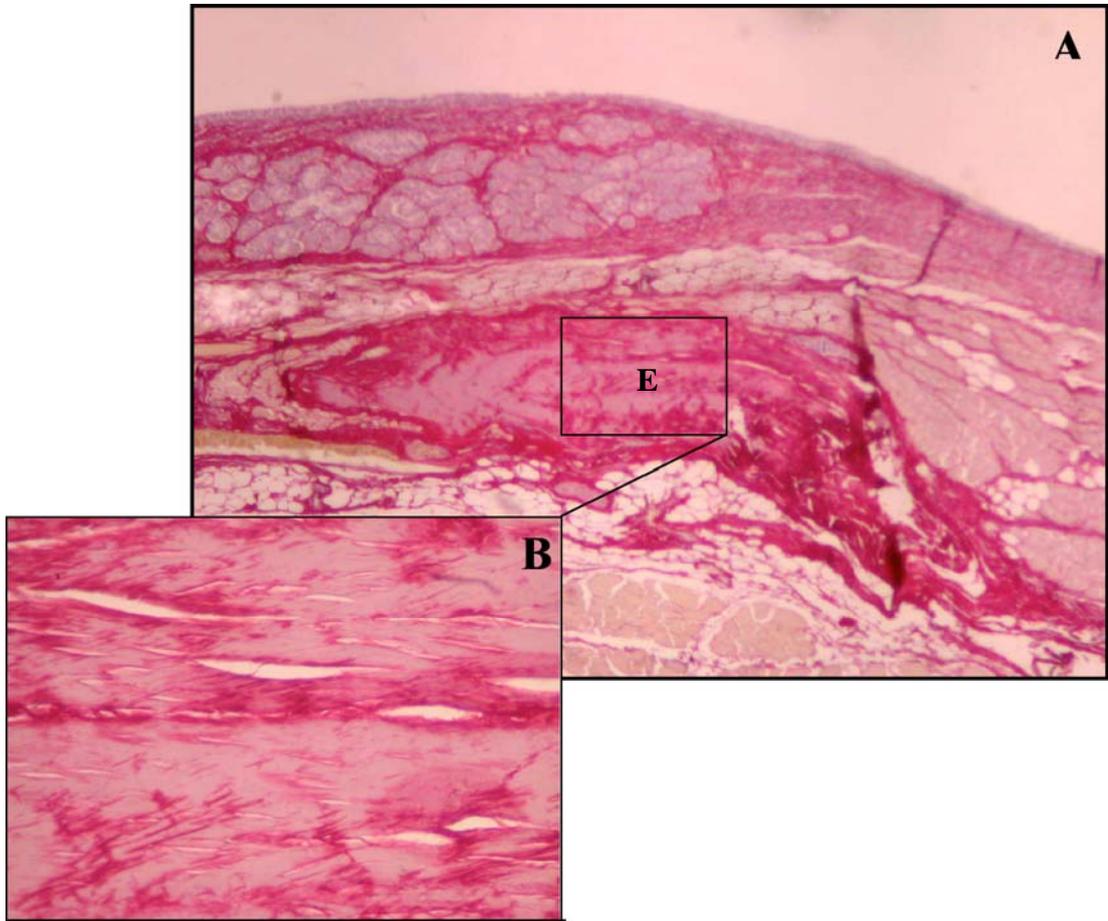


Figure 3

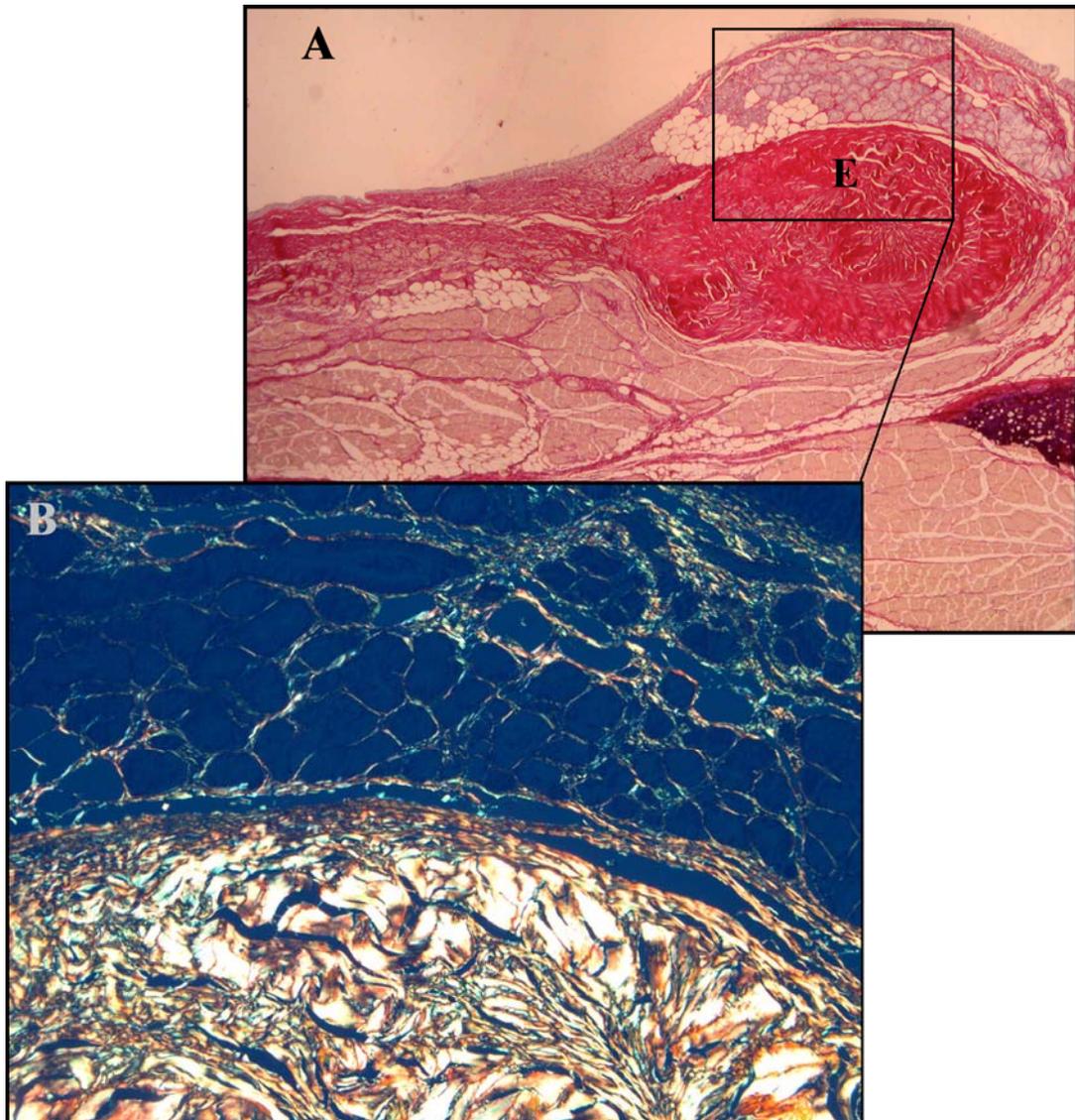
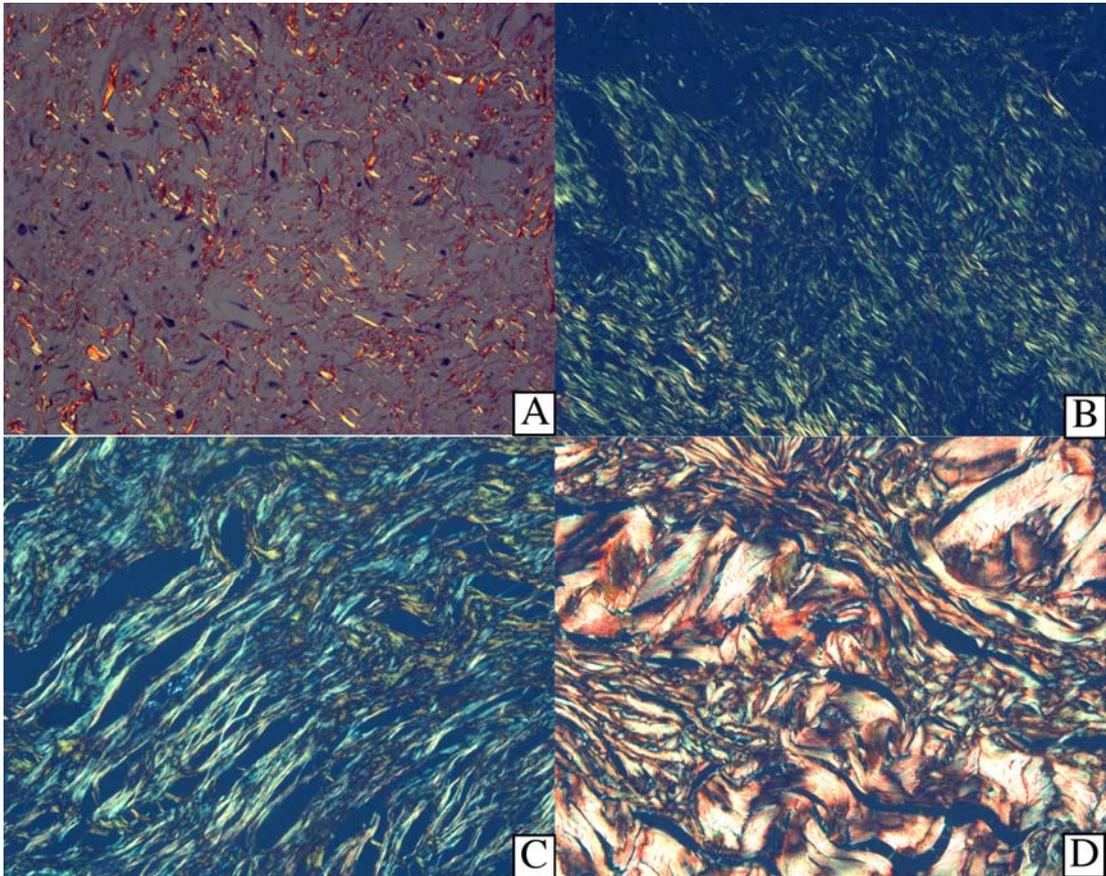


Figure 4





---

**MS# 09-4413; Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit vocal fol...**

**De:** Annals of Otolaryngology 

**Para:** adrihachiya@uol.com.br 

**Assunto:** MS# 09-4413; Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit vocal fol...

**Data:** 02/07/2009 18:00

---

MS# 09-4413; Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit vocal folds: an experimental study

MS# 09-4413; Histological study of implanted perifascial areolar tissue (PAT) in rabbit vocal folds: an experimental study

Dear Dr. Hachiya,

I write to acknowledge that the ANNALS has received the above-referenced manuscript. Could you please provide the names and email addresses of two reviewers whom you believe would be suitable for your manuscript? We are expanding our database of suitable reviewers.

Thank you for submitting your materials to the ANNALS.

Sincerely,

Monica Bergers  
Assistant to the Editor  
The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1</b>	Corte histológico coronal da porção média da glote intermembranácea de uma prega vocal humana normal mostrando sua estrutura trilaminar .....	65
<b>Figura 2</b>	Corte histológico coronal da porção média da glote intermembranácea da prega vocal de coelho mostrando sua estruturação pouco delimitada em duas camadas. GS-glândulas submucosas na prega vestibular; LP-Lâmina Própria ; MV-músculo vocal. HE 40X. Fonte: arquivo pessoal .....	65
<b>Figura 3</b>	Corte histológico transversal da camada profunda da fáscia temporal humana. Observa-se grande quantidade de fibras de colágeno ( <i>setas contínuas</i> ) dispostas irregularmente e pequena densidade de fibroblastos ( <i>setas em pontilhado</i> ). HE 400X. (Fonte: arquivo pessoal) .....	67
<b>Figura 4</b>	Corte histológico transversal do tecido areolar perifascial da fáscia temporal humana. Nota-se o arranjo trabecular e das fibras de colágeno ( <i>setas contínuas</i> ) e a maior densidade de fibroblastos ( <i>setas pontilhadas</i> ). HE 400X. (Fonte: arquivo pessoal) .....	67
<b>Quadro 1</b>	Organograma mostrando esquematicamente a divisão da amostra inicial dos animais nos diferentes grupos de estudo. Grupo I – animais sacrificados aos 15 dias do procedimento; Grupo II – animais sacrificados aos três do procedimento; Grupo III – animais sacrificados aos seis meses do procedimento; PVD – prega vocal direita; PVE - prega vocal esquerda .....	90

<b>Figura 5</b>	Fotomicrografia da anatomia da face lateral do membro inferior direito do coelho. A linha pontilhada mostra o local onde é retirado o tecido areolar perifascial da fáscia lata ( <i>Fonte: Popesko et al., 2003</i> )..	93
<b>Figura 6</b>	Amostra do enxerto logo após sua retirada .....	93
<b>Figura 7</b>	Etapas do procedimento cirúrgico .....	96
<b>Figura 8</b>	Figura esquemática da enxertia do TAP na prega vocal direita: (A) confecção do bolsão (em preto) e (B) localização do enxerto na lâmina própria (em azul) .....	97
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografia da laringe do coelho dividida em duas hemilaringes. A linha vermelha marca o nível da prega vocal. A hemilaringe esquerda foi subdividida em duas partes por uma incisão transversal, perpendicular ao eixo longitudinal da prega vocal, originando uma porção anterior e outra posterior que serão incluídas no bloco de parafina pra confecção das lâminas. E-epiglote; Pv-Processo vocal; Ca-Comissura anterior ....	99
<b>Figura 10</b>	Imagem capturada no monitor mostrando corte histológico do enxerto na prega vocal direita em aumento de 400X, avaliado no analisador de imagem Image Pro-Plus 6.0. A linha verde delimita a área de interesse para quantificação das fibras .....	105
<b>Figura 11</b>	Imagem capturada mostrando corte histológico do enxerto em aumento de 400X. Através do programa de análise de imagem, a área ocupada pelas fibras colágenas laranja-avermelhadas é identifica pelo analisador de imagens a partir de um padrão de cores previamente padronizado pelo pesquisador, identificadas na figura em azul. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em $\mu\text{m}^2$ .....	106
<b>Figura 12</b>	Imagem obtida no monitor mostrando o sistema de	

	análise digital. A área ocupada pelas fibras colágenas amarelo-esverdeadas é identificada pelo programa a partir de um padrão de cores previamente padronizado pelo pesquisador, identificadas em azul. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em $\mu\text{m}^2$ .....	107
<b>Figura 13</b>	Imagem obtida no monitor mostrando corte histológico do enxerto em aumento de 400X avaliado no sistema de análise digital. O pesquisador calcula a área total ocupada pelo enxerto identificada em azul, para posterior cálculo da densidade ocupada pelas fibras. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em $\mu\text{m}^2$ .	108
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografia de corte histológico da prega vocal direita em mostrando o enxerto e a cicatriz peri-enxerto. A área em azul corresponde ao enxerto que foi excluído da análise. Os dez quadriláteros ao redor do enxerto representam, esquematicamente, os locais de escolha para quantificação da densidade de colágeno da prega vocal direita. Picrossírius visualizado sob luz convencional 100X .....	110
<b>Figura 15</b>	Fotomicrografia mostrando corte histológico da prega vocal esquerda mostrando a cicatriz provocada pela confecção do bolsão. Os dez quadriláteros escolhidos aleatoriamente em preto representam esquematicamente os locais de escolha para quantificação da densidade de colágeno realizada através de programa de análise de imagem em aumento de 400X. Picrossírius visualizado sob luz convencional 100 X .....	110
<b>Figura 16</b>	Corte histológico transversal do tecido areolar perifascial antes da sua enxertia. Picrossírius visualizado sob luz convencional 400X .....	116
<b>Figura 17</b>	Corte histológico transversal da prega vocal direita aos	

	15 dias pós-operatórios, mostrando a área da incisão no epitélio para confecção do bolsão ( <i>seta</i> ) e o enxerto (E). HE 200X .....	117
<b>Figura 18</b>	Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos 3 meses pós-operatório: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria. Note a densificação das fibras colágenas dentro do enxerto; (B) Aspecto de degeneração hialina das fibras colágenas. Picrossírius sob luz convencional (A) 100X, (B) 400X .....	118
<b>Figura 19</b>	Corte histológico transversal prega vocal direita aos 15 dias pós-operatórios. Note a densificação das fibras colágenas no interior do enxerto (E), presentes já nesse grupo de estudo. Picrossírius sob luz convencional 100X .....	121
<b>Figura 20</b>	Corte histológico transversal da prega vocal direita aos 15 dias pós-operatórios visualizado sob luz polarizada. Observa-se mais claramente a densificação das fibras colágenas no interior do enxerto. Picrossírius sob luz polarizada (A) 100X; (B) 200X .....	122
<b>Figura 21</b>	Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos seis meses pós-operatórios: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria. Note a densificação progressiva das fibras colágenas dentro do enxerto; (B) Enxerto e lâmina própria visualizados em maior aumento e sob luz polarizada. Observe o padrão vermelho-alaranjado das fibras de colágeno dentro do enxerto. Picrossírius sob luz convencional (A) 100X e sob luz polarizada (B) 400X ..	123
<b>Figura 22</b>	Cortes histológicos transversais do enxerto mostrando a mudança histológica evolutiva das fibras colágenas ao longo do estudo. (A) Enxerto original; (B) Enxerto	

	aos 15 dias de pós-operatório; (C) Enxerto aos três meses de pós-operatório; (D) Enxerto aos seis meses de pós-operatório. Note a mudança no diâmetro das fibras e na sua cor. Picrossírius sob luz polarizada 400X .....	124
<b>Figura 23</b>	Gráfico mostra as médias e intervalos de confiança (95%) da densidade de fibras colágenas no interior do enxerto no grupo controle (tecido original) e nos três tempos de observação pós-enxertia .....	127
<b>Figura 24</b>	Gráfico mostra a porcentagem das fibras colágenas amarelo-esverdeadas (AE) e laranja-avermelhadas (LA) em relação ao total de fibras no interior do enxerto no grupo controle e nos três períodos pós-enxertia.....	127
<b>Figura 25</b>	Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos 15 dias de pós-operatório: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria; (B) Lâmina própria peri-enxerto visualizada em maior aumento. Observe o infiltrado inflamatório agudo moderado (seta). HE (A) 100X; (B) 400X .....	129
<b>Figura 26</b>	Corte histológico transversal da prega vocal controle aos três meses de pós-operatório: (A) Vista panorâmica a lâmina própria e a cicatriz cirúrgica; (B) Lâmina própria visualizada em maior aumento. Observe o infiltrado inflamatório discreto com predomínio de células linfomononucleares (seta). HE (A) 100X; (B) 400X .....	130
<b>Figura 27</b>	Representação gráfica mostrando a distribuição dos animais, em porcentagem, nos diferentes grupos de estudo, dependendo da intensidade do processo inflamatório. PVD - prega vocal direita, PVE - prega vocal esquerda. G I - animais sacrificados aos 15 dias, G II – animais sacrificados aos três meses, G III –	

	animais sacrificados aos seis meses. i- processo inflamatório ausente, ii – processo inflamatório leve, iii – processo inflamatório moderado, iv - processo inflamatório intenso .....	132
<b>Figura 28</b>	Corte histológico transversal da prega vocal controle aos seis meses pós-operatório mostrando a cicatriz causada pela manipulação cirúrgica. (A) Picrossírius sem polarização 100X. (B) Picrossírius visualizado sob luz polarizada, 200X .....	136
<b>Figura 29</b>	Representação gráfica da densidade de colágeno na prega vocal enxertada (PVD) e prega vocal controle (PVE) nos três grupos de estudo .....	137

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Média e desvio-padrão da densidade de colágeno total e da porcentagem de fibras amarelo-esverdeadas (AE) e laranja-avermelhadas (LA) do enxerto nos diferentes grupos de estudo .....	125
<b>Tabela 2</b>	Tabela resumo com os resultados (valores de p) dos testes <i>post-hoc</i> comparando a densidade de colágeno total e a proporção de fibras amarelo-esverdeadas (AE) e laranja avermelhadas (LA) no interior do enxerto nos diferentes grupos de estudo .....	126
<b>Tabela 3</b>	Análise semiquantitativa da comparação do grau de inflamação entre a prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) nos três grupos de estudo .....	133
<b>Tabela 4</b>	Significância (valores de p) comparando o grau de inflamação da prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) segundo os diferentes tempos de observação ....	133
<b>Tabela 5</b>	Média dos 10 campos e desvio-padrão (DP) da densidade de colágeno na prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) nos três grupos de estudo .....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CapPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
et al.	e outros
HE	hematoxilina-eosina
Inc.	Incorporation
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
p	nível de significância
PVD	prega vocal direita
PVE	prega vocal esquerda
PVP-I	polivinilpirrolidona-iodo
TAP	Tecido Areolar Perifascial
UI	Unidade Internacional

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
g	grama
mg/kg	miligrama por quilograma
mL	mililitro
mm	milímetro
V	Volt
W	Watt
X	vezes
µm	micrometro
µm <sup>2</sup>	micrometro quadrado
%	porcentagem

## RESUMO

Hachiya, A. *Estudo histológico do tecido conjuntivo areolar perifascial implantado em pregas vocais de coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 171p.

Apesar do grande avanço da laringologia nas últimas décadas, o tratamento da rigidez da prega vocal continua sendo um desafio. A rigidez da prega vocal pode estar associada a alterações estruturais mínimas como no sulco vocal profundo ou decorrente da fibrose cicatricial como nos casos de cicatriz pós-operatória. Em ambos os casos, há perda dos elementos da matriz extracelular da camada superficial da lâmina própria (Espaço de Reinke) que se encontra substituída por tecido cicatricial. O objetivo do tratamento é recuperar a deficiência volumétrica e restabelecer a microarquitetura histológica da prega vocal. O tecido areolar perifascial constitui uma excelente alternativa por suas propriedades viscoelásticas semelhantes à da camada superficial da lâmina própria, por sua fácil obtenção e baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histológicas que ocorrem no enxerto e na prega vocal enxertada e comparar os resultados encontrados com a prega vocal contralateral, submetida apenas à manipulação cirúrgica. Trinta coelhos foram submetidos ao procedimento cirúrgico que consistiu na confecção de um bolsão na lâmina própria de ambas as pregas vocais. O enxerto foi colocado na prega vocal direita e a prega esquerda utilizada como controle. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos diferindo no tempo da análise histológica: 15 dias (Grupo I), três meses (Grupo II) e seis meses (Grupo III). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e pelo Sírius-red, uma coloração específica para fibras colágenas. Observou-se uma mudança gradual do enxerto com aumento progressivo da densidade das fibras colágenas no interior do enxerto e uma mudança progressiva do padrão de birrefringência das mesmas, de um predomínio de fibras colágenas amarelo-esverdeadas para um predomínio de fibras laranja-avermelhadas. A

aplicação do teste estatístico *Anova one-way* mostrou um aumento estatisticamente significativo da densidade de colágeno total no interior do enxerto entre os animais dos Grupos I e II ( $p=0,004$ ) e um aumento significativo da porcentagem de fibras laranja-avermelhadas entre o Grupo II e III ( $p=0,011$ ). A densidade do colágeno na região adjacente ao enxerto na prega vocal enxertada foi estatisticamente maior que a densidade de colágeno na incisão cirúrgica na prega vocal controle em todos os grupos de estudo ( $p\leq 0,001$ ). A aplicação do Teste de Fisher na análise semiquantitativa do processo inflamatório não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre a prega vocal enxertada e a prega vocal controle em nenhum dos tempos estudados. Entretanto, quando avaliamos o processo inflamatório temporalmente para cada prega vocal evidenciamos uma diminuição significativa do processo inflamatório entre os animais do grupo de 15 dias e três meses ( $p=0,032$  para o grupo enxertado e  $p=0,035$  para o grupo controle). Nossos achados sugerem que o tecido areolar perifascial apresenta baixa tendência a promover reação inflamatória e permanece na prega vocal do coelho por pelo menos seis meses. Entretanto, há uma importante mudança da composição do colágeno dentro do enxerto e no tecido ao redor deste sugerindo não ser um tecido ideal para substituir a lâmina própria. Outros estudos devem ser realizados para avaliar o seu papel no tratamento da rigidez da prega vocal.

*Descritores:* cordas vocais, transplante autólogo, colágeno, cicatriz, histologia, modelo animal

## SUMMARY

Hachiya, A. *Histological Study of implanted perifascial areolar tissue in rabbit's vocal folds* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 171pp.

Besides the great development of phonosurgery over the previous decades, vocal fold stiffness is a difficult disease that remains a therapeutic challenge. It may be either caused by cicatricial fibrosis or be associated with minor structural alterations of the vocal fold mucosa, mainly represented by deep sulcus vocalis. In both cases, there is loss and disorganization of extracellular matrix components of the superficial layer of the lamina propria (Reinke's Space), which is replaced by fibrotic tissue. The treatment goal is to re-establish the physical volume and the microarchitecture of the vocal folds. The perifascial tissue consists of a loose areolar tissue with viscoelasticity properties close to those of the superficial layer of the lamina propria. Thus, the aim of this experiment was to evaluate the histological changes of the graft and in the host tissue after placing a strip of this tissue into rabbit's vocal folds. Thirty rabbits were operated. The graft was implanted in pockets surgically created in the right vocal fold. The left vocal fold was used as control. The animals were randomly divided in three groups for evaluation at 15 days (Group I), 3 months (Group II) and 6 months (Group III) and their larynx reviewed histologically. Histological sections underwent hematoxylin-eosin and specific staining method to quantify collagen fibers (Picrosirius-polarization method). Histological changes of the graft were observed since 15 days post-operatively and were characterized by a progressive increase of the density of collagen fibers and decrease of vascularization. Examination of Picrosirius-red stained section with polarizing microscopy revealed a gradual change of collagen fibers pattern with a predominance of greenish-yellow range observed in the original tissue and in Group I and mostly redish-orange range in the grafts of Group II and III. Statistical analysis (*Anova one-way*) showed a significant increase of the

total collagen density in the graft between Group I and II ( $p=0.004$ ) and a significant predominance of redish-orange pattern between Groups II e III ( $p=0.011$ ). The collagen density of the surrounding area of the graft in the implanted vocal fold was significantly increased when compared to control in all periods ( $p\leq 0.001$ ). The inflammatory process was not statistically different between the implanted vocal folds and controls according to Fisher's test for any of the studied groups. Nonetheless, when the inflammatory process of each vocal fold was individually assessed on a long-term basis, a significant decrease of the inflammatory process was seen in the host ( $p=0.032$ ) and control vocal fold ( $p=0.035$ ) between Group I and II. Our findings suggest that the PAT has some advantages as a substance for vocal fold augmentation: it has low tendency to promote inflammatory response and low rate of absorption since it remains in the vocal fold for at least six months. However, the histological changes that take place in the graft and in the host tissue suggest that the PAT is not an ideal material as a substitute for the lamina propria and new studies are needed to determine its role on the treatment of vocal fold scarring.

*Key words:* vocal cords; transplantation, autologous; collagen; cicatrix; histology; animal model.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço da fonomicrocirurgia de laringe nas últimas duas décadas, o tratamento da rigidez de prega vocal continua sendo um desafio para os laringologistas.

A rigidez da prega vocal pode ser causada pela fibrose cicatricial ou pode estar associada a alterações estruturais mínimas, representadas principalmente pelo sulco vocal profundo (Berninger et al., 1996). Em ambos os casos, há perda dos elementos da matriz extracelular da camada superficial da lâmina própria (Espaço de Reinke), substituição deste espaço por tecido fibroso e aderência do epitélio ao ligamento vocal e ao músculo tireoarritenoideo (Ford et al., 1996). Essas alterações histológicas interferem na vibração das pregas vocais com impedimento da propagação da onda mucosa durante a fonação e escape de ar devido à incompetência glótica. Os pacientes apresentam-se clinicamente com voz rouca, áspera, soprosa e de baixa intensidade, com dificuldade na projeção da voz e fadiga vocal, com grande impacto na qualidade de vida (Hansen e Thibeault, 2006).

Segundo Giovanni et al. (2007) dois principais objetivos devem ser alcançados no tratamento da rigidez da prega vocal: melhora do fechamento glótico e recuperação da estrutura trilaminar da prega vocal através da substituição do tecido fibrótico por um material com viscoelasticidade semelhante à da prega vocal.

O material ideal para preenchimento deve ser inerte e biocompatível,

ou seja, ele deve provocar pouca reação inflamatória, ser de fácil obtenção, ter pouca reabsorção ao longo do tempo e apresentar viscoelasticidade semelhante à camada superficial do espaço de Reinke (King e Simpson, 2007).

Entre os tratamentos propostos na literatura, as cirurgias do arcabouço laríngeo e a injeção de substâncias no interior do músculo tireoaritenoideo e no espaço paraglótico visam à medialização da prega vocal. Por não abordar diretamente a lâmina própria, onde se encontram as principais alterações histológicas, os resultados pós-operatórios dessas técnicas são limitados quanto à melhora na qualidade vocal (Koufman et al., 1991; Zeitels et al., 2003).

Vários materiais têm sido injetados no interior do espaço de Reinke com o objetivo de restituí-lo. A gordura foi o primeiro material a ser implantado em um paciente com sulco vocal (Sataloff et al., 1997). A partir de então, vários estudos clínicos e experimentais foram realizados com esse material implantado em bloco ou injetado no espaço de Reinke (Woo et al., 1999; Neueschwander et al., 2001; Perazzo et al., 2007). A gordura apresenta viscoelasticidade semelhante à da prega vocal, é um material biocompatível, e é considerado um excelente substituto para o espaço de Reinke (Chan e Titze, 1998; Woo et al., 1999). Entretanto, seu uso tem sido desencorajado por estudos que mostram sua rápida absorção e promoção de fibrose (Mikus et al., 1995; Carneiro et al., 2005).

Ford e Bless (1987) introduziram o uso de colágeno bovino na lâmina própria de pregas vocais em um paciente com sulco vocal. Segundo os

autores, o colágeno é o principal constituinte da lâmina própria e promove a produção de colágeno endógeno, suavizando a fibrose cicatricial. O procedimento não é isento de complicações, tendo potencial risco de hipersensibilidade e desenvolvimento de doenças autoimunes e complicações locais, como formação de depósitos submucosos e necrose tecidual (Björk et al., 2002; Anderson e Sataloff, 2004). Estudos mais recentes propõem o uso de colágeno autólogo; ou seja, obtido da pele do indivíduo (Remacle et al., 2000; Kriesel et al., 2002). O alto custo, a necessidade de vários procedimentos, a reabsorção precoce e a falta de aprovação pelo órgão de saúde americano – “Food and Drug Administration” (FDA) – ainda não estimularam seu uso (Remacle et al., 2007).

Outra opção terapêutica utilizada no tratamento da rigidez associada ao sulco vocal e à fibrose cicatricial é o ácido hialurônico por ser um dos principais constituintes da lâmina própria (Hertegard et al., 2004; Borzacchiello et al., 2005) e por apresentar viscosidade semelhante à da prega vocal (Hertegard et al., 2003; Dahlqvist et al., 2004). Contudo, seu uso foi praticamente abandonado por aumentar a viscoelasticidade de pregas vocais escarificadas em modelo animal, pelo alto custo e rápida absorção (Hertegard et al., 2006).

O implante de fásia foi primeiramente introduzido por Rihkanen (1998) para medialização de uma paralisia unilateral. Posteriormente, Tsunoda et al. (1999, 2000) utilizaram a fásia temporal para tratamento de pacientes com sulco vocal, ao implantá-la no interior do espaço de Reinke com bons resultados nos parâmetros da videolaringoscopia e no

tempo máximo de fonação. Todavia, sua casuística é pequena e seus resultados não foram reproduzidos na literatura.

Um potencial material para substituição do espaço de Reinke é a camada superficial da fáscia muscular, também denominada de fáscia superficial na literatura (Hazleman et al., 2004) ou tecido areolar perifascial (Clodius, 2001; Kouraba et al., 2003). Trata-se de um tecido conjuntivo areolar, composto por fibras colágenas finas, frouxamente arranjadas, que se interpõe entre o tecido celular subcutâneo e a musculatura permitindo o deslizamento das estruturas (Hazleman et al., 2004). Essa característica histológica assemelha-se à descrição das fibras de colágeno do espaço de Reinke constituído por uma rede delicada de fibras de colágenos finas (Madruga de Melo et al., 2003).

Na Cirurgia Plástica, esse tecido tem sido utilizado para correção de adesões cicatriciais entre a pele e a musculatura, como em queimaduras, interpondo-se entre as camadas, corrigindo o defeito volumétrico causado pela perda tecidual e possibilitando o deslizamento da pele e tecido celular subcutâneo (Clodius, 2001; Kouraba et al., 2003).

As características histológicas e as propriedades biomecânicas desse tecido motivaram sua utilização na reabilitação dos pacientes com rigidez da prega vocal causada pela presença de sulco vocal ou decorrente de fibrose cicatricial. Entre os otorrinolaringologistas brasileiros, esse tecido foi denominado de “pré-fáscia” e seu papel no tratamento da rigidez de prega vocal vem sendo discutido em congressos nacionais nos últimos quatro anos.

Costa et al. (2008) publicaram um estudo, utilizando o implante da camada superficial da fáscia temporal dentro do espaço de Reinke em pacientes com rigidez de prega vocal com resultados clínicos promissores.

Wiikmann et al. (2008) sugerem que a camada superficial da fáscia temporal apresenta viscosidade dinâmica que mais se assemelha à viscosidade da mucosa da prega vocal quando comparada a outros materiais biológicos usualmente utilizados para enxertia em pregas vocais, como a camada profunda da fáscia temporal e a gordura.

Pelos motivos citados, o tecido conjuntivo areolar perifascial poderia, teoricamente, representar uma excelente opção terapêutica para correção dos defeitos da lâmina própria. Entretanto, não existem na literatura estudos que mostrem se o tecido enxertado mantém as mesmas características que o tecido original quando implantado na lâmina própria da prega vocal. Além disso, não sabemos como o enxerto afeta o tecido hospedeiro, já que a manipulação cirúrgica, bem como o estímulo da manutenção do tecido enxertado, podem potencialmente causar inflamação e fibrose.

Com o intuito de responder a esses questionamentos, este estudo foi idealizado para descrever a distribuição das fibras colágenas do enxerto do tecido conjuntivo areolar perifascial fáscia lata, comparando seu estado original, antes do procedimento, com o enxerto, após sua implantação na submucosa da prega vocal de coelhos, aos quinze dias, três meses e seis meses. Além disso, iremos avaliar a densidade de colágeno e o processo inflamatório ao redor do enxerto, comparando com a prega vocal contralateral, não enxertada.

**2 OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### **Objetivos Principais:**

1. Descrever os achados histopatológicos do tecido conjuntivo areolar perifascial (pré-fáscia) antes da sua enxertia (tecido original) e após ser implantado em pregas vocais de coelhos em três períodos distintos (15 dias, três meses e seis meses).
2. Quantificar a densidade e a proporção de fibras colágenas amarelo-esverdeadas e laranja-avermelhadas do enxerto, identificadas pelo Sírius-red, antes e após sua enxertia em pregas vocais de coelhos em três períodos distintos (15 dias, três meses, seis meses).

### **Objetivos secundários:**

Nos três períodos de estudo (15 dias, três meses e seis meses):

1. Comparar, através da análise semiquantitativa, o processo inflamatório de pregas vocais de coelhos submetidas à enxertia do tecido conjuntivo areolar perifascial da fáscia lata (pré-fáscia) com o grupo controle, não enxertado.
2. Comparar a densidade do colágeno na periferia do enxerto com o grupo controle, não enxertado.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

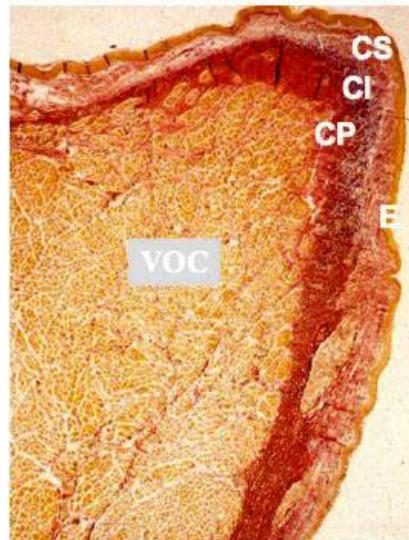
#### 3.1 Histologia da prega vocal humana e da prega vocal de coelhos

A estrutura histológica da prega vocal e sua correlação com a fisiologia da produção vocal foram primeiramente descritas por Hirano, em 1974. Segundo o autor, a prega vocal é histologicamente dividida em camadas: epitélio, camadas superficial, intermediária e profunda da lâmina própria e músculo vocal (Figura 1). Sob a luz desses conhecimentos, desenvolveu a teoria de corpo-cobertura para a vibração das pregas vocais, na qual a cobertura móvel, constituída pela membrana mucosa, vibra sobre o corpo estacionário, constituído pelo ligamento, músculo vocal e o cone elástico.

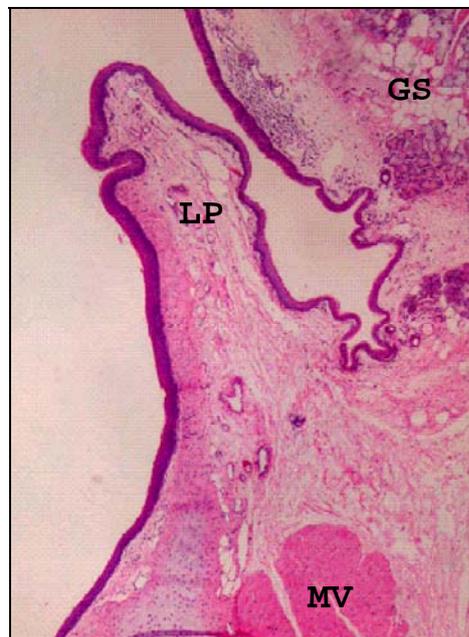
Madruga de Melo et al. (2003) estudam 20 pregas vocais adultas, utilizando cortes verticais observados através de microscopia de luz pelo método de Picrossírius-polarização. Observam-se duas populações de fibras colágenas (colágeno tipo I e tipo III), além de um arranjo em rede das fibras, descrita como aspecto de “cesta de vime”. Três camadas são identificadas: uma logo abaixo do epitélio, outra profunda contendo muitas fibras colágenas, e outra intermediária contendo poucas fibras colágenas, finas e dispostas em forma de uma delicada rede. O colágeno da camada profunda penetra no músculo vocal através de prolongamentos com o mesmo padrão de organização. Os autores propõem um modelo no qual as bandas

superficial e profunda seriam os elementos de transmissão de força do sistema, enquanto que a região central, por ser mais flexível, seria o elemento vibrátil do sistema. Devido às características de birrefringência mostradas pelo colágeno da prega vocal, os autores sugerem ainda que as fibras das bandas superficial e profunda seriam constituídas principalmente por colágeno do tipo I e as fibras finas da região central seriam compostas por colágeno tipo III.

De acordo com Kurita et al. (1995), a prega vocal do coelho apresenta-se revestida por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado com aproximadamente 0,3mm de espessura. Uma membrana basal divide essa camada epitelial da lâmina própria que apresenta uma espessura de aproximadamente 4,0mm. A lâmina própria pode ser dividida em duas camadas não bem delimitadas, uma camada superficial constituída por fibras finas de colágeno entremeadas por pequenas ilhas de tecido gorduroso e uma camada profunda constituída por uma grande quantidade de bandas grossas e densas de fibras de colágeno ancoradas sobre o tecido muscular liso subjacente. Vasos sanguíneos e linfáticos encontram-se presentes principalmente na região superficial da lâmina própria e há grande quantidade de glândulas submucosas. Não há estrutura comparável ao ligamento vocal. (Figura 2)



**Figura 1** - Corte histológico coronal da porção média da glote intermembranácea de uma prega vocal normal humana mostrando sua estrutura trilaminar. Coloração de Van Gieson para fibras elásticas. E - epitélio; CS - camada superficial da lâmina própria; CI - camada intermediária da lâmina própria; CP - camada profunda da lâmina própria; VOC - músculo vocal. (Fonte: Hirano e Sato, 1993).

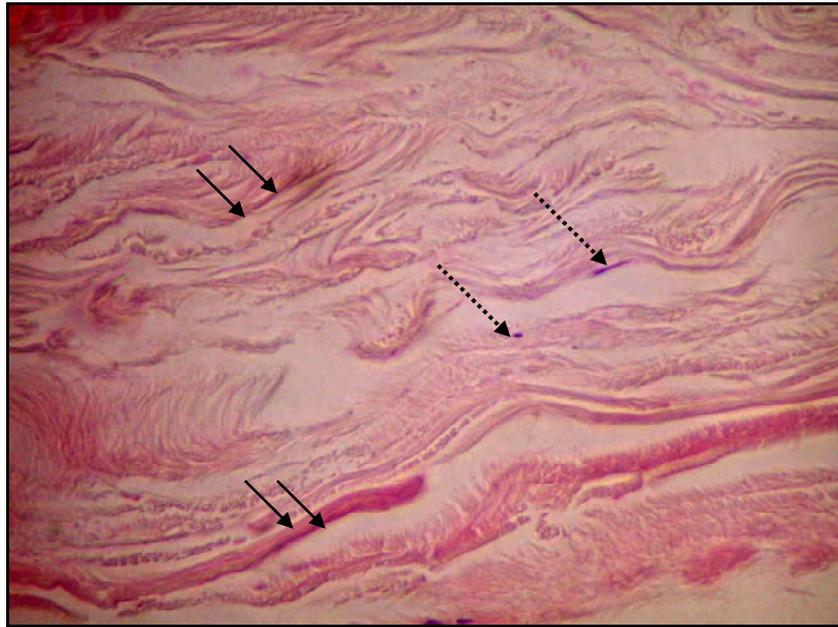


**Figura 2** - Corte histológico coronal da porção média da glote intermembranácea da prega vocal de coelho mostrando sua estruturação pouco delimitada em duas camadas. GS - glândulas submucosas na prega vestibular; LP - Lâmina Própria; MV - músculo vocal. HE 40X. Fonte: arquivo pessoal

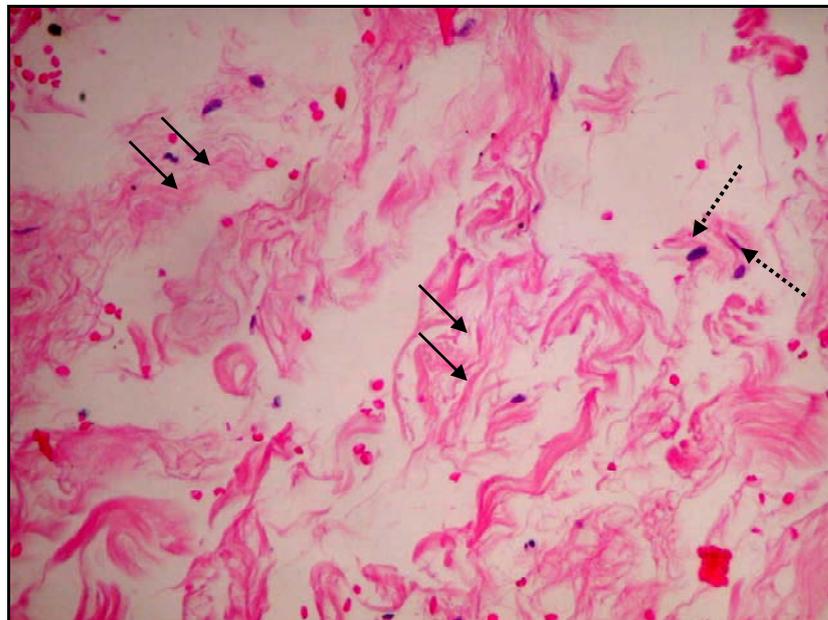
### 3.2 Anatomia e Histologia da fáscia muscular

Hazleman et al. (2004) dividem anatomicamente a fáscia muscular em camada profunda e camada superficial, denominando-as de fáscia profunda e fáscia superficial, respectivamente. A fáscia profunda é descrita pelos autores como um tecido conjuntivo fibroso, composto por um empacotamento denso de fibras colágenas irregularmente agrupadas, que envolve toda a musculatura dando seu formato e permitindo a contração muscular em bloco. Há poucos vasos sanguíneos e poucas células no tecido. Trata-se de um tecido mais resistente a trações (Figura 3).

Superficialmente à fáscia profunda, encontra-se um tecido conjuntivo de revestimento, de consistência delicada e flexível. Nesse tecido, os feixes de colágeno formam uma trama tridimensional, o que confere ao tecido certa resistência às trações exercidas em qualquer direção, além de permitir a absorção de impacto. Esse tecido permite o deslizamento da pele e subcutâneo sobre a musculatura e dos diferentes grupos musculares entre si (Figura 4).



**Figura 3** - Corte histológico transversal da camada profunda da fáscia temporal humana. Observa-se grande quantidade de fibras de colágeno (*setas contínuas*) dispostas irregularmente e pequena densidade de fibroblastos (*setas em pontilhado*). HE 400X. (*Fonte: arquivo pessoal*).



**Figura 4** - Corte histológico transversal do tecido areolar perifascial da fáscia temporal humana. Nota-se o arranjo trabecular e das fibras de colágeno (*setas contínuas*) e a maior densidade de fibroblastos (*setas pontilhadas*). HE 400X. (*Fonte: arquivo pessoal*)

Segundo Peer (1959) a fáscia muscular apresenta consistência similar ao colágeno e atividade metabólica baixa sendo uma excelente alternativa para utilização como enxertos livres.

### **3.3 Sulco vocal e Fibrose cicatricial**

O sulco vocal corresponde a uma invaginação do epitélio para o interior da lâmina própria. O defeito pode estar confinado na superfície da lâmina própria ou penetrar profundamente ao ligamento vocal e à musculatura. É descrita clinicamente como uma depressão localizada no bordo livre da prega vocal, resultando numa área de rigidez e fechamento glótico incompleto durante a fonação (Luschinger e Arnold,1965).

Pontes (1989) classifica o sulco vocal em sulco oculto, sulco estria maior, sulco estria menor e sulco bolsa. O sulco oculto caracteriza-se por um adensamento de fibras da lâmina própria, acarretando diminuição da mobilidade da túnica mucosa, sendo o diagnóstico possível apenas por meio da laringoscopia direta. O sulco estria menor apresenta-se como uma linha atrófica na mucosa e, em geral, podendo ser identificada durante o exame de videolaringoestroboscopia ou na exploração da prega vocal por laringoscopia direta. O sulco estria maior é uma depressão na mucosa em forma de canaleta, aderida às estruturas mais profundas, formando um lábio superior e outro inferior. O sulco bolsa se assemelha ao anterior, porém, nesse caso, seus lábios se tocam e a invaginação sofre uma dilatação

formando um espaço em forma de bolsa.

Hirano (1989) em estudo histológico observa que o sulco vocal envolve a camada superficial da lâmina própria no bordo livre da prega vocal. O mesmo autor (Hirano, 1990) destaca aumento das fibras colágenas observado ao redor do sulco.

Sato e Hirano (1998) estudam por microscopia eletrônica as alterações histológicas de pacientes com sulco vocal e encontraram os seguintes achados: espessamento da membrana basal, aspecto multilaminar da lâmina própria na região do sulco e diminuição da quantidade e qualidade das fibras elásticas.

De acordo com Ford (1996), o sulco vocal pode ser classificado em três tipos. No sulco vocal tipo I, nota-se uma depressão longitudinal de epitélio para o interior da camada superficial da lâmina própria, mas que não se aprofunda para o ligamento vocal. Essa depressão se estende em todo o comprimento da prega vocal. No sulco tipo II, a depressão se estende até o ligamento vocal ou mais profundamente e envolve perda dos constituintes da camada superficial refletindo em maior rigidez da mucosa. No sulco tipo III, há uma invaginação focal do epitélio, aderida a planos mais profundos; o epitélio encontra-se espessado e hiperqueratinizado. Esse tipo de sulco normalmente leva a uma disфонia severa principalmente quando infiltra o músculo vocal. Há perda da camada superficial da prega vocal e diminuição da propagação da onda mucosa. A histologia mostra que no sulco tipo III há fibrose difusa e área de neovascularização.

Berninger et al. (1996) em estudo multicêntrico concluem que na

prega vocal, o processo de cicatrização e fibrose leva a um defeito funcional com perda da viscoelasticidade da prega vocal e inabilidade de modular o fluxo de ar para produzir o som glótico. Os autores classificam as causas da fibrose da prega vocal em: traumáticas (radiação, cirurgia, úlceras, carcinoma), iatrogênicas (injeção de Teflon, cicatriz pós-operatórias, pós-entubação orotraqueal, utilização de sonda naso-gástrica, traqueostomia), inflamatórias (lesões inalatórias, doenças reumatológicas) ou outros (miscelânea: sulcos, webs, cistos).

Segundo Sataloff (1997a), a fibrose da prega vocal altera a fonação por interferir na produção da onda mucosa devido às modificações da estrutura trilaminar no bordo livre da porção vibratória da prega vocal, visto comumente após decorticação e em menores proporções após cirurgia ou trauma. De acordo com o autor, a mesma alteração histológica da estrutura da prega vocal e da função fonatória pode ser vista nos casos de sulco vocal.

Segundo Dailey e Ford (2006) o sulco vocal e a fibrose cicatricial são alterações que ocorrem na lâmina própria da prega vocal. Há substituição dos constituintes normais do espaço de Reinke por um tecido cicatricial, rico em colágeno e aderido ao epitélio, levando à perda da sua viscoelasticidade. Para os autores, embora apresentem fisiopatologias diferentes, são consideradas como a mesma doença por compartilharem quadro clínico semelhante e as mesmas dificuldades quanto ao tratamento.

Giovanni (2007) postula que as alterações histológicas que ocorrem na lâmina própria no sulco vocal e na fibrose levam ao arqueamento do

bordo livre da prega vocal, aumento da rigidez da mucosa com interferência na propagação da onda mucosa e incompetência glótica, com escape de ar durante a fonação. Segundo o autor, clinicamente o paciente apresenta-se como uma voz áspera, soprosa e tensa, com pouca adaptabilidade, baixa intensidade e fadiga vocal, causando grande impacto na qualidade de vida desses pacientes.

### **3.4 Cicatrização**

A cicatrização é um processo de reparo tecidual frente a uma agressão e tem como objetivo a restauração da função prévia do tecido lesado; a área danificada pode ser substituída por um tecido organizado, idêntico em estrutura e função ao tecido nativo ou ser substituída por um tecido não especializado, o tecido de escarificação (Cotran et al., 1989).

De acordo com Peacock (1990) e Adzick (1997), o processo cicatricial pode ser dividido em três etapas: inflamação, proliferação e remodelação.

Segundo os autores, independente do resultado final da lesão tecidual, seja pela restituição do tecido especializado ou a substituição por um tecido cicatricial, a resposta inicial dos tecidos é sempre a inflamação aguda.

Nesta fase, os principais eventos são: hemostasia, quimiotaxia leucocitária e diapedese, fagocitose e liberação de fatores de crescimento. Essa resposta é relativamente inespecífica, e suas funções mais importantes

são eliminar os tecidos necróticos, proteger contra infecção local e permitir o acesso do sistema imune à área danificada.

Springer (1994) descreve as modificações no tecido conjuntivo na terceira fase da inflamação, denominada de remodelação. As alterações ocorrem principalmente na matriz extracelular, como o aumento na resistência entre as fibras colágenas, ação das colagenases e diminuição da quantidade de água. A remodelação da cicatriz normalmente se inicia por volta da terceira semana após o trauma e persiste por meses ou anos.

Segundo Klein e Rudolph (1972), o colágeno é a principal proteína do tecido cicatricial e é sintetizada ou recrutada dos tecidos adjacentes. Entre três a seis semanas após a lesão, a produção de colágeno atinge o pico, com a organização em feixes densos. O procolágeno, um precursor do colágeno, é utilizado para mensurar a formação de colágeno no tecido cicatricial. A cicatriz madura contém colágeno tipo I e II, com predomínio do colágeno tipo I.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para a melhor compreensão da cicatrização em pregas vocais. Parsons et al. (1999) avaliam através de um estudo *in vitro* a influência de forças mecânicas sobre a atividade dos fibroblastos. Os autores sugerem que os fibroblastos submetidos à sobrecarga mecânica aumentam a síntese de procolágeno e sugerem que a prega vocal humana, que está submetida à constante ação de forças mecânicas externas, estaria sujeita a uma maior produção de colágeno durante o processo cicatricial.

Thibeault et al. (2002) estudam a ultra-estrutura histológica e as

propriedades reológicas de pregas vocais de coelhos após dois meses da manipulação cirúrgica de uma das pregas vocais. Os autores observam uma deposição desorganizada de fibras de colágeno, porém em menor densidade quando comparado às pregas vocais normais, aumento do procolágeno e diminuição de fibras elásticas. Não há diferença na quantidade de ácido hialurônico entre as pregas vocais intactas e as manipuladas. Em relação à reologia, há um aumento da rigidez e da viscoelasticidade nas pregas vocais manipuladas. Os autores sugerem que a alteração das propriedades viscoelásticas da prega vocal manipulada poderia ser secundária à desorganização da microarquitetura do colágeno e não resultado do aumento na sua densidade, achado não observado neste estudo.

Rosseau et al. (2003) descrevem a cicatrização em pregas vocais de seis cães após manipulação cirúrgica, em que foi realizada decorticação de uma das pregas vocais. Metade dos animais do estudo foi sacrificada aos dois meses e a outra metade após seis meses do procedimento. Os autores observam um aumento estatisticamente significativo do procolágeno I e da deposição de colágeno nas pregas vocais manipuladas aos dois e seis meses em comparação com o controle. Não há diferença significativa entre os grupos de estudo e o controle, em relação à densidade de ácido hialurônico. No mesmo estudo, os autores avaliam as propriedades reológicas e encontram uma maior viscosidade dinâmica em um animal aos dois meses e em todos os animais do grupo de seis meses, levando os autores a concluir que a deposição do colágeno que ocorre após a

manipulação cirúrgica, durante o processo de cicatrização, poderia influenciar as propriedades viscoelásticas da prega vocal manipulada.

Em outro estudo, Rousseau et al. (2004) examinam as alterações reológicas e histológicas crônicas de pregas vocais de coelhos cicatrizadas após seis meses da lesão inicial. Nesse período há um aumento do colágeno e diminuição do procolágeno para valores iguais ao controle. Além disso, observam uma redução das fibras elásticas e manutenção dos níveis de ácido hialurônico. Em relação às propriedades viscoelásticas, as pregas vocais manipuladas apresentam aumento na rigidez.

Branski et al. (2005) realizam estudo para avaliar os eventos agudos da cicatrização da prega vocal de coelhos após lesão epitelial. Observam a formação de um tampão de fibrina no primeiro dia após a lesão, presença de intenso infiltrado inflamatório no terceiro dia e completa reepitelização no quinto dia. Do quinto ao vigésimoprimeiro dia, constatam progressiva deposição de colágeno desorganizado e hiperplasia e hipertrofia do epitélio.

Tateya et al. (2005) avaliam o processo cicatricial crônico de pregas vocais de ratos e encontram aumento significativo em relação ao controle, não manipulado, do colágeno tipo I e III aos dois, quatro, oito e doze meses. O colágeno tipo I apresenta diminuição na sua densidade a partir das oito semanas de cicatrização, apesar de estar aumentado em comparação com o controle. Os autores sugerem que a remodelação tecidual diminua a partir dos dois meses.

### 3.5 Tratamento da rigidez de prega vocal

Segundo Giovanni et al. (2007) dois principais objetivos devem ser alcançados no tratamento da rigidez da prega vocal: melhora do fechamento glótico e recuperação da estrutura trilaminar da prega vocal com substituição do tecido fibrótico por um material com viscoelasticidade semelhante à da prega vocal.

Hertegard et al. (2003) preconiza que a viscoelasticidade do ácido hialurônico é a que mais se assemelha à da prega vocal e demonstram que quando injetados é necessária “supercorreção”, uma vez que o material é ligado à água que é rapidamente absorvida, levando a perda de volume precocemente. A duração média é de 4-6 meses.

Dahlqvist et al. (2004) publicam um estudo experimental comparando a viscoelasticidade de diferentes materiais após serem injetados superficialmente na prega vocal de coelhos. Foram testados: colágeno bovino (Zyplast®), ácido hialurônico dissolvido em água (HylanB®), dextrômeros de ácido hialurônico (DiHA) e politetrafluoretileno (Teflon®). Após seis meses do procedimento, os animais foram sacrificados e viscoelasticidade dinâmica das pregas vocais com material injetado foi medida, comparando-se com a prega vocal controle, não manipulada. Todos os materiais apresentaram diminuição da viscosidade à medida que se aumentava a frequência do reômetro. Tanto o ácido hialurônico como o dextrômero de ácido hialurônico apresentam baixa viscosidade semelhante à prega vocal controle não injetada. O Teflon® apresentou altos valores de

viscoelasticidade, seguido do colágeno. Os autores concluem que o ácido hialurônico (HylanB® gel e DiHA) apresenta características favoráveis para injeção na prega vocal.

Hertegard et al. (2006) realizam estudo experimental para avaliar as propriedades viscoelásticas de pregas vocais de coelhos submetidas à escarificação e injeção de ácido hialurônico. Demonstram que quando injetado em pregas vocais fibrosadas, há piora na viscoelasticidade da lamina própria e concluem, contrariando seus estudos anteriores (Hertegard et al., 2003; Hertegard et al., 2004) que, apesar das características teóricas quanto à semelhança da sua viscoelasticidade com a da prega vocal, o ácido hialurônico representa um material pobre para substituição da camada superficial da lâmina própria.

O uso de colágeno bovino para tratamento da rigidez da prega vocal foi primeiramente descrito por Ford e Bless (1987), ao injetá-lo superficialmente na prega vocal de um paciente com fibrose pós-operatória com resultados promissores. Segundo os autores, o material provoca pouca reação inflamatória e é parcialmente substituído pela síntese de colágeno pelo indivíduo em seis a doze meses.

Remacle et al. (2000) reportam estudo retrospectivo de 45 pacientes com sulco vocal submetidos à dissecação subepitelial da aderência do epitélio e injeção superficial de colágeno bovino. Após um seguimento médio de cinco meses, houve melhora do tempo máximo de fonação (de nove para treze segundos) e melhora em três parâmetros da estroboscopia (simetria, amplitude de vibração e onda mucosa). Os pacientes relataram melhora

subjetiva da qualidade da voz e desaparecimento da fadiga vocal; entretanto permaneceram com a voz rouca e soprosa.

Kriesel et al (2002) realizam estudo histológico em coelhos em que foi provocada uma cicatriz na prega vocal após decorticação da mucosa e dez semanas depois, injetado colágeno homólogo superficialmente. A análise histológica da laringe de coelhos demonstrou matriz de colágeno distribuída ao longo de todas as camadas da lâmina própria e da musculatura. Altas concentrações de procolágeno I foram observadas sugerindo remodelamento tecidual. Os autores sugerem que o colágeno homólogo é um material não-imunogênico, não se incorpora aos tecidos adjacentes e não infiltra as células vizinhas. Concluem que, baseado nos achados histológicos do destino do material, o colágeno autólogo parece ser mais apropriado para injetar no interior do músculo tireoaritenoideo para medialização, do que como uma alternativa para restaurar a matriz extracelular da lamina própria.

Björk et al. (2002) publicam quatro casos de pacientes com fibrose de prega vocal, submetidos à injeção superficial de colágeno bovino (Zyplast®). Os autores relatam melhora da insuficiência glótica e da onda mucosa da corda vocal. Após um período de avaliação que variou de seis a 17 meses, foram medidos o fechamento glótico e a amplitude de vibração. Esta aumentou em três pacientes dos quatro estudados que receberam injeção de colágeno, sugerindo que o colágeno pode ajudar a suavizar a fibrose da prega vocal.

Anderson e Sataloff (2004) publicam o relato de dois casos de

pacientes submetidos à injeção superficial de colágeno bovino que evoluíram com formação de depósitos na submucosa com impacto na vibração das pregas vocais. Os autores resumem os riscos associados à injeção de colágeno bovino: potencial risco de hipersensibilidade e desenvolvimento de doenças autoimunes do tecido conjuntivo e reações locais como formação de granulomas, depósitos e necrose tecidual.

Remacle et al. (1999) relatam sua experiência clínica na utilização de colágeno autólogo ao descrever bons resultados da injeção desse material em 20 casos de insuficiência glótica sendo sete deles causados por fibrose cicatricial.

Remacle e Lawson (2007) enfatizam as vantagens do material: biocompatibilidade e nenhuma reação local ou sistêmica. As desvantagens são as seguintes: difícil obtenção, sendo necessária retirada da pele como fonte de colágeno por pelo menos 45 dias antes da injeção na prega vocal, alto custo, reabsorção em menos de seis meses do material e necessidade de várias injeções.

Outra opção de preenchimento em pregas vocais é a utilização de enxertos autólogos.

Tarhan et al. (2008) consideram que os tecidos autólogos constituem uma boa opção de implante por apresentarem excelente biocompatibilidade, gerando baixo estímulo à resposta imune e baixo risco de infecção e rejeição quando comparado com uso de substâncias aloplásticas ou homólogas. Os autores comparam a cartilagem, a fásia e a gordura após implantação no tecido subcutâneo do dorso de coelhos e realizam estudo histológico em

quatro períodos distintos (um, dois, três e quatro meses) após a cirurgia. Os enxertos foram avaliados quanto ao volume, reabsorção, neovascularização, eosinofilia, e reação de corpo estranho. Todos os tecidos provocam pouca reação inflamatória. A gordura é em grande parte reabsorvida; a cartilagem permanece estável e a fáscia apresenta pouca alteração volumétrica.

Mikus et al. (1995) em estudo com modelo animal com cães, observam que apenas 10-21% do volume inicial de gordura injetado no interior do músculo tireoaritenoideo permanece na prega vocal doze meses após a injeção.

Duprat et al. (2004), em estudo com coelhos, observam que o enxerto de gordura em prega vocal não ocasiona maior reação inflamatória ou fibrose reacional após uma semana, três semanas e três meses do procedimento. Os autores concluem que o enxerto de gordura pode ser considerado um material relativamente seguro para utilização como implante por ter baixa tendência de induzir reação epitelial e pela habilidade em reparar a estrutura histológica da prega vocal.

Kruschewsky et al. (2007) realizam estudo com vinte e quatro cães comparando a absorção da gordura em pregas vocais em três diferentes situações: injeção da gordura abdominal retirada por lipossucção no interior do músculo tireoaritenoideo; injeção de gordura abdominal retirada com lipossucção e injetada no interior no músculo tireoaritenoideo acrescida de insulina; gordura abdominal implantada em bloco. O volume de gordura remanescente foi quantificado por ressonância magnética após três meses e constatou-se perda quase total de todo o material enxertado nas três

situações avaliadas.

Rihkanen (1998) foi o primeiro autor a utilizar a fáschia muscular como alternativa de enxerto autólogo para correção da insuficiência glótica. O autor descreve o uso da fáschia triturada e injetada no músculo vocal em pacientes com paralisia de prega vocal. Frente aos bons resultados clínicos, o mesmo autor (Rihkanen, 1999) descreve os resultados obtidos com dezoito pacientes com diagnóstico de paralisia unilateral de prega vocal, dos quais nove pertenciam ao grupo publicado no ano anterior. A fáschia lata é removida sob anestesia local e cortada em pequenos pedaços. A injeção do material triturada é realizada sob anestesia geral, através de laringoscopia direta e utilização de seringa de Brunning. São escolhidos três ou quatro pontos, sendo o primeiro lateral ao processo vocal e os seguintes lateralmente ao músculo tireoaritenóideo. O autor constata melhora na análise perceptiva e acústica da voz, assim como o tempo máximo de fonação mostrou melhora estatisticamente significativa após seis meses do procedimento.

Reijonen et al. (2001) utilizam a mesma técnica em estudo experimental em nove cães. Após injeção da fáschia lata no interior do músculo vocal, as laringes dos animais foram avaliadas histologicamente em períodos diferentes que variaram de três dias a doze meses. Os autores observam que a fáschia não promove reação inflamatória intensa nem formação de granuloma. O enxerto foi identificado em todos os animais, embora não tenha sido avaliado o rendimento final do enxerto ao longo do tempo.

Rodgers et al. (2001) encontram resultados diferentes em outro estudo experimental ao avaliar o comportamento histológico da fásia lata injetada em pregas vocais de cães. Os animais foram inicialmente submetidos à secção unilateral do nervo laríngeo recorrente e suas laringes retiradas para avaliação histológica após três, cinco, oito, dez e doze meses da enxertia. A fásia não foi encontrada em nenhum dos animais.

Duke et al. (2001) realizam estudo experimental e clínico com injeção de fásia autóloga em oito cães e 40 pacientes. No estudo experimental, comparou o rendimento do enxerto de fásia e gordura e, no estudo clínico, avaliou parâmetros de análise acústica dos pacientes antes e após a enxertia. Concluíram que o rendimento do enxerto de fásia é excelente, embora muito variável e que há melhora clínica após sua utilização em pacientes com insuficiência glótica.

Indorewala (2002) demonstra através de estudo experimental em cães que os enxertos livres de fásia temporal e fásia lata modificam sua estrutura tridimensional durante os cinco primeiros dias após sua enxertia. O tecido foi implantado na região tóraco-abdominal dos animais e seu volume avaliado em dois e cinco dias. Observou-se que tanto a fásia lata como a fásia temporal diminuem sua superfície e espessam. Entretanto, a fásia lata apresenta uma melhor estabilidade tridimensional se comparada com a fásia temporal em que a perda da área e o espessamento são maiores e mais imprevisíveis.

Sataloff (1997b) foi o primeiro autor a relatar o uso de enxertos

autólogos na interior da lâmina própria de pregas vocais. O autor publica os achados preliminares da avaliação de pacientes com disfonia persistente causada por fibrose pós-operatória de prega vocal submetidos a implante de gordura em bloco na porção vibratória da prega vocal. Sua técnica cirúrgica consiste na confecção de um bolsão na mucosa que é preenchido com gordura prevenindo a adesão da mucosa com o ligamento vocal e com a musculatura. Em todos os pacientes há melhora subjetiva da qualidade vocal, melhora do fechamento glótico e melhora da onda mucosa à estroboscopia.

Chan e Titze (1998) avaliam a viscosidade de vários materiais usualmente utilizados em pregas vocais, tais como politetrafluoretileno, colágeno, gelatina absorvível e gordura abdominal e demonstram que a gordura é o material com menor viscosidade dinâmica, sugerindo ser o material mais apropriado para uso em pregas vocais.

Woo et al. (1999) realizam estudo experimental em seis cães submetidos à implantação de gordura dentro do espaço de Reinke. Após seis semanas da implantação endoscópica da gordura da mucosa jugal em bolsão realizado na submucosa da prega vocal, as laringes foram retiradas e submetidas à análise histológica. A vibração cordal foi avaliada por estroboscopia. Em todas as peças foram identificadas células fibrosas e tecido cicatricial no plano submucoso. Segundo os autores, as células adiposas aumentam o volume do espaço de Reinke, constituindo uma útil ferramenta para restauração do mesmo, podendo ser aplicado em pacientes com fibrose cicatricial, sulco vocal e atrofia. Houve melhora em todos os

animais dos parâmetros da estroboscopia.

Neuenschwander et al. (2001) revisam os resultados pós-operatórios de oito pacientes submetidos a implante de gordura em pregas vocais fibrosadas, sob a luz da análise perceptiva da voz e estroboscopia e encontram resultados semelhantes ao de Sataloff (1997b) com melhora da qualidade vocal, do fechamento glótico, onda mucosa e rigidez. Não há melhora significativa da extensão da fibrose.

Contrariando a maioria dos autores que utilizam a fáschia no interior do músculo vocal ou no espaço paraglótico para tratamento da insuficiência glótica, Tsunoda et al. (1999) introduzem o uso da fáschia temporal no interior do espaço de Reinke para correção da insuficiência glótica causada pelo sulco vocal. A técnica descrita consiste em três etapas básicas: confecção de um bolsão entre o epitélio e o ligamento vocal, através da dissecação minuciosa da aderência entre os dois planos; preparação da fáschia temporal e implantação do enxerto no interior do bolsão criado. Os resultados dessa técnica foram descritos pelo mesmo grupo em dois pacientes (Tsunoda et al., 2000) e posteriormente ampliado para quinze casos (Tsunoda et al., 2001). Nos dois artigos, os autores avaliam o seguimento dos pacientes, com tempo médio de observação de um ano, demonstrando melhora gradual a partir do terceiro mês, do fechamento glótico e da onda mucosa em todos os pacientes.

Carneiro et al. (2005), em estudo experimental, avaliam a deposição de colágeno na prega vocal de coelhos comparando enxerto de fáschia muscular, enxerto de gordura e grupo controle (submetidos à manipulação

cirúrgica, sem a colocação do enxerto) aos três e seis meses pós-operatórios. As lâminas foram avaliadas pelo método Picrossírius-polarização e a densidade de colágeno quantificada através de programa de análise de imagens. Nesse estudo, observou-se uma maior deposição de colágeno no grupo da fáschia aos três e seis meses quando comparado com o grupo da gordura e com o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de três meses e seis meses, para o grupo da gordura, fáschia e controle. Outro fato observado foi que a fáschia era envolvida como uma peça única de colágeno distribuído em fuso e no grupo da gordura, o colágeno envolveu o implante em vários blocos distintos, tendo uma distribuição em “rede”. Os autores concluem que a gordura provoca maior fibrose quando implantada na submucosa da prega vocal de coelhos quando comparada ao implante de fáschia muscular.

Utilizando os mesmos animais, Murta (2005) compara a reação inflamatória causada pela enxertia de gordura, fáschia muscular e manipulação cirúrgica em pregas vocais de coelhos. O autor encontra uma maior reação inflamatória nas pregas vocais submetidas à enxertia quando comparadas ao grupo controle, apenas manipulado, sendo mais evidente no grupo da gordura. Na avaliação aos seis meses, não houve diferença significativa entre os grupos, ou seja, a reação inflamatória foi semelhante nos grupos enxertados e no grupo controle.

Perazzo (2007) realiza estudo experimental em 10 porcos para avaliar a utilização de enxerto combinado de fáschia cervical autóloga associada à gordura no espaço de Reinke. Os animais foram avaliados em três períodos

distintos: uma semana, um, três, quatro e seis meses. O exame microscópico mostrou que em cinco animais o enxerto encontrava-se lateralizado, justa-musculares, em três animais na submucosa e em dois animais o enxerto não foi encontrado. O tecido provocou pouca reação inflamatória, que apesar de aumentar na primeira semana para o primeiro mês, reduziu-se drasticamente nos meses subsequentes, não sendo encontrada proliferação do tecido fibroso.

O tecido areolar perifascial foi utilizado primeiramente na Cirurgia Plástica como opção de enxerto em locais que necessitam de mobilidade. Clodius (2001) utiliza o implante do tecido areolar da fáscia lata para correção de cicatriz extensa e aderida à musculatura da coxa causada por queimadura térmica, que impedia o deslizamento da pele e subcutâneo, restringindo o movimento da perna. O autor descreve o enxerto como um tecido areolar frouxo, vascularizado e com propriedades de deslizamento, sendo um material ideal para ser utilizado como enxerto livre para locais que necessitem de mobilidade da pele como as articulações.

Segundo Kouraba et al. (2003), o enxerto de tecido areolar perifascial fornece uma durável e fina cobertura para ossos e tendões expostos, fornecendo capacidade de deslizamento e leito vascularizado para posterior enxerto de pele.

Wiikmann et al. (2008) apresentam resultados preliminares da comparação da viscosidade dinâmica da camada superficial da fáscia temporal com outros tecidos biológicos tradicionalmente utilizados em implantes para tratamento da rigidez de pregas vocais. Os autores

demonstram que a camada superficial da fáscia temporal é o material que apresenta a menor viscosidade dinâmica seguida da camada profunda da fáscia temporal, prega vocal intacta e, por último, a gordura.

Costa et al. (2008) apresentam resultado da avaliação prospectiva da análise acústica e perceptiva auditiva da voz nos pré e pós-operatório de pacientes com sulco vocal estria maior submetidos a implante de pré-fáscia do músculo temporal. Três fonoaudiólogas experientes avaliaram amostras da voz de nove pacientes baseando-se em sete parâmetros: grau de disfonia, rouquidão, sopro, aspereza, tensão, frequência fundamental e tempo máximo de fonação. Em comparação com o pré-operatório, as amostras obtidas dos pacientes no pós-operatório mostraram melhora estatisticamente significativa apenas da sopro e uma tendência da frequência fundamental tornar-se mais grave e aumento do tempo máximo de fonação, embora estatisticamente não significativo.

### **3.6 Histomorfometria do colágeno pelo método de Picrossírius-polarização**

O método de Picrossírius-polarização é específico para identificação das fibras de colágeno que, por serem ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente com o Sírius-red, que é um corante ácido (Montes e Junqueira, 1982). Essa reação promove um aumento da birrefringência normal, que é específica das fibras de colágeno, compostas por moléculas orientadas. Isso ocorre porque as moléculas do corante ficam alinhadas em

paralelo com o eixo longo de cada molécula. Apesar de o corante ligar-se inespecificamente aos componentes de caráter catiônico dos tecidos, o fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com as cadeias de colágeno.

Estudos de Hirshberg et al. (1996, 1999) e Dayan et al. (1989) sugerem que as cores da birrefringência das fibras colágenas são determinadas não apenas pela espessura das fibras, mas também pelo seu arranjo estrutural tridimensional. Segundo os autores, as fibras esverdeadas correspondem a fibras finas, esparsamente arranjadas enquanto que fibras amarelas correspondem a fibras grossas, densamente empacotadas.

Rabau e Dayan (1994) sugerem que as diferentes birrefringências observadas pelo método de Picrossírius-polarização permitem avaliar a fase do processo cicatricial, em que o colágeno encontra-se esverdeado ou amarelo-esverdeado, em fase de cicatrização inicial, e altamente birrefringente na cor laranja ou vermelha em processo fibrótico inativo.

Montes et al. (1996) enfatizam as diferenças de birrefringências, dependendo do tipo de colágeno quando coradas pelo Sírius-red e avaliadas no microscópio com polarização. Sugerem que as fibras colágenas tipo I correspondem a fibras grossas, fortemente birrefringentes, de coloração amarela ou vermelha enquanto as fibras colágenas tipo III aparecem como fibras esverdeadas, finas e pouco birrefringentes. As fibras tipo II têm padrão de birrefringência mais fraco ainda.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sob o protocolo 1017/05.

Foram utilizados 30 coelhos albinos da raça Nova Zelândia (massa corporal entre 2800g e 3800g), todos machos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP (Protocolo N<sup>o</sup> DTAEP 096/51). Os animais foram operados no Laboratório de Investigações Médicas - LIM 32, pertencente à Disciplina de Otorrinolaringologia do Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia do HCFMUSP, seguindo normas éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada à International Council for Laboratory Animal Science e à Lei Federal 6.638.

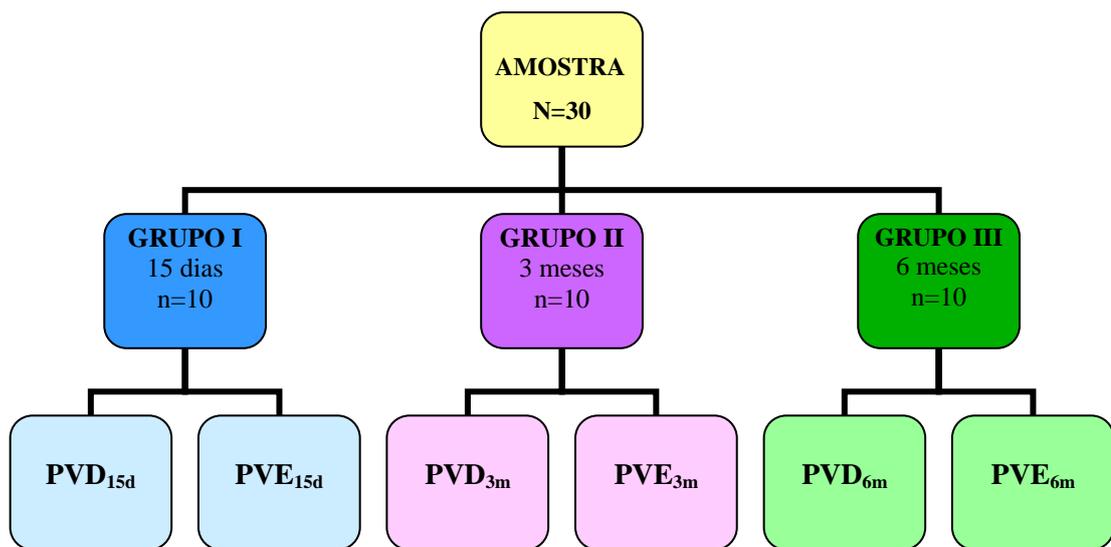
Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, que consistiu na realização de laringofissura com confecção de bolsão em ambas as pregas vocais conforme técnica descrita por Carneiro et al. (2005). Na prega vocal direita, foi realizado o bolsão e colocado o enxerto do tecido areolar perifascial (TAP) e na prega vocal esquerda foi realizada apenas a manipulação cirúrgica.

Através de um sorteio realizado antes do procedimento, os animais foram alocados em três diferentes grupos, diferindo apenas no tempo de sacrifício, conforme esquema abaixo (Quadro 1). Cada grupo foi composto por dez animais

GRUPO I: animais sacrificados no 15<sup>o</sup> dia do procedimento

GRUPO II: animais sacrificados aos três meses do procedimento

GRUPO III: animais sacrificados aos seis meses do procedimento



**Quadro 1** – Organograma mostrando esquematicamente a divisão da amostra inicial dos animais nos diferentes grupos de estudo. Grupo I – animais sacrificados aos 15 dias do procedimento; Grupo II – animais sacrificados aos três meses do procedimento; Grupo III – animais sacrificados aos seis meses do procedimento; PVD – prega vocal direita; PVE - prega vocal esquerda.

Ao retirar o TAP dos dez primeiros animais operados para enxertia, foram separadas amostras desse tecido para confecção das lâminas histológicas. Esse grupo constitui o grupo controle do enxerto, que foi comparado com o tecido enxertado nas pregas vocais direitas dos animais de 15 dias, três meses e seis meses.

#### **4.1 Procedimento pré-operatório**

Os animais foram mantidos em jejum por três horas antes do procedimento cirúrgico. No Biotério, os animais foram pesados e identificados com tatuagem na pele da orelha direita.

#### **4.2 Anestesia**

Após transporte do Biotério para o LIM-32 em caixas individuais, os animais foram sedados com xilazina (5mg/kg) e quetamina (50mg/kg) intramuscular. Não houve necessidade de ventilação mecânica.

Verificada a sedação do animal, foi realizada antibioticoterapia profilática com benzilpenicilina procaína 300.000UI e benzilpenicilina potássica 100.000 UI diluídas em 3mL de água destilada e aplicados 0,4mL, por dose, via intramuscular.

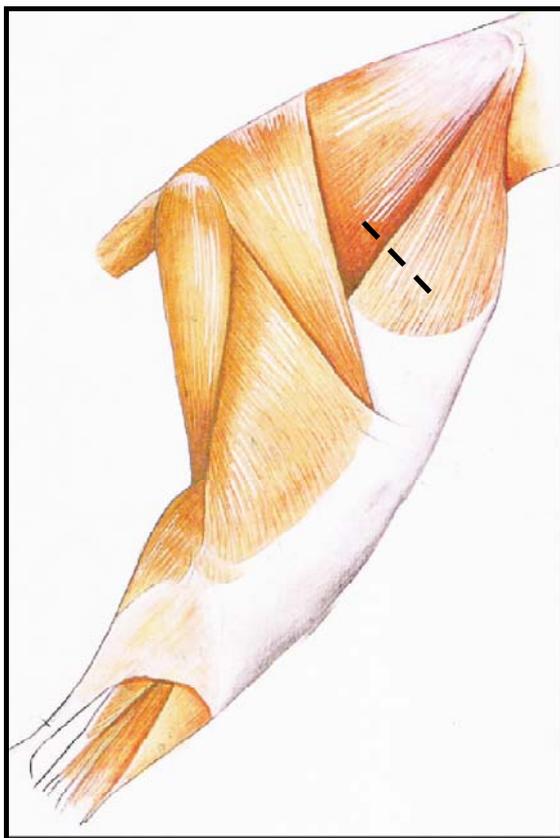
Procedeu-se a tricotomia em dois locais: na região cervical anterior,

desde a mandíbula até a fúrcula e na região lateral da coxa direita. O animal foi posicionado em decúbito dorsal, em extensão cervical e fixação das patas dianteiras. Realizou-se antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I solução alcoólica) a 10% e colocados campos esterilizados.

### **4.3 Procedimento cirúrgico**

#### **4.3.1 Obtenção do enxerto**

O primeiro passo do procedimento cirúrgico consistiu na realização de uma incisão de 2cm na face lateral da coxa e afastamento da pele e subcutâneo até exposição da fáscia lata (Figura 5). Sua camada superficial, mais frouxa e não aderida ao plano muscular, foi dissecada cuidadosamente, retirada com aproximadamente 1cm<sup>2</sup> e imersa em soro fisiológico (Figura 6). Depois de verificada a hemostasia, a pele foi suturada com dois pontos simples com fio de Nylon 4.0.



**Figura 5** - Fotomicrografia da anatomia da face lateral do membro inferior direito do coelho. A linha pontilhada mostra o local onde é retirado o tecido areolar perifascial da fáscia lata (*Fonte: Popesko et al., 2003*).



**Figura 6** - Amostra do enxerto logo após sua retirada.

### 4.3.2 Laringofissura e inserção do enxerto

Os passos seguintes do procedimento cirúrgico seguiram a descrição de Carneiro et al. (2005) e está ilustrado na Figura 7.

Após palpação externa da cartilagem tireoidea e cricoidea, foi feita incisão cervical vertical na linha média, com aproximadamente 2cm de comprimento, a partir da margem superior da cartilagem tireoidea até a borda inferior da cartilagem cricoidea, com bisturi lâmina 15, incisando-se a pele e tecido celular subcutâneo, e realizada dissecação por planos até a exposição das cartilagens supra-citadas.

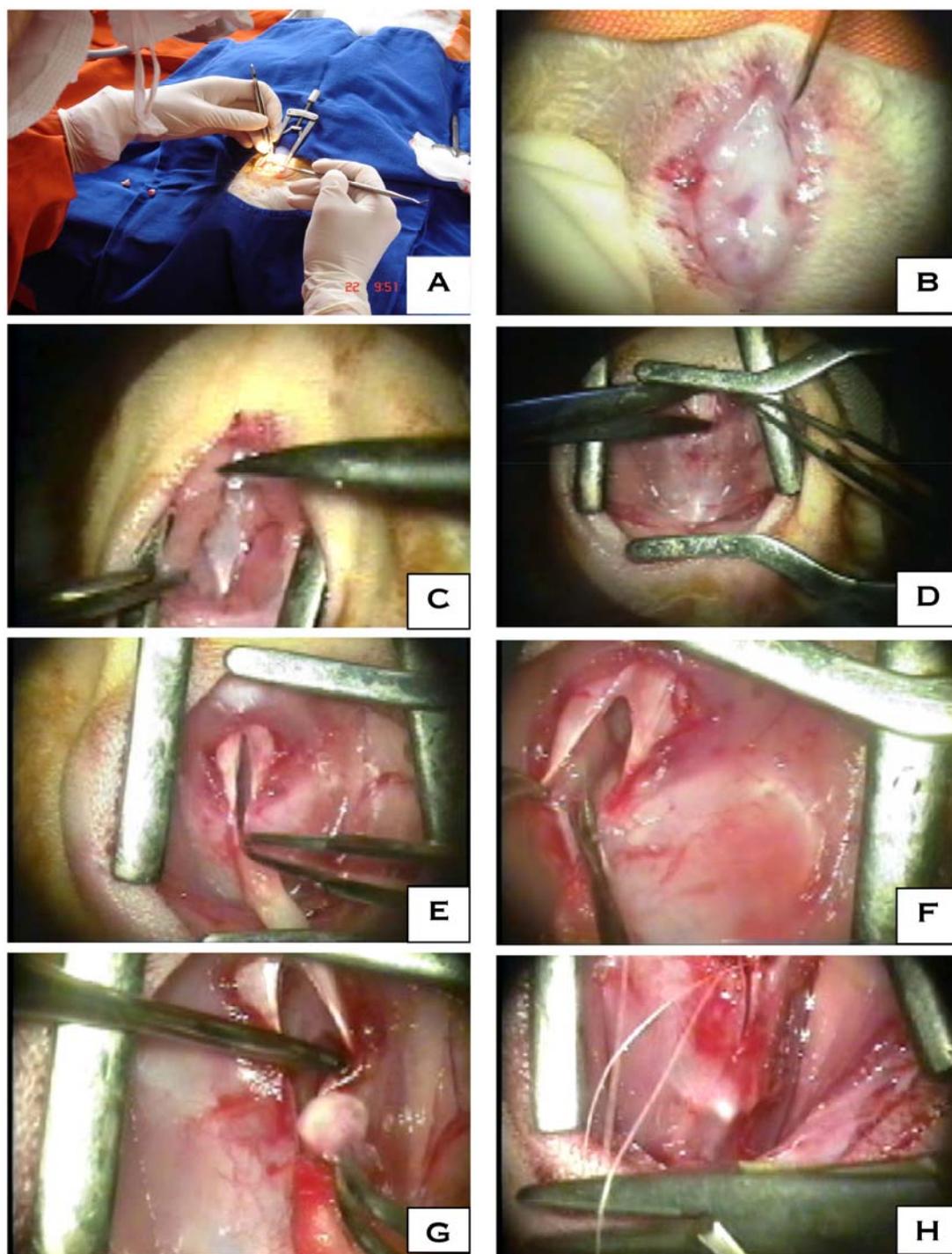
Com auxílio de microscópio cirúrgico Inami modelo I 860 (lente de 200 mm, binocular angulada, ocular de 12,5X, iluminação por fibra óptica e fonte de luz halógena de 15V e 150W) (Inami & Co, Tokyo, Japan), a membrana cricotireoidea foi seccionada na linha média, com bisturi lâmina 11, permitindo a visualização da subglote. Seguiu-se a incisão na linha média da cartilagem tireoidea, permitindo a visualização das pregas vocais. Uma lesão longitudinal de 3mm de extensão no terço médio do bordo livre da prega vocal direita foi realizada com esculpador Hollembach 3s, estilete empregado em odontologia.

Dessa forma, um bolsão na direção do eixo longitudinal da prega vocal, utilizando o músculo tireoaritenóideo como principal referência, foi confeccionado e o enxerto, com aproximadamente 2mm de diâmetro e 1mm de espessura foi acomodado dentro desse bolsão. O enxerto não foi fixado com cola de fibrina ou sutura e permaneceu na posição pela diferença de tamanho da abertura do bolsão e o tamanho do enxerto. A Figura 8 mostra

esquemáticamente a confecção do bolsão e a localização do enxerto na prega vocal direita.

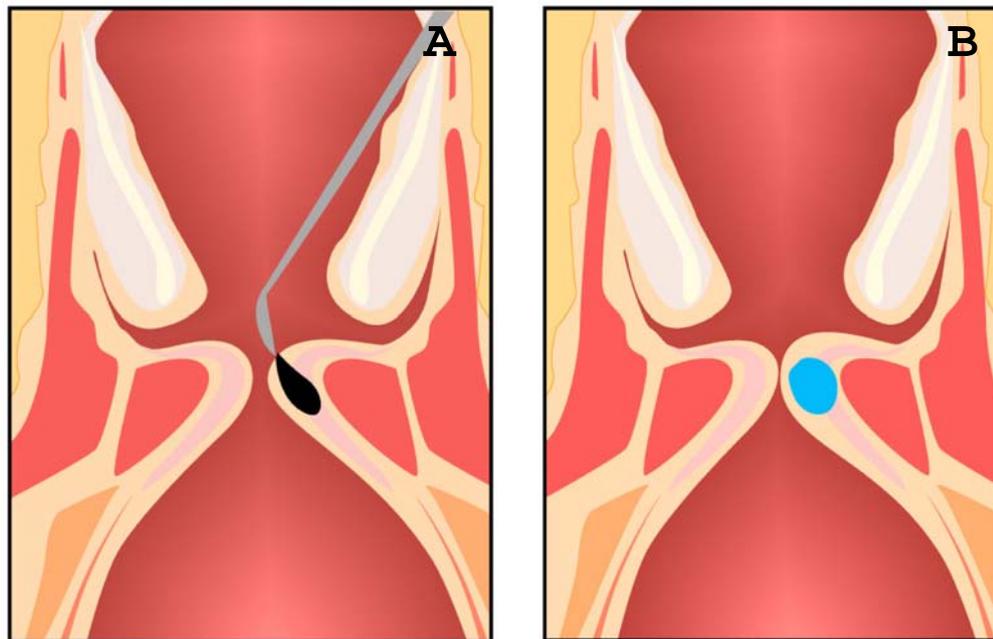
O mesmo procedimento foi realizado na prega vocal esquerda, com exceção da colocação do enxerto.

A cartilagem tireoidea, a membrana cricotireoidea, a musculatura pré-laríngea e tecido subcutâneo foram aproximados com pontos separados de fio Vicryl<sup>®</sup> (poliglactina 910) 5.0 (Ethicon, Inc. Johnson & Johnson, Sommerville, New Jersey, Estados Unidos). A pele foi suturada com pontos simples de fio Ethilon (Nylon 6) 5.0 (Ethicon, Inc. Johnson & Johnson, Sommerville, New Jersey, Estados Unidos).



**Passos do Procedimento Cirúrgico.** A-Posição cirúrgica. B-Incisão da pele e subcutâneo. C- Dissecção da musculatura pré-tireoideana. D-Abertura da membrana cricotireoidea. E-Laringofissura e hemostasia com algodão com adrenalina. F-Confecção de bolsão com estilete Hollemback 3s na prega vocal esquerda. G- Confecção de bolsão na prega vocal direita e colocação do enxerto. H-Fechamento da cartilagem tireoidea.

**Figura 7-** Etapas do Procedimento Cirúrgico



**Figura 8** - Figura esquemática da enxertia do TAP na prega vocal direita: (A) confecção do bolsão (em preto) e (B) localização do enxerto na lâmina própria (em azul).

#### 4.4 Procedimento pós-operatório

Terminado o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram no LIM-32 sob os cuidados do pesquisador por pelo menos 1 hora, para recuperação anestésica.

Os animais foram transportados para o Biotério, alojados em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum* e observados pelo técnico responsável pelo setor.

Durante os primeiros sete dias pós-operatórios, foi realizada antibioticoterapia profilática com eurofloxacina 10mg/kg intramuscular, em

dose única diária e avaliada a ferida pós-operatória, observando a presença de complicações locais.

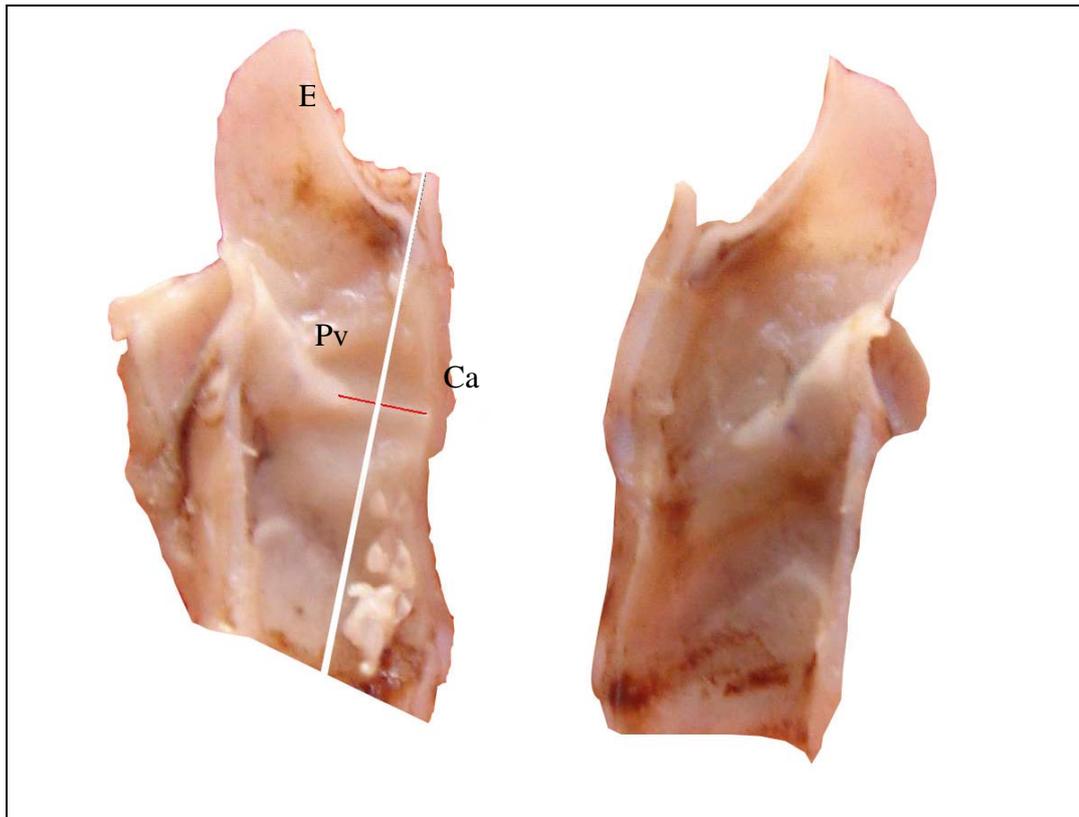
#### **4.5 Eutanásia dos animais e isolamento da laringe**

Tendo alcançado o tempo de observação a que foram alocados, os animais foram anestesiados com xilazina 50mg/kg e sacrificados com injeção endovenosa de cloreto de potássio (KCl).

A laringe foi retirada em bloco, desde a base da língua até o quinto ou sexto anel traqueal, e a peça foi dissecada cuidadosamente, retirando-se a musculatura extrínseca, esôfago e partes moles adjacentes para isolamento do arcabouço laríngeo.

A laringe foi dividida em duas partes através de uma incisão longitudinal posterior, entre as cartilagens aritenoideas, e uma incisão anterior, mediana. Em cada hemilaringe, a prega vocal, o ventrículo, a cartilagem tireoidea, as aritenoides e a cricoide podiam ser identificados.

Cada hemilaringe foi seccionada por incisão transversal no ponto médio do comprimento da prega vocal, entre a comissura anterior e o processo vocal, perpendicular ao bordo livre da prega vocal, resultando em duas peças, correspondentes à porção anterior da prega vocal e à porção posterior da prega vocal (Figura 9).



**Figura 9** - Fotomicrografia da laringe do coelho dividida em duas hemilaringes. A linha vermelha marca o nível da prega vocal. A hemilaringe esquerda foi subdividida em duas partes por uma incisão transversal, perpendicular ao eixo longitudinal da prega vocal, originando uma porção anterior e outra posterior que foram incluídas no bloco de parafina para confecção das lâminas. E -epiglote; Pv - Processo vocal; Ca -Comissura anterior.

#### 4.6 Análise histológica

As amostras do enxerto e as peças referentes às pregas vocais foram fixadas em formol a 10%, identificadas e encaminhadas para o Laboratório de Anatomia Patológica da FMUSP para processamento. Após a fixação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (75%-100%) e xilol e incluído em parafina, como procedimentos histológicos de rotina.

As amostras do enxerto foram incluídas em blocos de parafina e realizados cortes transversais seguindo o maior eixo do tecido. Foram realizados cortes de 5µm e confeccionadas 2 lâminas para cada amostra, uma para coloração hematoxilina-eosina (HE) e outra para coloração com Sírius-red.

As peças correspondentes às metades anteriores e posteriores de cada prega vocal foram incluídas em blocos de parafina, de modo que a face medial da prega vocal fosse a área de interesse para confecção das lâminas. Foram realizados cortes de 5µm.

Para cada bloco, eram obtidos inicialmente duas lâminas, uma para coloração em HE e outra para o Sírius-red. Deste modo, para cada prega vocal eram confeccionadas quatro lâminas, duas referentes à porção anterior da prega vocal e duas referentes à porção posterior.

Embora os dois blocos confeccionados representassem a mesma região da prega vocal, optou-se pela divisão da hemilaringe em duas peças diferentes para minimizar o risco de exclusão de um dos animais do estudo por problemas técnicos durante a confecção das lâminas.

Quando não foi encontrado o enxerto nas pregas vocais enxertadas, os cortes foram aprofundados anteriormente, na direção da comissura anterior e posteriormente, na direção do processo vocal, em cortes de 5 $\mu$ m até a visualização do enxerto ou fim da peça.

Analogamente, quando não era encontrada a cicatriz causada pela manipulação cirúrgica da prega vocal esquerda, os cortes eram aprofundados até a obtenção de uma lâmina representativa da lesão tecidual.

#### **4.6.1 Técnica da hematoxilina-eosina e avaliação do processo inflamatório**

As lâminas coradas com HE foram utilizadas para avaliar e comparar, através da análise semiquantitativa, o infiltrado inflamatório das pregas vocais enxertadas com a prega vocal controle. Para cada animal foi escolhida a lâmina mais representativa, em que era possível reconhecer o epitélio, a lâmina própria, a musculatura, a cicatriz cirúrgica na prega vocal controle e o enxerto na prega vocal enxertada. Dois pesquisadores analisaram independentemente todas as lâminas sem ter conhecimento do grupo que cada corte histológico representava e classificaram o infiltrado inflamatório em conformidade com a seguinte divisão: (i) ausência de reação inflamatória; (ii) leve infiltrado inflamatório (menos de 25% células inflamatórias na totalidade do tecido examinado); (iii) moderado infiltrado inflamatório (entre 25 a 50% de células inflamatórias na totalidade do tecido examinado) e (iv) infiltrado inflamatório acentuado (mais de 50% de células

inflamatórias na totalidade do tecido examinado). Quando houve discordância entre os pesquisadores a respeito da categoria alocada em determinada lâmina, a mesma era revista em conjunto para definição final.

#### **4.6.2 Histomorfometria do colágeno**

As lâminas coradas com o Sírius-red foram utilizadas para quantificação das fibras colágenas no interior do enxerto antes da sua enxertia e após sua implantação na prega vocal direita nos diferentes tempos de observação. Além disso, foram quantificadas as fibras colágenas ao redor do enxerto nas pregas vocais enxertadas e na cicatriz da manipulação cirúrgica na pregas do grupo controle para posterior comparação entre si.

A coloração das fibras colágenas foi efetuada segundo a técnica de Picrossírius sem hematoxilina, permitindo sua quantificação. Utilizou-se uma solução de Sírius-red 0,2% (Direct Red 80, CI 35780, Wisconsin, Estados Unidos), dissolvido em conteúdo aquoso saturado por ácido pícrico.

A acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de Picrossírius polarização é específica para estruturas de colágenas compostas por moléculas orientadas. Além de evidenciar as fibras de colágeno, essa coloração permite caracterizá-las grosseiramente em fibras laranja-avermelhadas (grossas) e amarelo-esverdeadas (finas) segundo a tonalidade de birrefringência quando analisadas sob luz polarizada e observadas através de um analisador de imagens acoplado a um microscópio óptico.

O sistema utilizado consistiu de uma câmera Olympus DX5 (Olympus Imaging Corp, Tokyo, Japão) acoplada a um microscópio Olympus BX 45 (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japão), a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor e capturadas. Através de um sistema digital inserido no computador (Pentium 1330MHz), as imagens foram processadas pelo *software* Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

A análise das lâminas foi realizada pelo pesquisador responsável pelo estudo que tinha conhecimento do grupo de estudo (PVE, PVD e enxerto), mas desconhecia o tempo de observação (15 dias, três meses ou seis meses).

O cálculo da área das fibras, em micrômetros quadrados, foi dado através do reconhecimento das frequências de luz correspondentes às fibras de colágeno birrefringentes. Foram determinados padrões de frequências de luz para identificação das fibras amarelo-esverdeadas e das fibras laranja-avermelhadas e utilizados o mesmo padrão de cores para todas as lâminas observadas. As lâminas do enxerto, da PVD e PVE foram avaliadas em aumento de 400X.

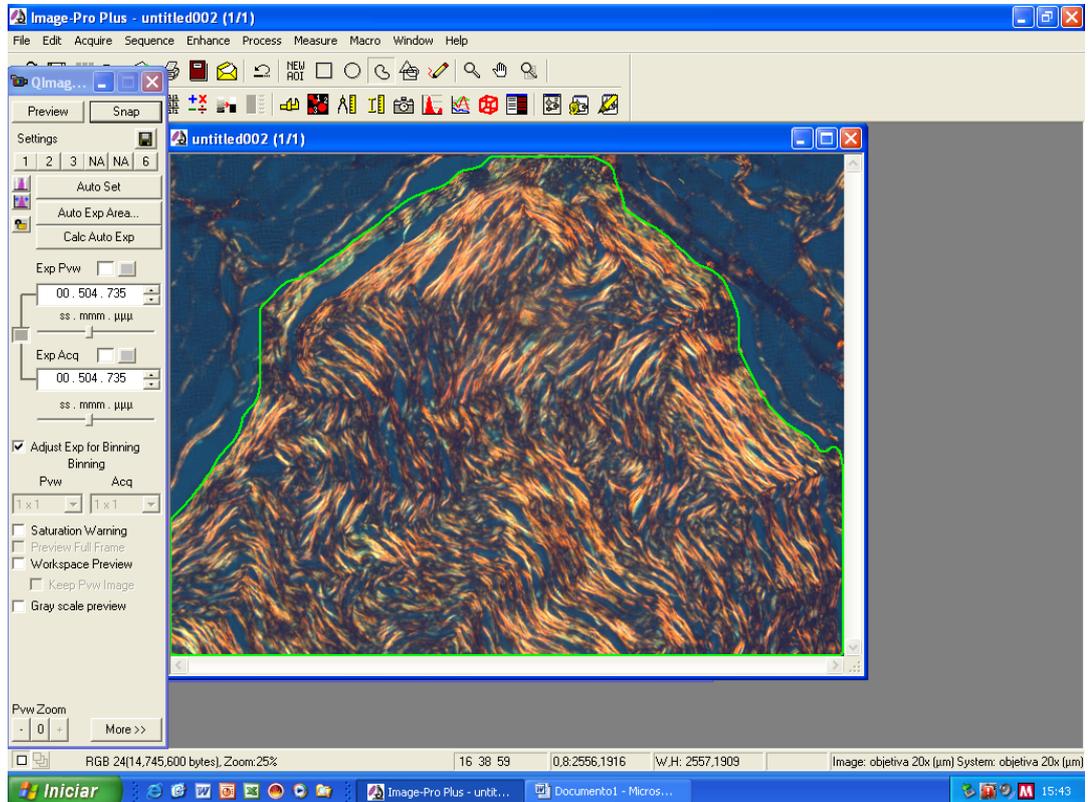
Inicialmente foi realizada a quantificação das fibras colágenas das amostras do TAP antes da sua enxertia e calculada a proporção correspondente às fibras colágenas amarelo-esverdeadas e laranja-avermelhadas conforme o grau de birrefringência.

O segundo passo consistiu na quantificação do enxerto dentro da prega vocal enxertada. Para isso, foram analisadas as lâminas referentes às

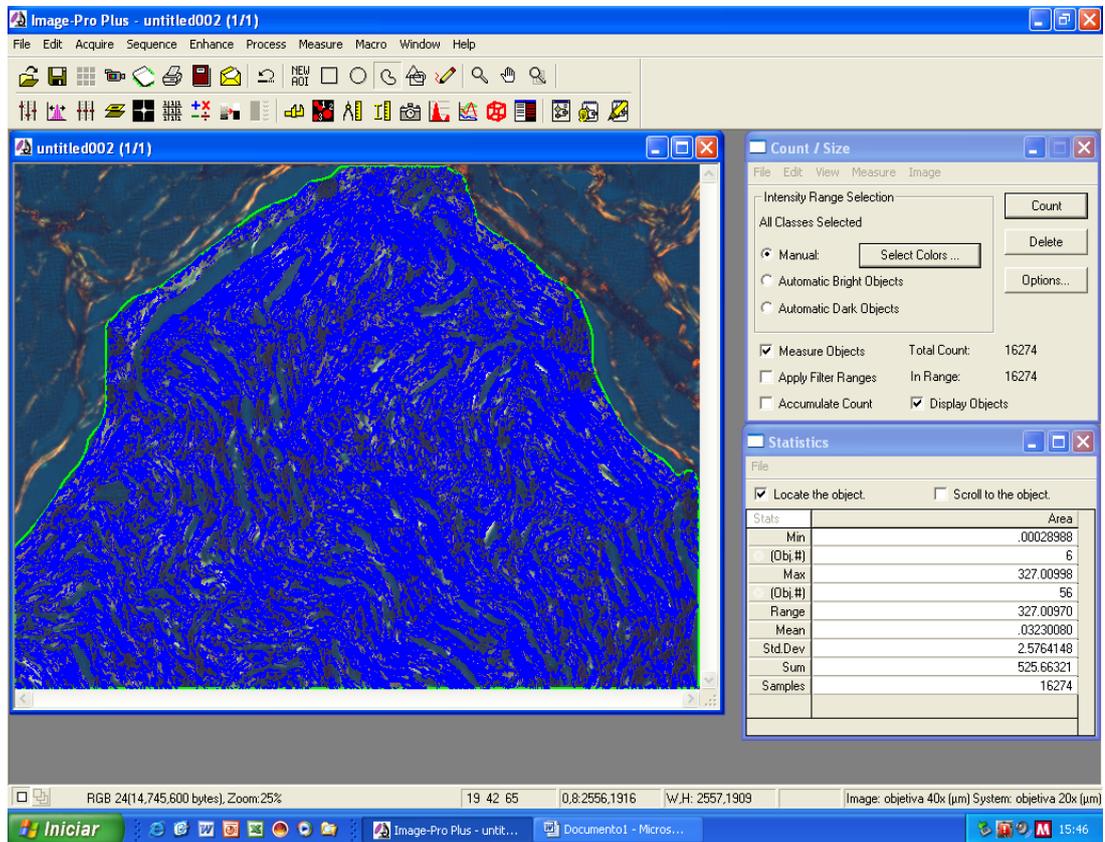
pregas vocais direitas. As Figuras 10 a 13 mostram as etapas seguidas no analisador de imagem para quantificação das fibras no interior enxerto implantado na prega vocal direita de um dos animais do grupo de seis meses.

Inicialmente, a área ocupada pelo enxerto era delimitada (Figura 10). Seguiu-se identificação e cálculo da área ocupada pelas fibras laranja-avermelhadas através de um padrão de cores previamente padronizado (Figura 11). Da mesma maneira, era medida a área ocupada pelas fibras amarelo-esverdeadas (Figura 12). Para cálculo da proporção ocupada pelas fibras era necessário o cálculo da área total ocupada pelo enxerto (Figura 13). Para as lâminas do enxerto, tecido original e após sua implantação, foi calculado o número de campos suficientes que cobrissem toda a área do enxerto, que variou de sete a dez campos.

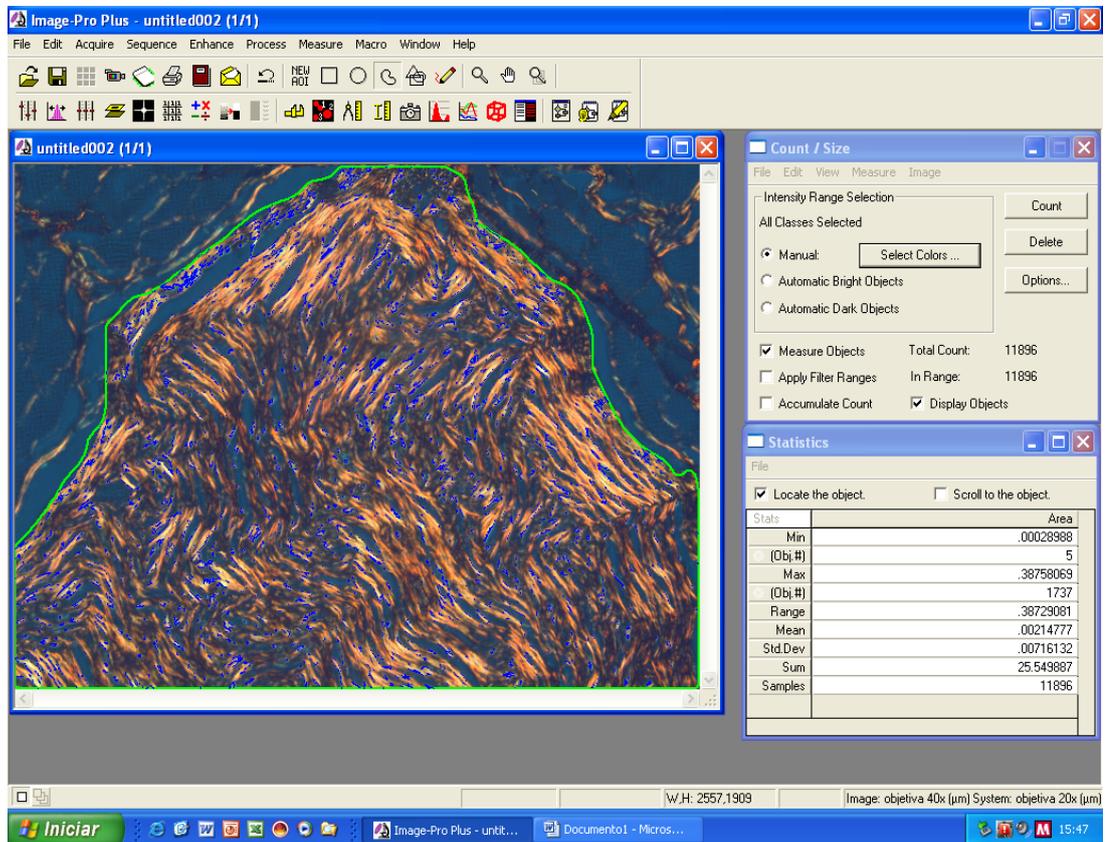
O resultado da quantificação de fibras de colágeno expressa a fração ocupada pelas fibras por unidade de área medida.



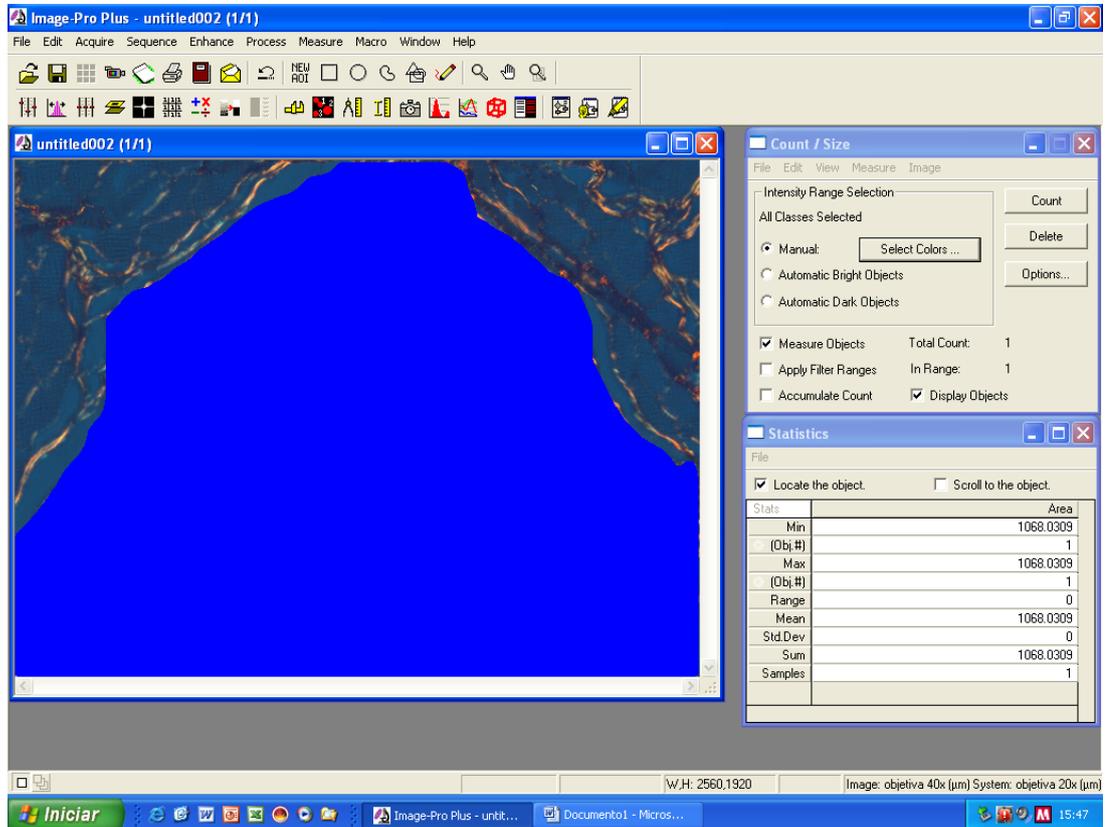
**Figura 10** - Imagem capturada no monitor mostrando corte histológico do enxerto na prega vocal direita em aumento de 400X, avaliado no analisador de imagem Image Pro-Plus 6.0. A linha verde delimita a área de interesse para quantificação das fibras.



**Figura 11** - Imagem capturada mostrando corte histológico do enxerto em aumento de 400X. Através do programa de análise de imagem, a área ocupada pelas fibras colágenas laranja-avermelhadas é identificada pelo analisador de imagens a partir de um padrão de cores previamente padronizado pelo pesquisador, identificadas na figura em azul. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em  $\mu\text{m}^2$ .



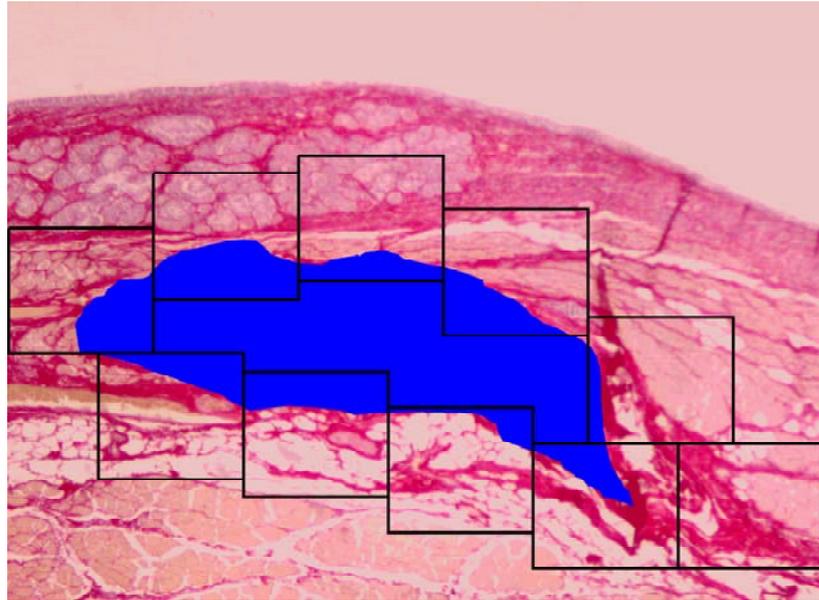
**Figura 12** - Imagem obtida no monitor mostrando o sistema de análise digital. A área ocupada pelas fibras colágenas amarelo-esverdeadas é identificada pelo programa a partir de um padrão de cores previamente padronizado pelo pesquisador, identificadas em azul. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em  $\mu\text{m}^2$ .



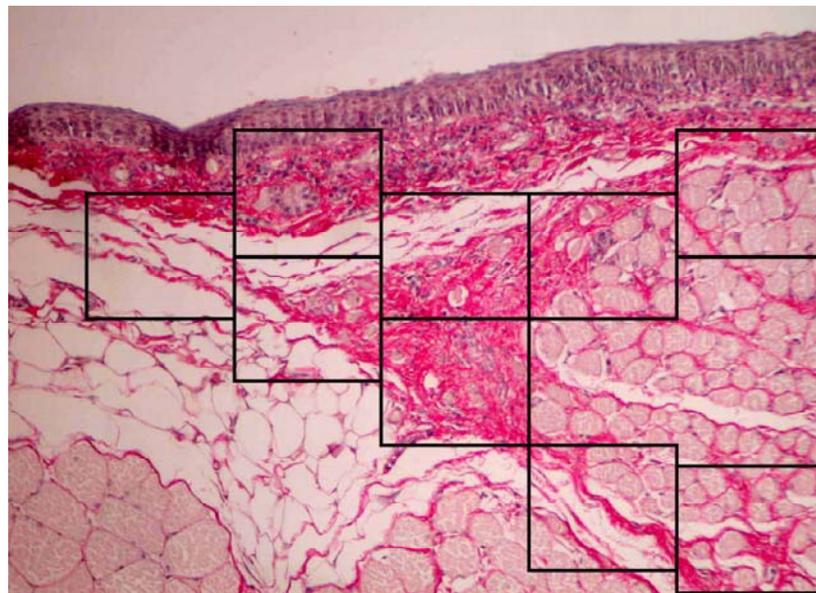
**Figura 13** - Imagem obtida no monitor mostrando corte histológico do enxerto em aumento de 400X avaliado no sistema de análise digital. O pesquisador calcula a área total ocupada pelo enxerto identificada em azul, para posterior cálculo da densidade ocupada pelas fibras. O programa fornece a área ocupada pelas fibras em  $\mu\text{m}^2$ .

Uma vez obtidos os dados referentes ao enxerto, foi quantificada a concentração de fibras colágenas ao redor deste nas pregas vocais direitas. Para isso, foram calculados 10 campos escolhidos aleatoriamente, na região adjacente ao enxerto. Primeiramente, o examinador escolhia a lâmina mais representativa em que era possível identificar o enxerto. Para o cálculo, opostamente ao que foi realizado na análise das fibras no interior do enxerto, foi excluída a área do enxerto (Figura 14), sendo considerada a área de interesse, a área ao redor. Foi calculada a área ocupada pelas fibras colágenas, sem distinção da cor das fibras.

O ultimo passo consistiu na quantificação do colágeno presente na lesão tecidual provocada pela manipulação cirúrgica da prega vocal esquerda. Após escolha da lâmina mais representativa, foram calculados 10 campos, escolhidos aleatoriamente, onde era possível reconhecer a cicatriz. Assim como na prega vocal direita, a área ocupada pelas fibras colágenas foi calculada, sem distinção da cor das fibras (Figura 15).



**Figura 14** - Fotomicrografia de corte histológico da prega vocal direita em mostrando o enxerto e a cicatriz peri-enxerto. A área em azul corresponde ao enxerto que foi excluído da análise. Os dez quadriláteros ao redor do enxerto representam, esquematicamente, os locais de escolha para quantificação da densidade de colágeno da prega vocal direita. Picrosirius visualizado sob luz convencional 100X.



**Figura 15** - Fotomicrografia mostrando corte histológico da prega vocal esquerda mostrando a cicatriz provocada pela confecção do bolsão. Os dez quadriláteros escolhidos aleatoriamente em preto representam esquematicamente os locais de escolha para quantificação da densidade de colágeno realizada através de programa de análise de imagem em aumento de 400X. Picrosirius visualizado sob luz convencional 100 X.

#### 4.7 Análise estatística

Os resultados das variáveis paramétricas foram expressos em tabelas, com média e desvio-padrão, e para as variáveis não-paramétricas, calcularam-se as frequências e respectivos percentuais. Tanto os resultados descritivos como os analíticos foram obtidos por meio do uso do programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) em sua versão 10.0.

Primeiramente, foi aplicado o *Teste de Kolmogórov-Smírnov*, para testar a normalidade dos dados das variáveis paramétricas (Anexo A). O grau de infiltrado inflamatório foi caracterizado como variável categórica ordinal. As quantidades de fibras de colágeno nas pregas vocais e no interior do enxerto foram classificadas como variáveis numéricas contínuas com distribuição simétrica.

A comparação entre os diversos grupos foi feita por meio da aplicação da *Análise de Variância*, controlada pelo *Teste de Levene para Homogeneidade de Variâncias*, com um fator para as variáveis numéricas, complementada com o *Teste de Bonferroni*, quando as variâncias foram homogêneas, e com o *Teste de Dunnett*, quando as variâncias foram não-homogêneas. As variáveis categóricas foram analisadas pelo *Teste de Qui-quadrado*.

Para comparar as variáveis paramétricas entre a prega vocal direita e esquerda foi utilizado o *Teste t de Student*, e o *Teste de Qui-quadrado*, para as variáveis não-paramétricas.

Na determinação dos valores de significâncias calculadas ( $p$ ), foi assumida uma distribuição bicaudal, para as variáveis paramétricas, e unicaudal para as variáveis não-paramétricas, por considerar que o efeito do procedimento cirúrgico sobre a reação inflamatória produziria apenas um sentido de evolução sobre essa variável. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, com nível de significância de  $\alpha = 0,050$ .

## 5 RESULTADOS

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características dos animais**

Os dados referentes aos animais incluídos no estudo estão expostos no Anexo B. Todos os animais incluídos no estudo pertenciam ao sexo masculino. A massa corporal média foi de 3260g (DP=273,67g).

Da amostra inicial de trinta animais, dois animais morreram por desidratação decorrentes de diarreia aguda, antes de completarem o período de observação a que foram inicialmente alocados (Coelho 1, Grupo I; Coelho 29, Grupo II) e dois animais foram sacrificados devido à abscesso cervical (Coelho 8, Grupo III; Coelho 16, Grupo I). Estes dois últimos animais foram excluídos do estudo, já que poderiam, potencialmente, representar um viés, uma vez que o processo inflamatório poderia estar aumentado pela presença da infecção cervical.

Desse modo, o estudo foi composto por 26 animais divididos nos três diferentes grupos: Grupo I (n=8), Grupo II (n=9) e Grupo III (n=9).

### **5.2 Distribuição das fibras de colágeno do enxerto e quantificação por morformetria**

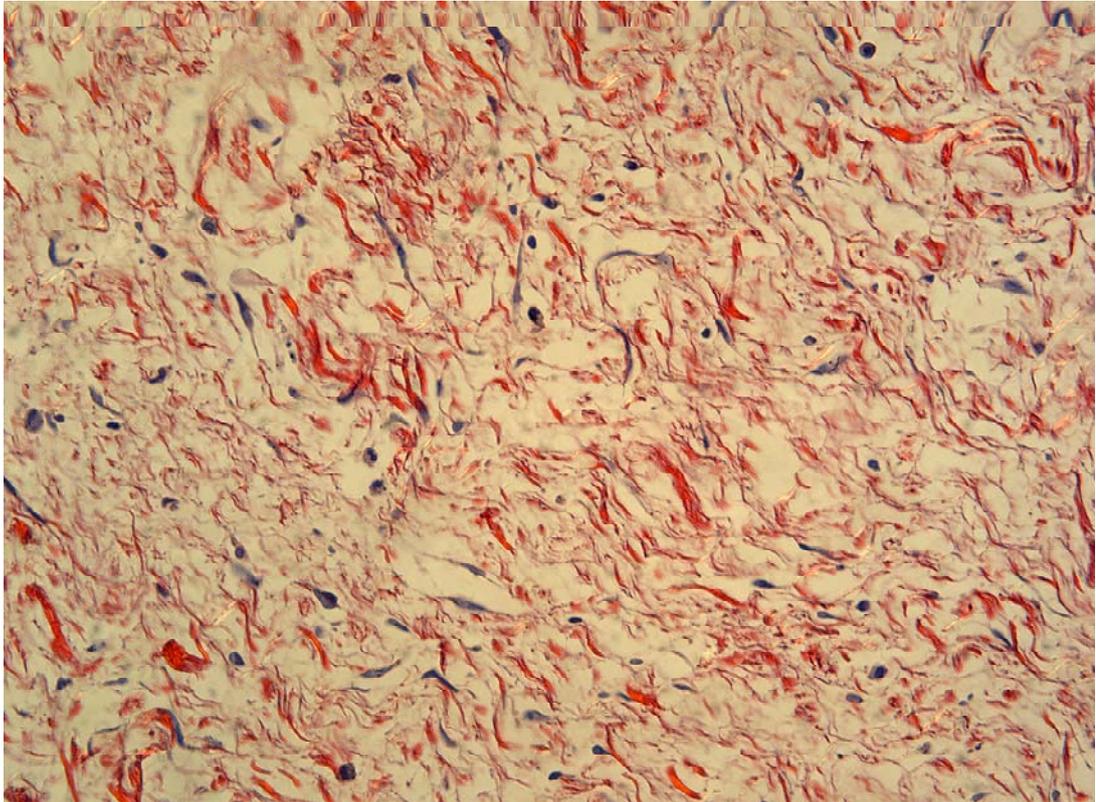
O tecido areolar perifascial da fásia lata, antes da sua enxertia, caracteriza-se histologicamente como um tecido conjuntivo frouxo

constituído por fibras de colágeno finas, dispostas trabecularmente em volta de pequenos acúmulos de tecido adiposo. Observamos uma trama vascular evidente como componente importante dessa estrutura (Figura 16). O componente celular do tecido é composto principalmente por fibroblastos, porém alguns macrófagos, linfócitos e plasmócitos podem ser identificados.

As mudanças histológicas no interior do enxerto foram observadas a partir do 15<sup>o</sup> dia do procedimento cirúrgico. Nesse grupo de animais, o enxerto apresentou um discreto aumento da densidade de fibras de colágeno e diminuição moderada da trama vascular, normalmente presente no tecido original (Figura 17).

O enxerto de alguns animais do Grupo II, três meses de pós-operatório, mostrou alterações características de degeneração hialina. Esta alteração histológica foi caracterizada como uma mudança de cor no tecido enxertado que se mostrou com um aspecto amorfo e róseo vítreo, observado nas lâminas coradas com HE e nas coradas pelo Sírius-Red e visualizadas sob luz convencional. A diminuição de vasos sanguíneos no enxerto desse grupo foi evidente maior que no Grupo II (Figura 18).

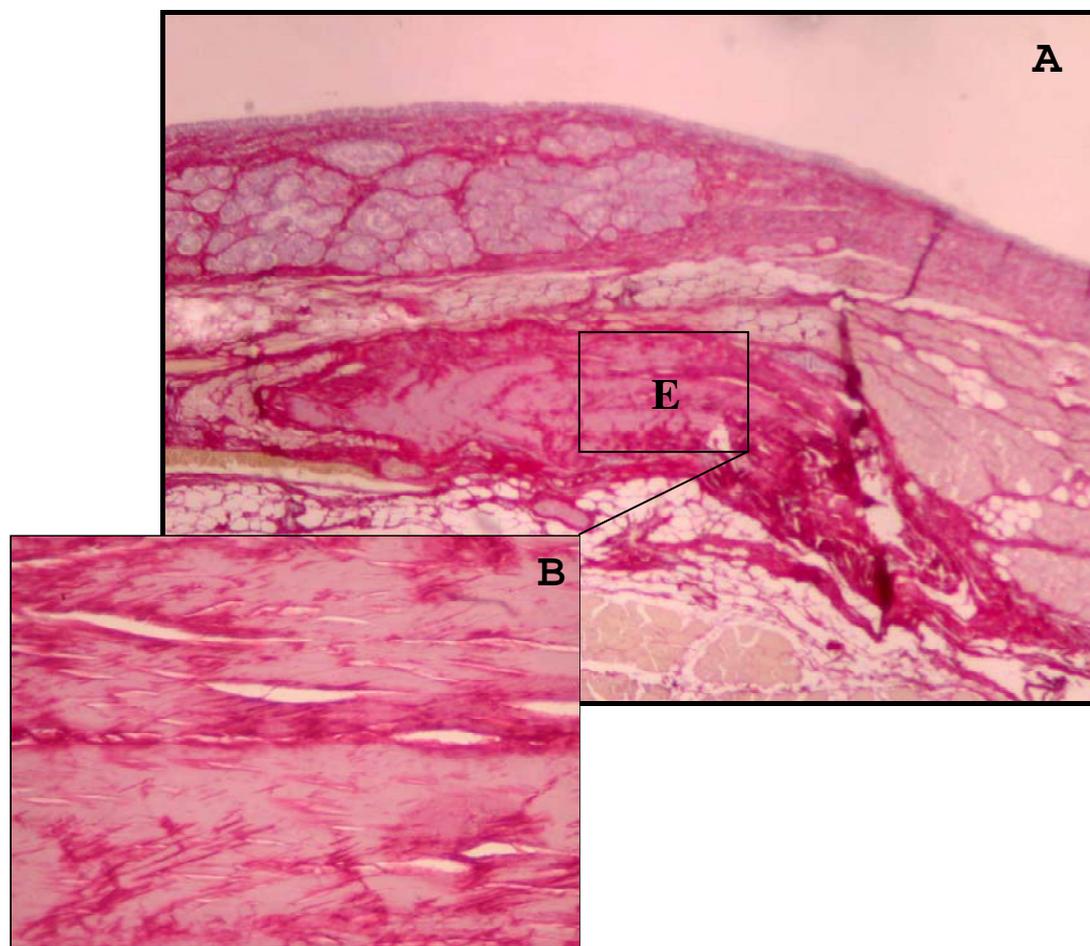
Nos animais do Grupo III, seis meses de pós-operatório, a degeneração hialina do tecido enxertado se fez ainda mais evidente, presente em quase a totalidade dos animais desse grupo. Essa alteração foi acompanhada de uma importante diminuição dos vasos sanguíneos, sendo em alguns casos impossível de visualizar os mesmos no interior do tecido enxertado.



**Figura 16** - Corte histológico transversal do tecido areolar perifascial antes da sua enxertia. Picrosirius visualizado sob luz convencional 400X.



**Figura 17** - Corte histológico transversal da prega vocal direita aos 15 dias pós-operatórios, mostrando a área da incisão no epitélio para confecção do bolsão (*seta*) e o enxerto (E). HE 200X.



**Figura 18** - Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos 3 meses pós-operatório: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria. Note a densificação das fibras colágenas dentro do enxerto; (B) Aspecto de degeneração hialina das fibras colágenas no interior do enxerto. Observe a ausência de vasos sanguíneos e de células. Picrossirius sob luz convencional (A) 100X, (B) 400X.

As mudanças histológicas observadas na coloração HE foram ainda mais evidentes quando os cortes histológicos foram corados com Picrosirius para fibras colágenas e visualizados sob luz polarizada (Figuras 19 e 20). Os enxertos do Grupo III mostraram alterações evidentes nas fibras de colágeno com uma expressão aumentada de fibras laranja-avermelhadas em contraposição ao predomínio de fibras amarelo-esverdeadas vistas no enxerto controle. Essa expressão aumentada de fibras laranja-avermelhadas foi ainda mais evidente, acentuada e progressiva nos enxertos Grupo III, evidenciando uma clara mudança das fibras de colágeno (Figuras 21 e 22).

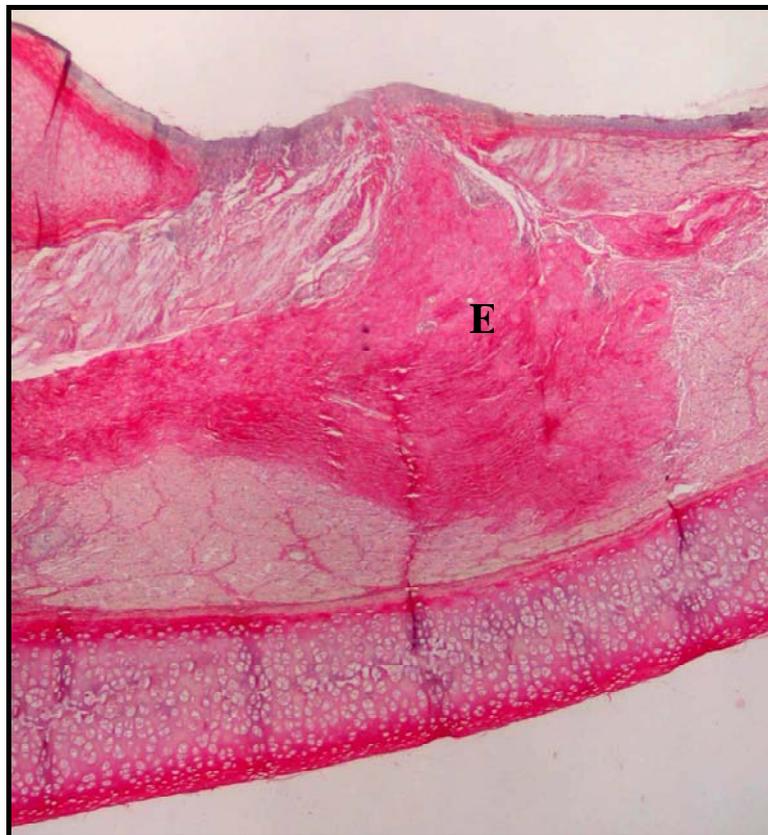
Ao avaliarmos estatisticamente a densidade de colágeno no interior do enxerto entre os grupos estudados, observamos que não houve um aumento estatisticamente significativo entre o controle (tecido original) com Grupo I ( $p=0,190$ ) e entre os Grupos II e III ( $p=0,964$ ). Entretanto, notamos uma diferença estatisticamente significativa da densidade de colágeno total entre os animais Grupo I e II ( $p=0,004$ ).

Quando realizada análise estatística da porcentagem de fibras colágenas finas entre os grupos, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o Grupo de I ( $p=0,997$ ) e os Grupos I e II ( $p=0,263$ ). Contudo, houve uma diferença estatisticamente significativa, quando comparamos o Grupo II e III ( $p=0,011$ ) confirmando os dados observacionais descritos anteriormente que mostravam uma clara mudança no padrão das fibras, principalmente nos enxertos dos animais do Grupo III.

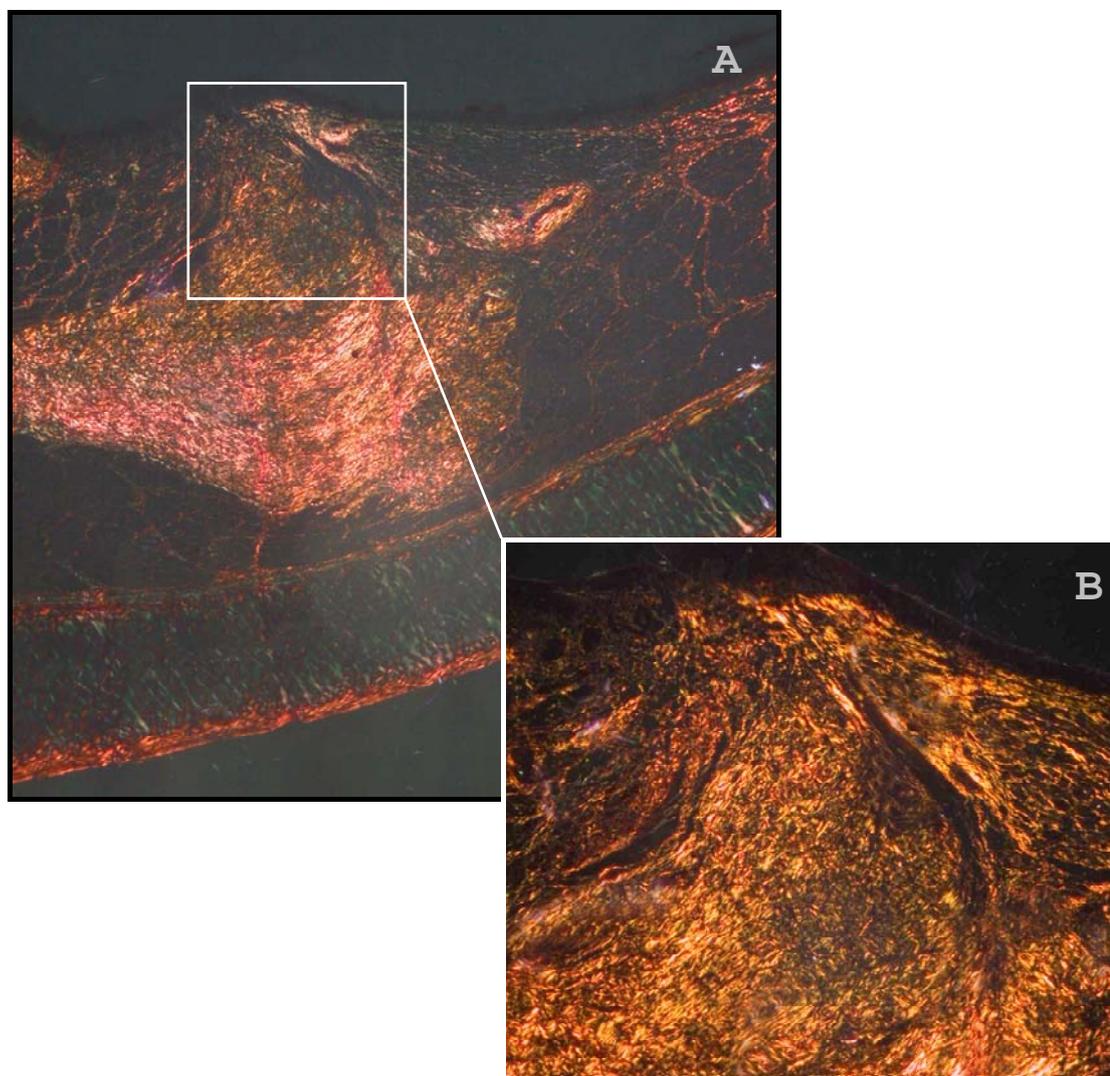
Conseqüentemente notou-se um aumento estatisticamente

significativo da porcentagem de fibras grossas no interior do enxerto entre o grupo de II e III ( $p=0,011$ ).

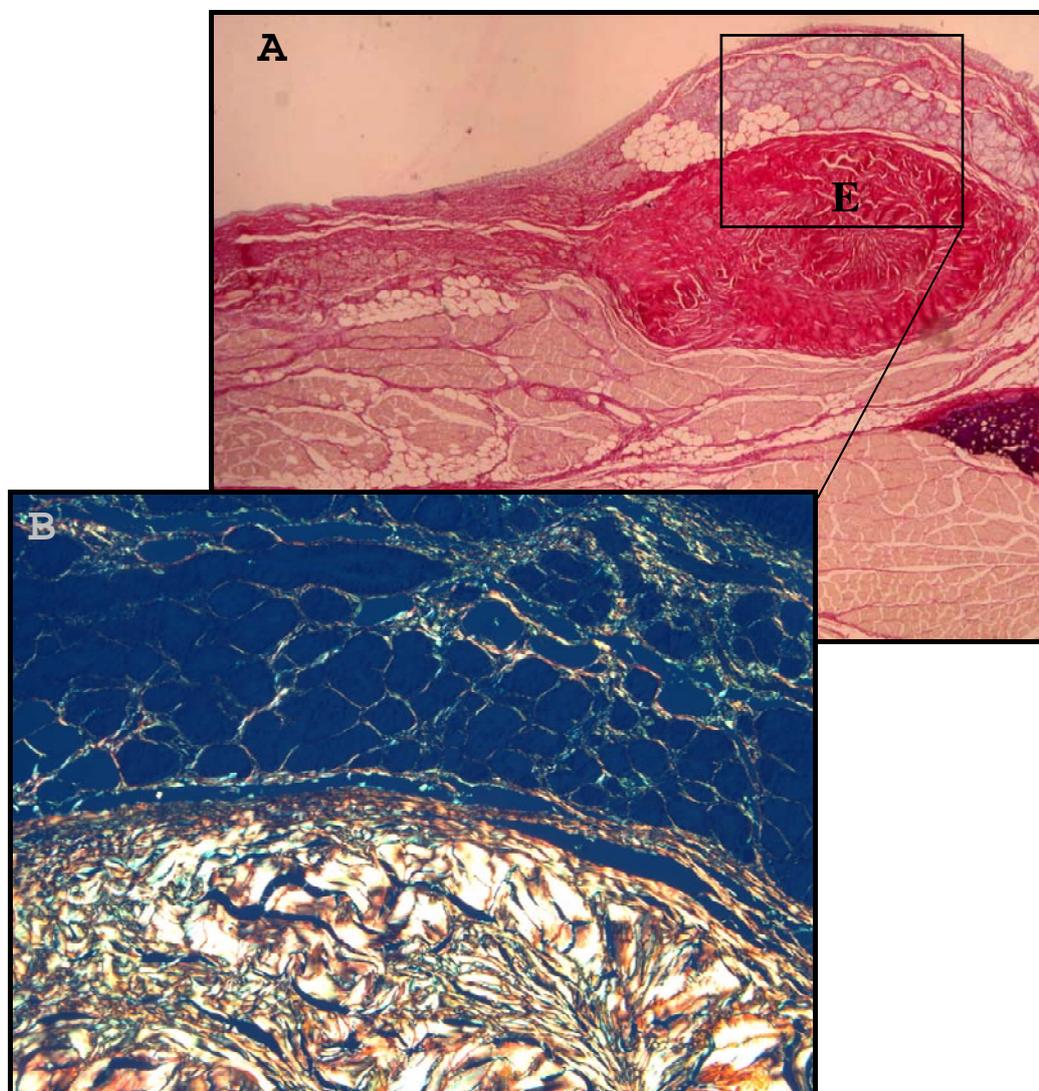
Os resultados da quantificação das fibras colágenas no interior do enxerto e a análise estatística entre os grupos estão expostos nas Tabelas 1 e 2 e nas Figura 23 e 24.



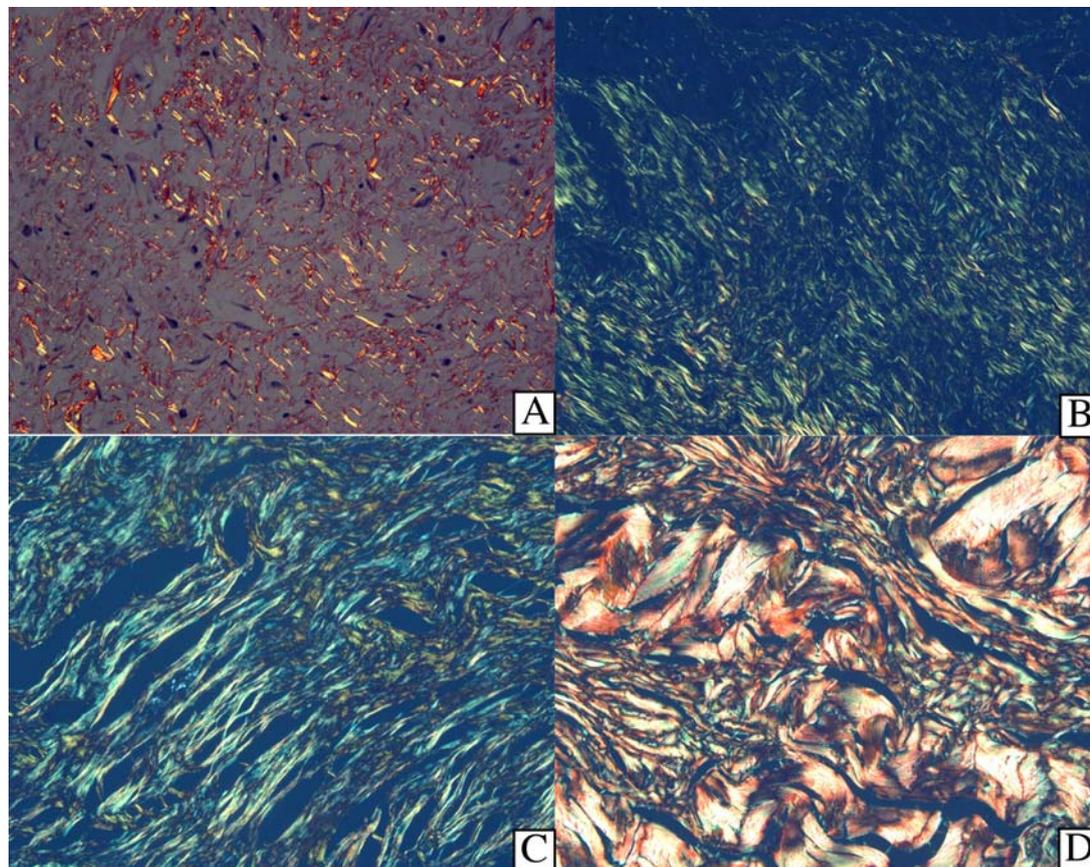
**Figura 19** - Corte histológico transversal prega vocal direita aos 15 dias pós-operatórios. Note a densificação das fibras colágenas no interior do enxerto (E), presentes já nesse grupo de estudo. Picrosirius sob luz convencional 100X.



**Figura 20** - Corte histológico transversal da prega vocal direita aos 15 dias pós-operatórios visualizado sob luz polarizada. Observa-se mais claramente a densificação das fibras colágenas no interior do enxerto, que pode ser visualizada a partir deste grupo. Picrossírius sob luz polarizada (A) 100X; (B) 200X.



**Figura 21** - Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos seis meses pós-operatórios: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria. Note a maior densificação e compactação das fibras colágenas dentro do enxerto; (B) Enxerto e lâmina própria visualizados em maior aumento e sob luz polarizada. Observe o padrão vermelho-alaranjado das fibras de colágeno dentro do enxerto. Picrosírius sob luz convencional (A) 100X e sob luz polarizada (B) 400X.



**Figura 22** – Cortes histológicos transversais do enxerto mostrando a mudança histológica evolutiva das fibras colágenas ao longo do estudo. (A) Enxerto original; (B) Enxerto aos 15 dias de pós-operatório; (C) Enxerto aos três meses de pós-operatório; (D) Enxerto aos seis meses de pós-operatório. Note a mudança no diâmetro das fibras e na sua cor. Picrosírius sob luz polarizada 400X.

**Tabela 1** - Média e desvio-padrão da densidade de colágeno total e da porcentagem de fibras amarelo-esverdeadas (AE) e laranja-avermelhadas (LA) do enxerto nos diferentes grupos de estudo.

Grupo	n	Densidade de fibras totais		% Fibras Finas		%Fibras grossas	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Controle	10	0,02701	0,00226	0,65315	0,03135	0,34685	0,03135
Grupo I	8	0,09696	0,07984	0,63962	0,07839	0,36038	0,07839
Grupo II	9	0,27222	0,09167	0,55568	0,08763	0,44432	0,08763
Grupo III	9	0,30028	0,05994	0,29497	0,17636	0,70503	0,17636
Significância (p) *		< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Controle - referente às amostras do tecido areolar perifascial antes da enxertia

Grupo I - enxerto aos 15 dias após implantação

Grupo II - enxerto aos três meses após implantação

Grupo III - enxerto aos seis meses após implantação

\* significância (valor de p) do teste de variância univariada (Anova *one-way*)

**Tabela 2** - Tabela resumo com os resultados (valores de p) dos testes *post-hoc* comparando a densidade de colágeno total e a proporção de fibras amarelo-esverdeadas (AE) e laranja avermelhadas (LA) no interior do enxerto nos diferentes grupos de estudo.

Variável	Par de Grupos		
	Controle X Grupo I	Grupo I X Grupo II	Grupo II X Grupo III
Colágeno Total	0,190	0,004	0,964
Fibras AE	0,997	0,263	0,011
Fibras LA	0,997	0,263	0,011

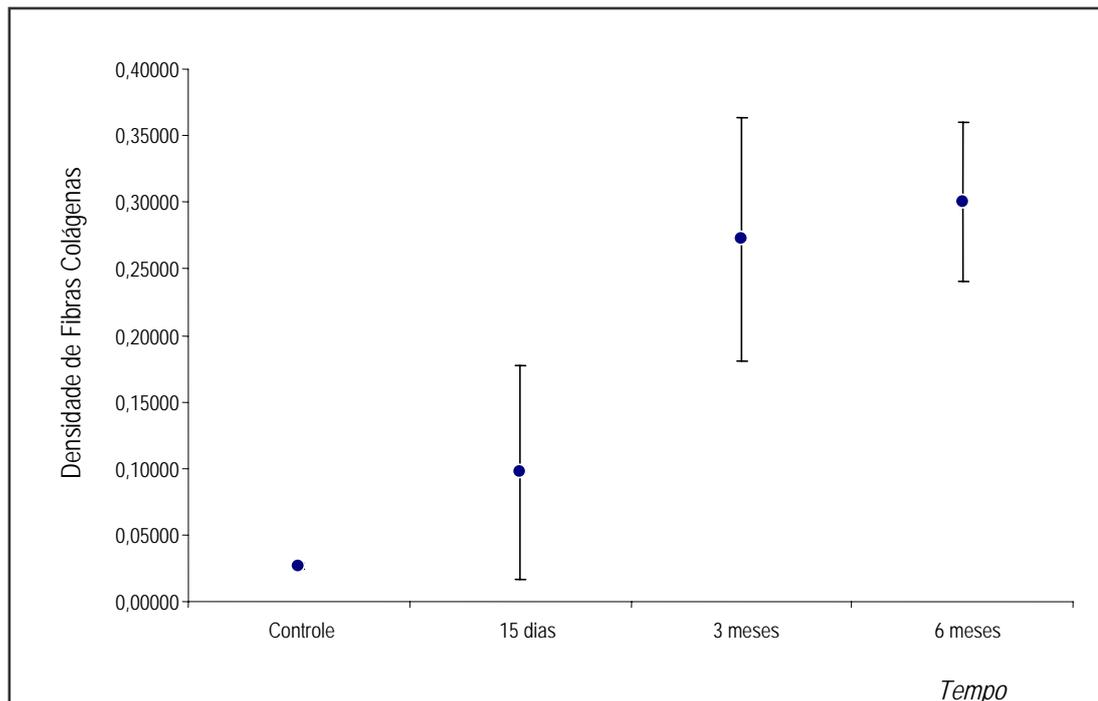
(teste *post-hoc*: Teste de Dunnett)

Controle - referente às amostras do tecido areolar perifascial antes da enxertia

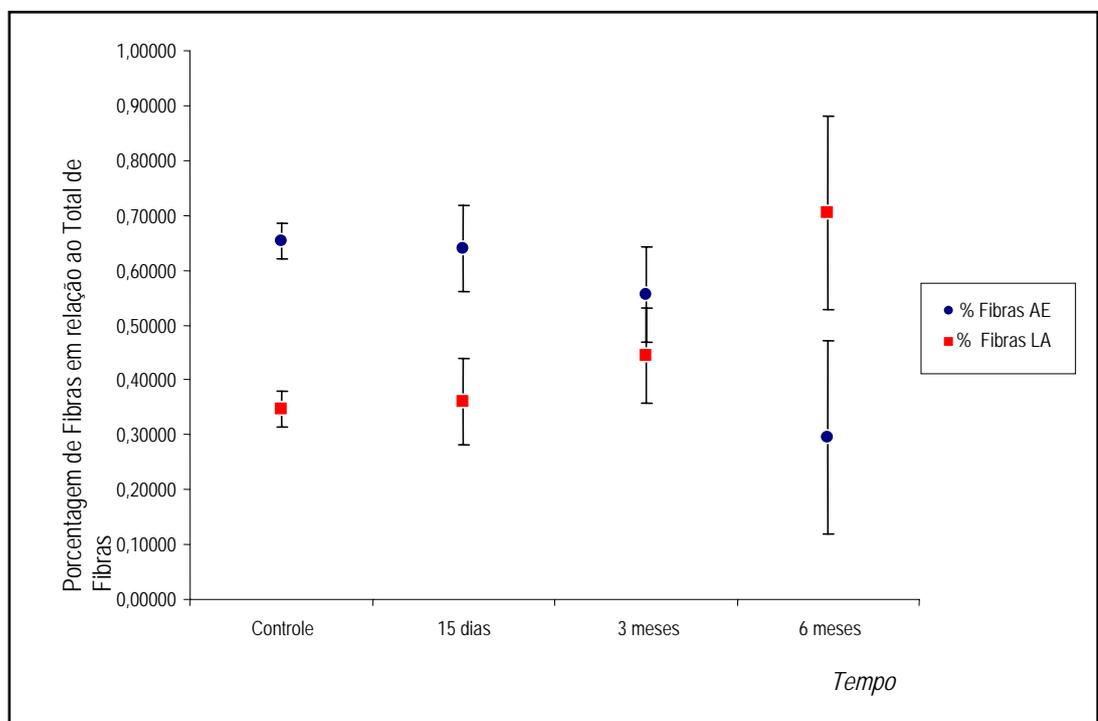
Grupo I - enxerto aos 15 dias após implantação

Grupo II - enxerto aos três meses após implantação

Grupo III - enxerto aos seis meses após implantação



**Figura 23** – Gráfico mostra as médias e intervalos de confiança (95%) da densidade de fibras colágenas no interior do enxerto no grupo controle (tecido original) e nos três tempos de observação pós-entaxia.



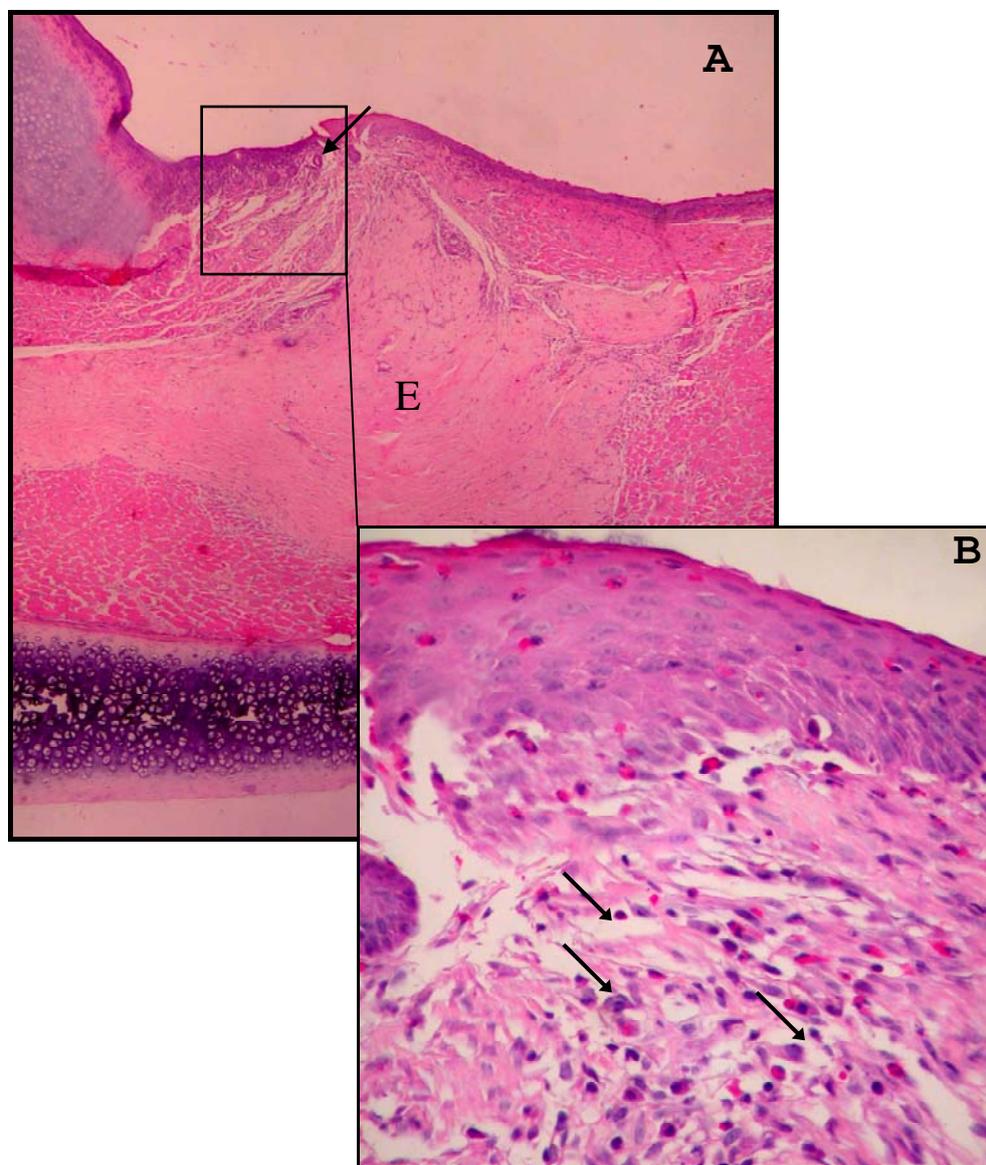
**Figura 24** - Gráfico mostra a porcentagem das fibras colágenas amarelo-esverdeadas (AE) e laranja-avermelhadas (LA) em relação ao total de fibras no interior do enxerto no grupo controle e nos três períodos pós-entaxia.

### 5.3 Avaliação do processo inflamatório

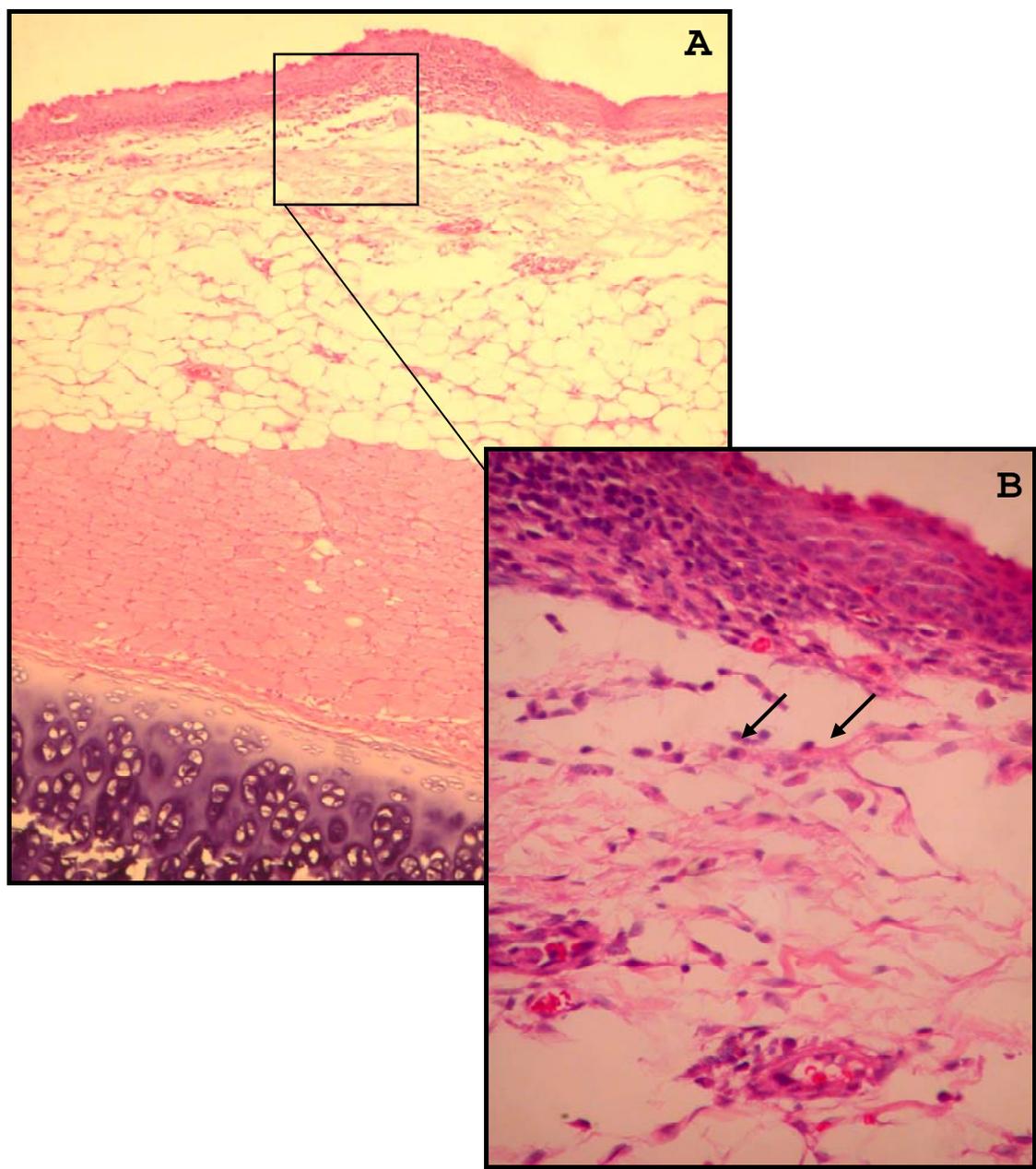
O infiltrado inflamatório se fez evidente em altos graus nas pregas vocais dos animais do Grupo I (15 dias de pós-operatório), tanto na prega vocal controle, quanto na prega vocal enxertada.

Nesse grupo, o infiltrado inflamatório foi caracterizado pela presença de grande quantidade de neutrófilos, presentes na espessura da camada mucosa com predomínio da região da entrada do enxerto na prega vocal direita (Figura 25) e na incisão cirúrgica na prega vocal esquerda. Macrófagos e linfócitos também estavam presentes em quantidades moderadas. Esse infiltrado inflamatório abarcou uma parte importante da região da lâmina própria contornando, por vezes, o tecido enxertado. Caracteristicamente o processo inflamatório não se estendia para o interior do enxerto. Algumas células gigantes tipo corpo estranho foram observadas em alguns casos desse grupo.

Nas pregas vocais do Grupo II, tanto para a prega vocal enxertada, como para prega vocal controle (Figura 26), o infiltrado inflamatório diminuiu dramaticamente em quantidade e houve uma mudança do tipo celular, predominando um infiltrado do tipo crônico linfomononuclear restrito quase por completo à região superficial da lâmina própria. No Grupo III, para ambos os lados, o infiltrado inflamatório se fez quase inexistente, salvo por alguns linfócitos e macrófagos remanescentes distribuídos difusamente na lâmina própria de algumas pregas vocais.



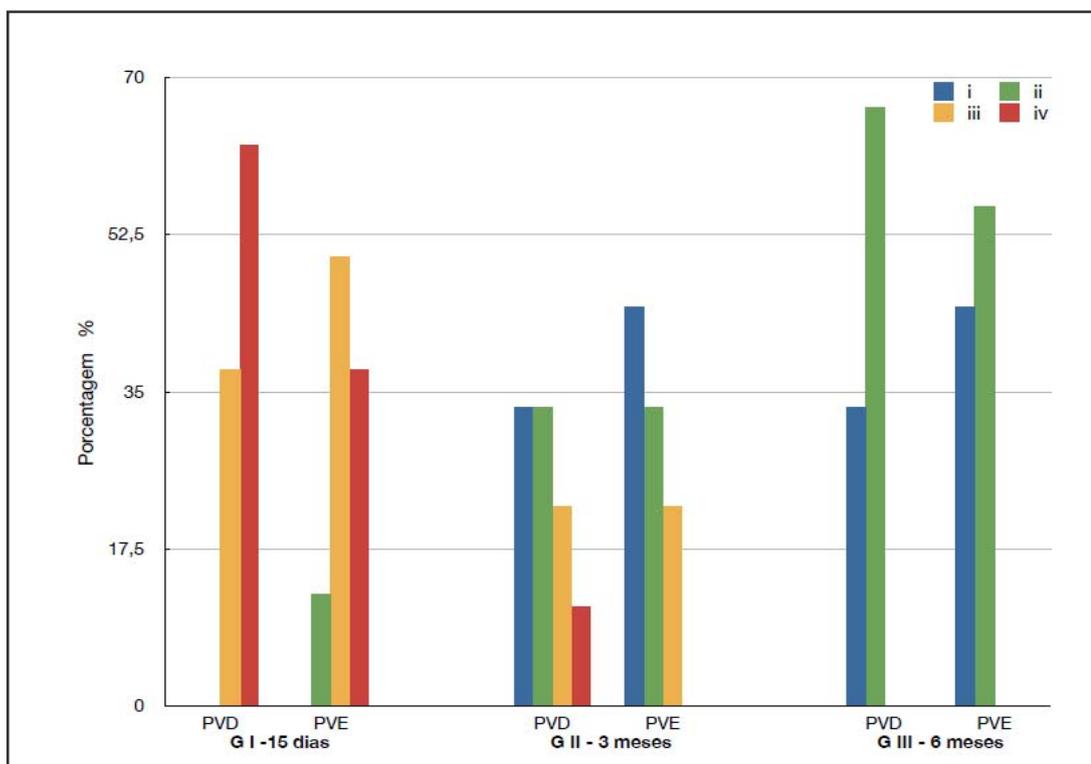
**Figura 25** - Corte histológico transversal da prega vocal enxertada aos 15 dias de pós-operatório: (A) Vista panorâmica mostrando o enxerto (E) no interior da lâmina própria; (B) Lâmina própria peri-enxerto visualizada em maior aumento. Observe o infiltrado inflamatório agudo moderado (seta). HE (A) 100X; (B) 400X.



**Figura 26** - Corte histológico transversal da prega vocal controle aos três meses de pós operatório: (A) Vista panorâmica a lâmina própria e a cicatriz cirúrgica; (B) Lâmina própria visualizada em maior aumento. Observe o infiltrado inflamatório discreto com predomínio de células linfomononucleares (*seta*). HE (A) 100X; (B) 400X.

A Figura 27 e a Tabela 3 mostram os dados da avaliação semiquantitativa do processo inflamatório na prega vocal enxertada e na prega controle nos três diferentes grupos de estudo.

A aplicação do teste de Qui-quadrado ajustado pela estatística de Fisher não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grau de inflamação entre os lados em nenhum dos três grupos de estudo. Entretanto, quando foi avaliado o processo inflamatório da prega vocal enxertada e controle isoladamente (Tabela 4), notamos uma diminuição estatisticamente significativa do processo inflamatório entre o Grupo I quando comparado com o Grupo II para a prega vocal enxertada ( $p=0,032$ ) e para a prega vocal controle ( $p=0,035$ ). Entretanto, essa diferença não foi mantida quando comparados os Grupos II e III para PVD ( $p=0,261$ ) e PVE ( $p=0,287$ ).



**Figura 27** - Representação gráfica mostrando a distribuição dos animais, em porcentagem, nos diferentes grupos de estudo, dependendo da intensidade do processo inflamatório. PVD - prega vocal direita, PVE - prega vocal esquerda. G I - animais sacrificados aos 15 dias, G II - animais sacrificados aos três meses, G III - animais sacrificados aos seis meses. i - processo inflamatório ausente, ii - processo inflamatório leve, iii - processo inflamatório moderado, iv - processo inflamatório intenso.

**Tabela 3** - Análise semiquantitativa da comparação do grau de inflamação entre a prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) nos três grupos de estudo mostrando os animais alocados em cada categoria dependendo do grau de inflamação, em números absolutos e porcentagem relativa.

GRAU DE INFLAMAÇÃO	GRUPO I 15 DIAS n=8		GRUPO II 3 MESES n=9		GRUPO III 6 MESES n=9	
	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE
i	0 (0%)	0 (0%)	3 (33,3%)	4 (44,4%)	3 (33,3%)	4 (44,4%)
ii	0 (0%)	1 (12,5%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)	5 (55,6%)
iii	3 (37,5%)	4 (50,0%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)
iv	5 (62,5%)	3 (37,5%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)	0 (0%)	0 (0%)
Significância (p) entre PVD e PVE	0,571		0,645		0,750	

*Teste Qui-quadrado ajustado pela Estatística de Fisher.*

(i) ausência de reação inflamatória; (ii) leve infiltrado inflamatório (menos de 25% células inflamatórias na totalidade do tecido examinado); (iii) moderado infiltrado inflamatório (entre 25 a 50% de células inflamatórias na totalidade do tecido examinado); (iv) infiltrado inflamatório acentuado (mais de 50% de células inflamatórias na totalidade do tecido examinado).

**Tabela 4** - Significância (valores de p) comparando o grau de inflamação da prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) segundo os diferentes tempos de observação.

Variável	Par de Subgrupos			
	PVD 15 dias X PVD 3 meses	PVD 3 meses X PVD 6 meses	PVE 15 dias X PVE 3 meses	PVE 3 meses X PVE 6 meses
Grau de inflamação	0,032	0,261	0,035	0,287

*Teste Qui-quadrado ajustado pela Estatística de Fisher.*

#### 5.4 Comparação da deposição de colágeno entre o grupo enxertado e o grupo controle

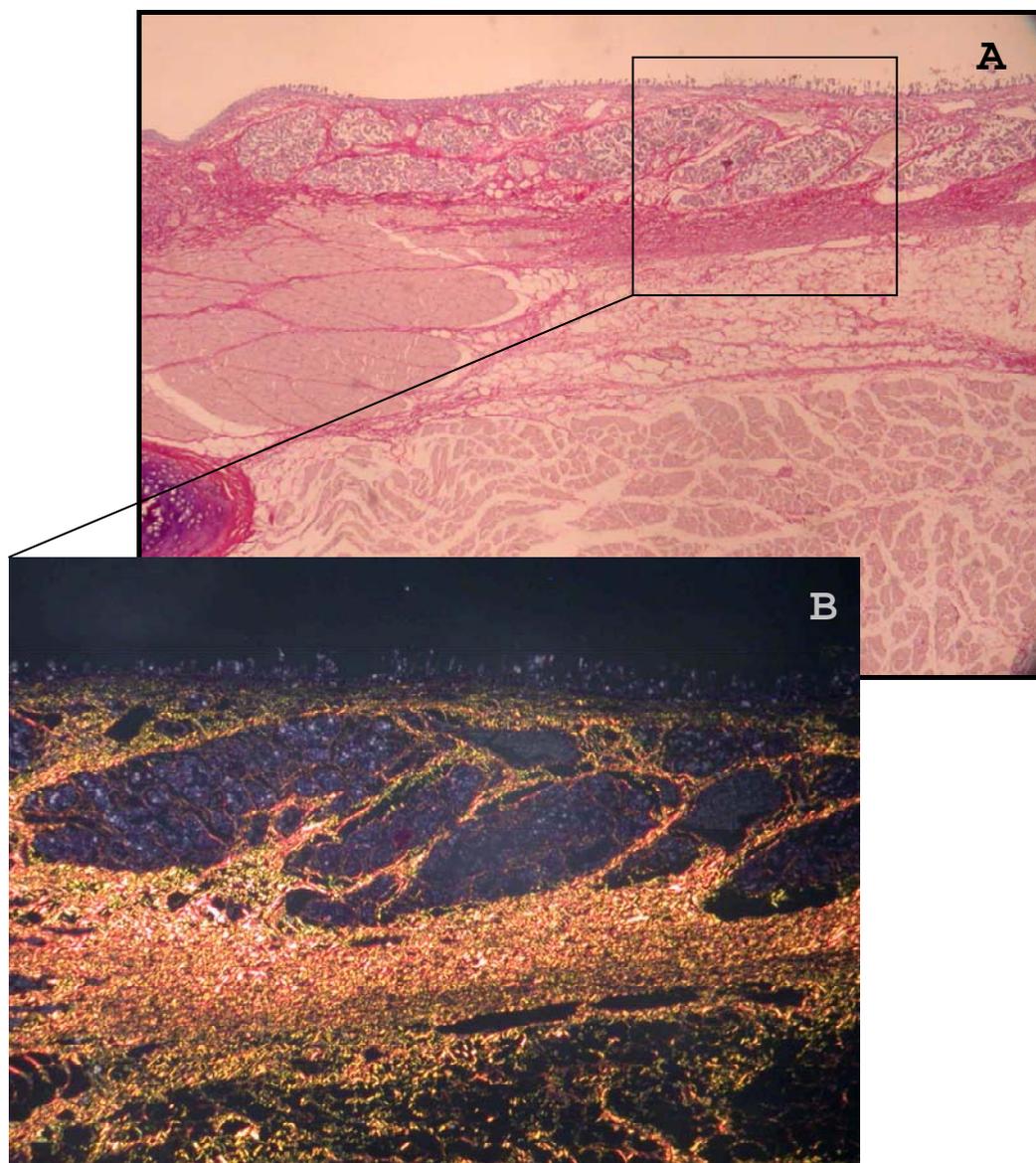
A Tabela 5 mostra a densidade média do colágeno para a prega vocal enxertada e controle com seus respectivos desvios-padrão, nos três grupos de estudo.

Embora tenha sido observada concentração de colágeno na área da manipulação cirúrgica na prega vocal controle (Figura 28), uma maior densidade de colágeno na região adjacente ao enxerto foi evidenciada na prega enxertada nos três grupos de estudo. Essas diferenças foram estatisticamente significativas para os três grupos conforme os dados expostos na Tabela 5.

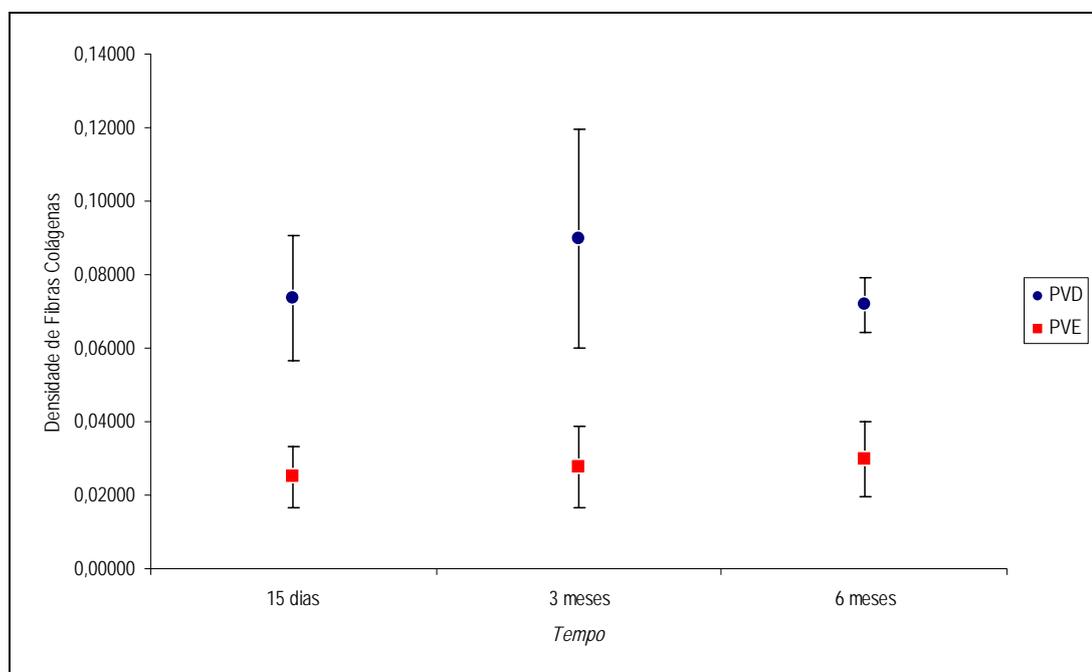
**Tabela 5** - Média dos 10 campos e desvio-padrão (DP) da densidade de colágeno na prega vocal enxertada (PVD) e controle (PVE) nos três grupos de estudo.

Grupo	Par de Variáveis	n	Média	DP	Significância (p)
I	Média 10 campos PVD	8	0,07361	0,01685	< 0,001
	Média 10 campos PVE	8	0,02496	0,00816	
II	Média 10 campos PVD	9	0,08961	0,02980	0,001
	Média 10 campos PVE	9	0,02766	0,01094	
III	Média 10 campos PVD	9	0,07178	0,00734	< 0,001
	Média 10 campos PVE	9	0,02979	0,01027	

Ao compararmos a prega vocal enxertada e controle individualmente, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mostrando que a mesma densidade de colágeno presente no Grupo I, permaneceu estável no grupo II e III (Figura 29).



**Figura 28** - Corte histológico transversal da prega vocal controle aos seis meses pós-operatório mostrando a cicatriz causada pela manipulação cirúrgica. (A) Picrossírius sem polarização 100X. (B) Picrossírius visualizado sob luz polarizada, 200X.



**Figura 29** - Representação gráfica da densidade de colágeno na prega vocal enxertada (PVD) e prega vocal controle (PVE) nos três grupos de estudo.

## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Delineamento do estudo e metodologia

Apesar de diversos tratamentos descritos na literatura (Ford e Bless, 1987; Tsunoda et al., 2001; Björk et al., 2002; Hertegard et al., 2003), o tratamento da rigidez associada ao sulco vocal e à fibrose cicatricial da prega vocal continua sendo um grande desafio para os otorrinolaringologistas.

O sulco vocal pode ser classificado em diferentes tipos dependendo da sua extensão e profundidade. No sulco vocal tipo III pela classificação de Ford et al. (1996) ou no sulco vocal estria maior pela classificação de Pontes (1989), há invaginação do epitélio e adesão a estruturas mais profundas com maior acometimento da lâmina própria e substituição do espaço de Reinke por um tecido cicatricial. Na fibrose cicatricial também ocorre adesão do epitélio e substituição do espaço de Reinke por um tecido rico em fibras colágenas (Berninger et al., 1996). Embora o sulco vocal e a fibrose cicatricial tenham fisiopatologias diferentes, apresentam mesma alteração histológica, quadro clínico semelhante e compartilham a mesma dificuldade terapêutica (Dailey e Ford, 2006).

O grande obstáculo do tratamento é encontrar um material que restaure o espaço de Reinke, corrigindo a deficiência volumétrica e devolvendo suas propriedades viscoelásticas (Hirano et al., 1989; Hirano et

al., 1990; Ford et al., 1996; Sato e Hirano, 1998).

Várias substâncias de preenchimento foram testadas em estudos experimentais e clínicos, como o colágeno (Ford e Bless, 1987; Remacle et al., 2000; Kriesel et al., 2002; Björk et al., 2002; Anderson e Sataloff, 2004; Remacle et al., 2007) e ácido hialurônico (Hertegard et al., 2003; Dahlqvist et al., 2004; Hertegard et al., 2006). Entretanto, nenhuma delas mostrou-se idealmente eficaz em corrigir a insuficiência glótica e devolver a capacidade de vibração durante a fonação.

Uma das opções bastante explorada pelos laringologistas é a utilização de enxertos autólogos, já que estes apresentam algumas vantagens tais como: excelente biocompatibilidade, gerando baixo estímulo a resposta imune e baixo risco de infecção e rejeição, quando comparadas com uso de substâncias aloplásticas ou homólogas (Tarhan et al., 2008).

Os principais enxertos utilizados no tratamento da insuficiência glótica são o de gordura e o de fáscia e foram inicialmente utilizados dentro do músculo tireoaritenóideo ou no espaço paraglótico como o objetivo de medializar a prega vocal (Mikaelian et al., 1991; Rihkanen et al., 1998; Rihkanen et al., 1999). Entretanto, seus resultados são limitados nos casos de sulco vocal e fibrose cicatricial, uma vez que a lâmina própria não é abordada com esses procedimentos (Giovanni et al; 2007).

Quando utilizamos tecidos autólogos dentro da lâmina própria da prega vocal devemos levar em consideração alguns aspectos: a viscoelasticidade da substância deve ser semelhante ao espaço de Reinke, o tecido deve promover pouca reação inflamatória e fibrose e ter baixa

reabsorção. A gordura vem sendo implantada ou injetada na lâmina própria de pregas vocais fibrosadas (Sataloff, 1997a; Woo et al., 1999; Neuenschwander et al., 2001) devido à sua baixa viscoelasticidade, semelhante à da prega vocal (Chan e Titze, 1998). Entretanto, sua maior desvantagem é a rápida reabsorção (Mikus et al., 1995; Kruschewsky et al., 2007). A camada profunda da fáscia muscular, apesar de ser mais estável e ter baixa atividade metabólica (Peer, 1959), não é recomendada para utilização no espaço de Reinke por apresentar consistência mais firme (Duke et al., 2001).

Outro fator importante que deve ser lembrado é a possível promoção de fibrose gerada pelo procedimento e pela persistência do enxerto, podendo acarretar uma piora na viscoelasticidade da prega vocal, como demonstrado pelo estudo de Carneiro et al. (2005).

O implante do tecido conjuntivo areolar perifascial em pregas vocais vem sendo utilizado como uma das alternativas na reabilitação dos pacientes com sulco vocal, com bons resultados quanto à melhora na qualidade vocal e no fechamento glótico (Costa et al., 2008). Entretanto, apesar de seu uso clínico e da crescente discussão sobre o tema nos meios acadêmicos nacionais, este é o primeiro estudo desta técnica em modelo experimental.

O tecido conjuntivo areolar perifascial apresenta características histológicas e propriedades biomecânicas interessantes pela sua similaridade às da camada superficial da lâmina própria.

Esse tecido é histologicamente descrito por um arranjo de fibras

colágenas finas trabecularmente dispostas, ricamente vascularizadas e com propriedades de deslizamento e absorção de impacto (Hazleman et al., 2004; Cloudius et al., 2002; Kouraba et al., 2003).

Durante o projeto piloto, estudamos sua histoarquitetura através da coloração HE e através da metodologia de Picrossírius polarização. Foram comparadas três amostras da camada superficial da fáscia temporal retiradas de cadáveres e três amostras do tecido areolar perifascial da fáscia lata de coelhos. Observamos que ambos os tecidos são constituídos por uma trama de fibras de colágenos amarelo-esverdeadas, finas e frouxamente empacotadas (material não publicado). A histologia do tecido areolar perifascial, tanto adjacente à fáscia lata de coelhos, quanto adjacente à fáscia temporal humana assemelham-se à descrição do espaço de Reinke de Madruga de Melo et al. (2003) que descreve a camada superficial da lâmina própria de uma prega vocal normal, como uma rede delicada de fibras colágenas dispostas em um arranjo entrelaçado semelhante a uma cesta de vime.

Outra característica importante que motiva seu uso clínico diz respeito às suas propriedades biomecânicas. Sua viscosidade dinâmica é a que mais se assemelha à da prega vocal normal, quando comparada com outros tecidos autólogos utilizados para preenchimento em pregas vocais, como a camada profunda da fáscia temporal e gordura abdominal (Wiikmann et al., 2008).

O desenho deste estudo foi delineado para responder a duas principais questões: se o enxerto mantém suas características histológicas

quando retirado do seu sítio doador e implantado em outro local, e como o tecido hospedeiro responde à enxertia, no que tange à indução de processo inflamatório e à deposição de colágeno causado pela manipulação cirúrgica e pela persistência do enxerto.

O coelho foi o modelo experimental escolhido por apresentar a prega vocal com estrutura histológica semelhante à da prega vocal humana, onde podemos identificar a lâmina própria e o músculo tireoaritenóideo (Thibeault et al., 2002). Embora não apresente uma estruturação trilaminar como na prega vocal humana (Hirano et al., 1974), a lâmina própria da prega vocal de coelhos pode ser dividida em duas camadas (Kurita et al., 1995). Outros aspectos que levaram à escolha desse animal é a existência de vários estudos que utilizaram o coelho como modelo experimental para avaliação do processo cicatricial em pregas vocais e resposta ao implante de tecidos autólogos, nos fornecendo parâmetros comparativos (Thibeault et al., 2002, Rousseau et al., 2004; Carneiro et al., 2005; Murta et al., 2005) além de ser um animal dócil e de fácil manuseio.

A metodologia deste estudo incluiu a análise histopatológica das peças por dois diferentes métodos de coloração. A coloração com hematoxilina-eosina permite a observação das alterações histológicas do processo inflamatório com a identificação do componente celular, presença de neovascularização e áreas de necrose tecidual.

O método Picrossírius-polarização é específico para fibras colágenas e permite sua descrição espacial tridimensional (Montes e Junqueira, 1982). O estudo do colágeno neste projeto foi importante por três motivos. Em

primeiro lugar, o colágeno é um componente importante na composição do espaço de Reinke (Madruça de Mello et al., 2003). Em segundo lugar, o tecido areolar perifascial é um tecido conjuntivo areolar formado por uma trama tridimensional de fibras colágenas, esparsamente arranjadas (Hazleman et al., 2004) e, por último, destacamos que o colágeno é a principal proteína do tecido cicatricial (Klein e Rudolph, 1972). Desse modo, acreditamos que a análise da densidade de colágeno pelo método de Picrossírius-polarização nos permitiria avaliar o que ocorre no interior do enxerto e ao redor deste.

A escolha dos períodos pós-enxertia em que os animais foram sacrificados foi baseada em análise de estudos prévios.

O primeiro grupo de estudo foi escolhido, pois aos quinze dias os principais eventos da inflamação aguda estão em resolução (Cotran et. al., 1989; Peacock, 1990; Adzick, 1997) e já se iniciou o processo de remodelação tecidual com a deposição de colágeno denso e desorganizado no local da ferida operatória (Branski et al., 2005).

A escolha do segundo grupo, com análise dos animais sacrificados aos três meses de pós-operatório, foi motivada pelo estudo de Carneiro et al. (2005) que utilizou a mesma técnica e esse prazo para avaliação inicial de seus resultados. Apesar de utilizar enxertos diferentes (gordura e camada profunda da fáscia lata), este estudo nos permitiu dados comparativos controlados.

Aos três meses, ainda está ocorrendo a remodelação tecidual com alterações na matriz extracelular representadas principalmente pelo aumento

da resistência de fibras colágenas e diminuição da quantidade de água no espaço extracelular (Springer, 1994). O terceiro mês pós-operatório representa também a metade do período total de nossa observação.

O período de avaliação final escolhido foi o sexto mês de pós-operatório já que estudos experimentais sobre a cicatrização em pregas vocais demonstram que a maturação do colágeno completa-se nesse prazo no coelho (Rousseau et al., 2004). Achados semelhantes também foram encontrados em modelo experimental utilizando cães (Rousseau et al., 2003).

Optamos pela enxertia do tecido areolar perifascial da fásia lata pela dificuldade de acesso à fásia temporal no coelho (Popesko et al., 2003). Diferentemente do homem, em que o músculo temporal é facilmente identificado, a dissecação dessa musculatura em coelhos implicaria a lesão de tecidos mais profundos levando a uma maior morbidade ao animal.

Uma das dúvidas que surgiram no delineamento deste estudo que poderia comprometer os resultados e impedir que os resultados neste modelo animal pudessem ser extrapolados para a experiência clínica real é se o tecido areolar perifascial da fásia temporal humana é histologicamente comparável ao tecido areolar perifascial da fásia lata de coelhos. Para minimizar este viés que poderia comprometer os resultados, o tecido areolar perifascial da fásia lata foi histologicamente avaliado assim como a camada superficial da fásia temporal humana durante o projeto piloto. Ambos os tecidos são caracterizados como um tecido conjuntivo frouxo, constituído por fibras finas de colágeno dispostas trabecularmente, conforme a descrição de

fáscia superficial de Hazleman et al. (2004) [material não publicado].

## **6.2 Alterações histológicas no enxerto**

Ao estudarmos o enxerto antes e após sua implantação no interior da lâmina própria da prega vocal de coelhos nos diferentes grupos de estudo, verificamos mudanças histológicas importantes no interior do enxerto ao longo do tempo. Houve gradualmente diminuição da vascularização e aumento na densidade de fibras colágenas. Essas alterações foram ainda mais evidentes devido ao aspecto de degeneração hialina observadas em alguns animais de três meses de pós-operatório e na totalidade dos animais de seis meses. A degeneração hialina é representada na microscopia pelo aspecto vítreo, homogêneo e róseo, visualizada na coloração HE e quando corados pelo Sírius-Red e analisados sem polarização, e reflete à condensação das fibras colágenas e o aumento na sua espessura e rigidez (Junqueira e Carneiro, 1990).

Quando corado pelo Sírius-Red, as alterações do colágeno tornaram-se mais evidentes e a quantificação da sua densidade total pôde ser calculada. Através da análise estatística da densidade de fibras no interior do enxerto, observamos que um aumento gradual, porém não estatisticamente significativo entre o Grupo controle e o Grupo I ( $p=0,190$ ) e estatisticamente significativo entre os Grupos I e II ( $p=0,004$ ). Esse aumento não é mantido entre os Grupos II e III ( $p=0,964$ ).

Ao avaliar a porcentagem de fibras amarelo-esverdeadas e laranja-avermelhadas no interior do enxerto, notamos uma mudança estatisticamente significativa no padrão das fibras entre os Grupos II e III ( $p=0,011$ ), mostrando uma alteração do padrão predominante de fibras amarelo-esverdeadas presentes no grupo controle, 15 dias e três meses, para um predomínio de fibras laranja-avermelhadas no grupo de seis meses.

O grau de birrefringência das fibras de colágenos no método de Picrossírius-polarização está diretamente relacionado a dois fatores: a espessura das fibras e seu arranjo tridimensional (Dayan et al., 1989; Hirshberg et al., 1996; Hirshberg et al., 1999). Fibras amarelo-esverdeadas referem-se a fibras finas esparsamente arranjadas enquanto que fibras laranja-avermelhadas referem-se a fibras grossas ou densamente empacotadas.

Quando o enxerto livre de fáschia temporal ou de fáschia lata é retirado do leito doador, há alteração do seu formato, com diminuição da área total e aumento da sua espessura, alterações observadas precocemente, já a partir do segundo dia pós implantação (Indorewala, 2002). Segundo esse autor, isso ocorre por desidratação do tecido e pela contração das fibras elásticas e colágenas do tecido.

Sendo assim, esperávamos de fato encontrar um aumento da densidade de fibras colágenas no interior do enxerto do TAP, e a mudança no padrão de fibras deveria ser causada pela sua diminuição volumétrica e não por um aumento absoluto no número de fibras.

Outro fato que deve ser comentado é que o aumento progressivo do

colágeno no interior do enxerto e a mudança da coloração das fibras poderiam estar ocorrendo pela deposição de colágeno que normalmente ocorre durante a cicatrização (Klein e Rudolph, 1972; Rabau e Dayan, 1994). Entretanto, nossos achados não nos permitem dizer se o colágeno presente no enxerto pertencia ao tecido original ou se foi um colágeno sintetizado ou recrutado pelo tecido hospedeiro durante a fase de remodelação tecidual.

Uma das grandes limitações da utilização de enxertos autólogos é a sua reabsorção ao longo do tempo. Um dos exemplos é a gordura. Como comentado anteriormente, apesar de constituir um excelente material utilizado para preenchimento devido a sua viscoelasticidade semelhante à da prega vocal (Chan e Titze, 1998), seu uso tem sido limitado por reabsorção errática (Mikus et al., 1995; Kruschewsky et al., 2007). A identificação do enxerto em todos os animais do grupo de seis meses demonstra que pelo menos até este período, esse enxerto autólogo resiste à reabsorção.

Mesmo não sendo reabsorvido por pelo menos seis meses, não podemos afirmar que o enxerto está sendo incorporado pelo tecido hospedeiro já que há uma diminuição gradual dos vasos sanguíneos em seu interior do enxerto. Em contrapartida, podemos afirmar que o tecido não está sendo rejeitado, já que poucas células inflamatórias foram identificadas no interior do enxerto em nenhum dos grupos estudados.

Os nossos resultados são comparáveis aos encontrados por Reijonen et al. (2001). Apesar de utilizar a camada profunda da fáscia lata, os autores mostraram uma densificação do colágeno no interior do enxerto, e

descrevem-no como uma estrutura em forma de “bola” composta por fibras de colágeno dispostas de maneira desorganizada nos animais de três e dez dias e em feixes densos e paralelos nos animais de seis meses.

### 6.3 Processo inflamatório

Ao compararmos o processo inflamatório entre o grupo enxertado e o grupo controle ao longo dos diferentes intervalos de tempos, observa-se que não houve diferença entre os mesmos; ou seja, a presença do enxerto não aumenta o processo inflamatório causado pela manipulação cirúrgica (Tabela 3, Figura 27).

A avaliação temporal do processo inflamatório no grupo enxertado e no grupo controle mostra que há um aumento significativo do processo inflamatório entre o grupo I (15 dias) e grupo II (3 meses) para a PVD ( $p=0,032$ ) e para PVE ( $p=0,035$ ). Esse aumento não é mantido entre o grupo II e III para PVD ( $p=0,261$ ) e para PVE ( $p=0,287$ ).

Esses resultados mostram que o procedimento causa um processo inflamatório agudo de moderado a intenso, identificado nos animais do período de 15 dias, que diminui para níveis basais nos animais de três meses e seis meses, sugerindo que o processo inflamatório não se cronifica (Tabela 4).

Esses achados são concordantes com outras análises de implantes autólogos em modelos animais. Perazzo et al. (2007), ao avaliar a histologia

do enxerto de fásia cervical associada à gordura em porcos, notou um aumento no processo inflamatório da primeira semana para o primeiro mês e redução significativa nos meses subsequentes. Duprat et al. (2004) ao estudar o processo inflamatório em coelhos submetidos a implante de gordura autóloga observou semelhante processo inflamatório entre o grupo do experimento em comparação ao grupo controle submetido apenas à manipulação cirúrgica.

Murta (2005) encontrou resultados diferentes ao avaliar o processo inflamatório em coelhos submetidos à implantação de fásia e gordura na lâmina própria da prega vocal. O autor observou um maior processo inflamatório nos animais submetidos à enxertia quando comparados aos animais controles, submetidos apenas à manipulação cirúrgica no período de três meses sugerindo que a presença do enxerto é um fator para persistência do processo inflamatório.

Infelizmente, nossa análise não nos permite entender completamente a curva de evolução do processo inflamatório, uma vez que os animais foram alocados em apenas três grupos de observação. Sabemos pelos nossos resultados que um moderado a intenso processo inflamatório agudo foi observado nos animais de 15 dias e que houve uma resolução do processo aos três meses que foi mantida aos seis meses. Entretanto, o início da ascensão da atividade inflamatória e seu declínio não puderam ser identificados neste estudo. Para elucidar essa questão seria necessária a realização de um estudo com animais alocados em vários períodos diferentes.

Considerando como única variável o processo inflamatório, entendemos ser o TAP um bom material para enxertia. A resolução do processo inflamatório agudo indica que o estímulo lesivo foi de curta duração, causado apenas pela manipulação cirúrgica e que não persiste, mesmo com a presença do enxerto, mostrando sua biocompatibilidade.

Outro ponto observado que corrobora com a afirmação de que o enxerto não é rejeitado pelo organismo é o fato de terem sido identificadas poucas células inflamatórias no interior do enxerto nos animais de 15 dias e raras células inflamatórias aos três e seis meses de observação.

#### **6.4 Fibras colágenas peri-enxerto e na prega vocal controle**

Ao avaliarmos a concentração de colágeno na região do peri-enxerto no grupo enxertado e na cicatriz cirúrgica no grupo controle, verificamos uma maior deposição de colágeno a partir dos 15 dias, com aumento significativo em relação ao controle para os três períodos de observação ( $p < 0,001$ ). Esse aumento não se mostrou progressivo ao longo do tempo (Tabela 5, Figura 29).

Em uma primeira análise, esse resultado pode parecer contraditório, pois sabemos que o grau do processo inflamatório induzido pela substância de preenchimento é diretamente proporcional ao grau de fibrose cicatricial (Hom, 1994). Porém, entendemos que a maior deposição de colágeno que ocorre na prega vocal enxertada seja uma resposta do tecido hospedeiro

visando isolar o enxerto que não está sendo incorporado. Esse achado não necessariamente significa rejeição, uma vez que não há cronicidade do processo inflamatório.

Nossos achados mostraram que a deposição de colágeno está presente no grupo de 15 dias e permanece estável até os seis meses para a PVE e para PVD. Este achado vai ao encontro com outros estudos de cicatrização em pregas vocais que mostram que o processo cicatricial inicia-se a partir da primeira semana e se estabiliza aos dois meses (Thibeault et al., 2002).

Rousseau et al. (2003), ao avaliar a deposição de colágeno durante a cicatrização de pregas vocais de cães, notou uma maior deposição de colágenos aos dois meses e seis meses, maiores que o grupo controle.

Em contrapartida, Tateya et al. (2005) observou uma diminuição na densidade do colágeno tipo I a partir das oito semanas, sugerindo que a remodelação tecidual diminua a partir dos dois meses.

Assim como comentado na análise do processo inflamatório, os dados obtidos não nos permitiram saber a curva da densidade de colágeno ao longo do tempo. Não podemos assegurar se há um pico ou um declínio de concentração de colágeno entre os períodos estudados.

Não podemos afirmar tampouco, o quanto do colágeno presente no grupo controle e no grupo enxertado foi depositado pelo procedimento, uma vez que não incluímos no estudo um grupo composto por pregas vocais intactas, o que nos permitiria saber a densidade do colágeno basal. Entretanto, sabemos por dados da literatura, que há uma desestruturação e

aumento do colágeno em pregas vocais manipuladas, comparadas com as pregas vocais intactas aos dois meses e seis meses. Como o objetivo deste estudo foi comparar o efeito da persistência do enxerto na deposição do colágeno em comparação com a prega vocal manipulada, o colágeno basal de pregas vocais intactas não foi analisado.

Apesar de não termos incluído neste projeto o estudo reológico das pregas vocais manipuladas, os resultados sugerem que, baseando-se nos conceitos propostos pelos modelos reológicos prévios (Thibeault et al., 2002; Rousseau et al., 2003; Rousseau et al., 2004) que haveria um aumento na viscosidade dinâmica da prega vocal enxertada. O aumento das propriedades viscoelásticas em uma prega vocal manipulada pode ser causado pela desorganização espacial do colágeno (Thibeault et al., 2002) ou por um aumento na sua densidade (Rousseau et al., 2003; Rousseau et al., 2004). Entretanto, devemos lembrar que os estudos experimentais citados anteriormente comparam a prega vocal cicatrizada com uma prega vocal normal. Sabemos que no sulco vocal e na fibrose cicatricial, há perda da viscoelasticidade normal da prega vocal pela substituição do espaço de Reinke por um tecido cicatricial. Talvez, as alterações teciduais que ocorrem na prega vocal e no tecido implantado após a enxertia teriam menor impacto na vibração cordal do que as alterações histológicas presentes no sulco vocal, o que justificaria a melhora clínica encontrada pelo Serviço de Bucofaringologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (material não publicado) e por Costa et al. (2008).

Outras considerações devem ser feitas para tentar justificar a

incongruência entre os achados histológicos deste estudo e a experiência clínica. Sabemos que no sulco vocal e na fibrose cicatricial, há substituição da lâmina própria por um tecido rico em fibras colágenas e perda volumétrica do espaço de Reinke (Sato e Hirano, 1998; Sataloff et al., 1997a; Dailey e Ford, 2006). Um das hipóteses para justificar a melhora clínica apresentada pelos pacientes seria a correção da deficiência volumétrica pelo volume ocupado pelo enxerto, melhorando o fechamento glótico.

Além disso, sabemos que prega vocal humana é um ambiente único submetido às forças biomecânicas da vibração durante a fonação. Embora a prega vocal do coelho assemelhe-se histologicamente à humana e esse animal seja utilizado em vários modelos experimentais, o coelho não produz fonação. Forças mecânicas afetam diretamente síntese de proteínas da matriz extracelular e sua reposição durante a cicatrização (Parsons et al., 1999). Desse modo, não sabemos se haveria diferença na cicatrização da prega vocal e se as mudanças histológicas seriam diferentes se o enxerto fosse colocado na prega vocal humana, que está constantemente sob influência de forças biomecânicas externas seja durante a fonação, através da tosse, do pigarrear ou da sua elevação na deglutição.

## **6.5 Perspectivas**

Este estudo foi o pioneiro em utilizar o tecido conjuntivo areolar perifascial em modelo experimental.

Teoricamente, o TAP apresenta algumas vantagens como candidato a implante no espaço de Reinke: características histológicas e viscoelasticidade semelhantes (Wiikmann et al., 2008), biocompatibilidade e não reabsorção por pelo menos seis meses.

Entretanto, o tecido não mantém as mesmas características que o tecido original após ser enxertado e provoca uma maior deposição de colágeno, quando comparado com a prega vocal controle.

Novos estudos que avaliem as propriedades viscoelásticas através de modelos reológicos ou estudos de vibração cordal em animais maiores (cães ou porcos), com a implantação do enxerto em pregas vocais fibrosadas, nos permitiriam saber se as alterações observadas neste estudo afetam a viscoelasticidade e a vibração cordal e se essas alterações são melhores que as alterações causadas pela presença do sulco vocal ou fibrose cicatricial.

## 7 CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo nos permite concluir que:

- a análise histopatológica da enxertia do tecido areolar perifascial em pregas vocais de coelhos mostrou mudanças importantes no enxerto ao longo do período estudado. Aos 15 dias pós-operatórios, houve uma diminuição dos vasos no interior do enxerto, intensificada nos animais aos três e seis meses pós-enxertia. Observou-se compactação gradativa das fibras de colágeno, à medida que diminuiu o processo inflamatório, presente em altos graus nos animais de 15 dias, leve ou ausente nos animais de três meses e seis meses pós-operatórios.
- houve um aumento da densidade de fibras colágenas totais no interior com aumento na proporção de fibras laranja-avermelhadas em relação às fibras amarelo-esverdeadas quando comparamos o enxerto do tecido areolar perifascial da fáschia lata antes de ser enxertado e após ser enxertado, aos 15 dias, três meses e seis meses pós-operatório.
- as pregas vocais submetidas à enxertia apresentam reação inflamatória semelhante ao grupo controle, submetidos apenas à manipulação cirúrgica, nos três períodos de observação.
- o enxerto provoca uma maior deposição de colágeno na prega vocal enxertada desde 15<sup>o</sup> pós-operatório quando comparado com o grupo controle, submetido apenas à manipulação cirúrgica.

ANEXOS

**Anexo A - Resultados da aplicação do *Teste de Kolmogorov-Smirnov*, para verificação da normalidade das variáveis paramétricas**

**0 dias (Enxerto Controle)**

Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
Densidade de fibras totais	10	0,02701	0,00226	0,02341	0,03045	0,996
% Fibras Finas	10	0,65315	0,03135	0,60254	0,70348	0,957
%Fibras grossas	10	0,34685	0,03135	0,29652	0,39746	0,957

n = número de animais

**15 dias**

Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
Densidade de fibras totais	8	0,09696	0,07984	0,01320	0,23070	0,876
% Fibras Finas	8	0,63962	0,07839	0,53004	0,79800	0,875
%Fibras grossas	8	0,36038	0,07839	0,20200	0,46996	0,875

n = número de animais

**3 meses**

Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
Densidade de fibras totais	9	0,27222	0,09167	0,15278	0,39070	0,878
% Fibras Finas	9	0,55568	0,08763	0,38839	0,64199	0,537
%Fibras grossas	9	0,44432	0,08763	0,35801	0,61162	0,537

n = número de animais

**6 meses**

Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
Densidade de fibras totais	9	0,30028	0,05994	0,19667	0,38656	0,995
% Fibras Finas	9	0,29497	0,17636	0,07472	0,52675	0,795
%Fibras grossas	9	0,70503	0,17636	0,47325	0,92528	0,795

n = número de animais

**Anexo B** – Distribuição dos animais do estudo de acordo com a massa corporal, grupo alocado e complicações pós-operatórias.

<b>Coelho</b>	<b>Massa Corporal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Complicações</b>
1	3500 g	15 dias	Óbito no 1 <sup>o</sup> PO por diarreia
2	3100 g	6 meses	
3	2900 g	15 dias	
4	3100 g	3 meses	
5	2900 g	3 meses	
6	3000 g	15 dias	
7	3100 g	3 meses	
8	3200 g	6 meses	Óbito- abscesso drenado no 15 <sup>o</sup> PO
9	3500 g	15 dias	
10	3200 g	3 meses	
11	3500 g	3 meses	
12	3800 g	15 dias	
13	3500 g	6 meses	
14	3400 g	3 meses	
15	3600 g	6 meses	
16	2800 g	15 dias	Óbito- abscesso drenado no 7 <sup>o</sup> PO
17	3300 g	6 meses	
18	3500 g	6 meses	
19	3400 g	3 meses	
20	3300 g	3 meses	
21	3300 g	6 meses	
22	3800 g	15 dias	
23	2800 g	15 dias	
24	3200 g	15 dias	
25	3200 g	6 meses	
26	3400 g	3 meses	
27	2900 g	15 dias	
28	3400 g	6 meses	
29	2900 g	3 meses	Óbito- no 22 <sup>o</sup> PO por diarreia
30	3300 g	6 meses	

PO = Pós-Operatório

**Anexo C – Avaliação semiquantitativa do processo inflamatório**

Grupo	Coelho	PVD	Achados relevantes na PVD	PVE
15 dias	1	iii		iii
15 dias	2	iv	Presença de célula gigante	iv
15 dias	3	iv		iv
15 dias	6	iv	Presença de célula gigante	iii
15 dias	9	iv		iii
15 dias	10	iii		iv
15 dias	21	iv	Fase intermediária de degeneração hialina	iii
15 dias	22	iii	Presença de célula gigante	ii
15 dias	23	iii		iii
15 dias	24	iv	Presença de célula gigante	iv
3 meses	4	ii		iv
3 meses	5	ii		ii
3 meses	7	ii	Fase intermediária de degeneração hialina do enxerto	iii
3 meses	20	ii		ii
3 meses	25	iii		iii
3 meses	26	i		i
3 meses	27	iii		i
3 meses	28	i		i
3 meses	29	i		i
3 meses	30	ii		iv
6 meses	8	ii		iii
6 meses	11	ii	Fase intermediária de degeneração hialina do enxerto	i
6 meses	12	ii		ii
6 meses	13	i		i
6 meses	14	ii		iii
6 meses	15	ii		ii
6 meses	16	iii		ii
6 meses	17	i	Fase intermediária de degeneração hialina do enxerto	ii
6 meses	18	ii		i
6 meses	19	ii		iii

PVD = prega vocal direita; PVE = prega vocal esquerda, (i) ausência de reação inflamatória; (ii) leve infiltrado inflamatório (menos de 25% células inflamatórias na totalidade do tecido examinado); (iii) moderado infiltrado inflamatório (entre 25 a 50% de células inflamatórias na totalidade do tecido examinado); (iv) infiltrado inflamatório acentuado (mais de 50% de células inflamatórias na totalidade do tecido examinado).

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Adzick NS. Wound Healing: biologic and clinical features. In: Sabiston Jr. DC, Lyerly HK. *Textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice*. 15a ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. p.207-20.
- Anderson TD, Sataloff RT. Complications of collagen injection of the vocal fold: report of several unusual cases and review of literature. *J Voice*. 2004;18(3):392-97.
- Berninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, Sataloff RT, Spiegel JR, Woo P. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;115(5):474-82.
- Björk G, D'Agata L, Hetergard S. Vibratory capacity and voice outcome in patients with scarred vocal folds treated with collagen injection –case studies. *Logoped Phoniatr Vocol*. 2002;27:4-11.
- Borzacchiello A, Mayol M, Garskog O, Dahlqvist A, Ambrosio L. Evaluation of injection augmentation treatment of hyaluronic acid based material on rabbit vocal cords. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16:553-7.
- Branski RC, Verdolini K, Rosen CA, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:19-24.
- Carneiro CG, Sennes LU, Nascimento PH, Ximenes Filho JA. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fáschia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2005; 71:798-802.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

Adaptado de *International Committee of medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e Documentação. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses**. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo, Serviço de biblioteca e Documentação, 1996.

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

- Carneiro CG. *Avaliação da deposição de colágeno após o enxerto de fáscia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico* [tese]. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2005.
- Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable material in the vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope*. 1998;108:725-731.
- Clodius L. Free grafts of gliding tissue – principles and practice. *Eur J Plast Surg*. 2002; 25:123-9.
- Costa JO, Gama ACC, Oliveira JB, Neto AO. Avaliação acústica e perceptiva da voz nos momentos pré e pós-operatório da cirurgia de implante de pré-fáscia do músculo temporal. *Rev CEFAC*. 2008;10:76-83.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação e Reparo. In: *Robbins patologia estrutural e funcional*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991: 33-72.
- Dahlqvist A, Garskog O, Laurent C, Hertergard S, Ambrosio L, Borzacchiolo A. Viscoelasticity of rabbit vocal folds after injection augmentation. *Laryngoscope*. 2004;114:138-42.
- Dailey SH, Ford CN. Surgical management of sulcus vocalis and vocal fold scarring. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39:23-42.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis J, Wolman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Hist and Cell Biol*. 1989;93:27-9.
- Duke SG, Salmon J, Blalock PD, Postma GN, Koufman JA. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary experience. *Laryngoscope*. 2001;111:759-64.
- Duprat AC, Costa HO, Lancelotti C, Almeida RR, Caron R. Histologic Behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004; 113:636-640.
- Ford CN, Bless DM. Collagen injection in the scarred vocal fold. *J Voice*. 1987;1:116-8.

- Ford CN, Inagi K, Khidr A, et al. Sulcus vocalis: a rational analytical approach to diagnosis and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105:189-200.
- Giovanni A, Chanteret C, Lagier A. Sulcus vocalis: a review. *Eur Arch otorhinolaryngol.* 2007;264:337-44.
- Hansen JK, Thibeault SL. Current understanding and review of literature: vocal fold scarring. *J Voice.* 2006;20:110-20.
- Hazleman B, Riley G, Speed C. *Soft tissue rheumatology.* Oxford: Oxford University Press; 2004.
- Hertegard S, Dahlqvist A, Goodyer EN, Maurer F. Viscoelastic measurements after vocal fold scarring in rabbits: short term results after hyaluronan injection. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126:758-63.
- Hertegard S, Dahlqvist A, Laurent C, et al. Viscoelastic properties of rabbit vocal fold after augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;128:401-6.
- Hertegard S, Hallen L, Laurent C, et al. Cross-linked hyaluron versus collagen for injection treatment of glottal insufficiency: 2 year follow-up. *Acta Otolaryngol.* 2004; 124:1208-14.
- Hirani M, Sato K. *Histological color atlas of the human larynx.* San Diego, CA: Singular Publishing Group, 1993: 44.
- Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr.* 1974;26:89-94.
- Hirano M, Hirade Y, Yoshida T, Sanada T. Improved surgical technique for epidermoid cysts of the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989;98:791-5.
- Hirano M, Tanaka S, Yoshida T, Hibis S. Sulcus vocalis: functional aspects. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990;99:679-83.
- Hirshberg A, Buchner A, Dayan D. Collagen fibers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy. *J Oral Pathol Med.* 1999;28:410-2.

- Hirshberg A; , Buchner A, Dayan D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picrosirius red and polarization microscopy. *J Oral Pathol Med.* 1996;25:125-7.
- Hom DB. The wound healing response to grafting tissues. *Otolaryngol Clin North América.*1994;13:24.
- Indorewala S. Dimensional Stability of the free fascia grafts: an animal experiment. *Laryngoscope* 2002; 112(4): 727-30.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990.p 65-87.
- King JM, Simpson CB. Modern injection augmentation for glottic insufficiency. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;15:153-8.
- Klein L, Rudolph R. H3-collagen turnover in skin graft. *Surg Gynecol Obst.* 1972;135:49-57.
- Koufman JA, Isaacson G. Laryngoplastic phonosurgery. *Otolaryngol Clin North Am.* 1991;24:1151-77.
- Kouraba S, Sakamoto T, Kimura C, Honda K, Yoshida T, Kumakiri M, Sugihara T. Perifascial areolar tissue (PAT) graft. *ANZ J Surg.*2003; 73(Suppl2):A260.
- Kriesel K, Thibeault SL, Chan RW, Suzuki T, Van Groll PJ, Bless DM et al. Treatment of vocal fold scarring: rheologic and histologic measures using homologous collagen in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111:884-9.
- Kruschewsky LS, Mello-Filho FV, dos Santos AC, Rosen AC. Autologous fat graft absorption in unilateral paralyzed canine vocal folds. *Laryngoscope* 2007;117:96-100.
- Kurita S, Nagata K, Hirano M. A comparative study of the layer structure of the vocal fold. In: Bless D, Abbs J. *Vocal fold physiology.* 1a ed. San Diego: Singular; 1995.p.3-21.
- Luschsinger R, Arnold GE. *Voice, speech, language, clinical communicology: its physiology, pathology.* Belmont: Wadsworth; 1965. p.171-5.

- Madruga de Melo EC, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113:2187-91.
- Mikaelian DO, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal fold paralysis. *Laryngoscope* 1991;101:465-8.
- Mikus JL, Koufman JA, Kilpatrick SE. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injection in a canine vocal fold. *Laryngoscope*. 1995;105:17-22.
- Montes GS, Junqueira LCU. Biology of collagen. *Rev Can Biol Exp*. 1982;41:143-56.
- Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagens and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996;20:15-27.
- Murta AA. Implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: análise quantitativa do processo inflamatório [tese]. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2005.
- Neuenschwander MC, Sataloff RT, Abaza MM, et al. Management of vocal fold scar with autologous fat transplantation: perceptual results. *J Voice*. 2001; 15:295-304.
- Parsons M, Kessler E, Laurent GJ, Brown RA, Bishop JE. Mechanical load enhances procollagen processing in dermal fibroblast by regulating levels of procollagen C-proteinase. *Exp Cell Res* 1999; 252:319-31.
- Peacock EE, Cohen IK. Wound healing. In: MacCarthy M. *Plastic surgery*. Vol 1. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p.161-83.
- Peer L. Transplantation of Fascia in Animals. In: Peer L. *Transplantation of Tissues*. Vol 1 e 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1959. p.245-56.
- Perazzo PS, Coelho FS, Pontes PAL. Estudo experimental sobre a utilização de fásia cervical autóloga com gordura no espaço de Reinke de minipigs. *ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia*. 2007;25:238-42.
- Pontes PAL. Sulco vocal: *Tratamento cirúrgico pela técnica do franjamento das pregas vocais associada à fonoterapia*. [tese] Universidade Federal de São Paulo; 1989.

- Popesko P, Rajtova V, Horak J. *Colour atlas of anatomy of small laboratory animals*. Vol 1. Saint Louis: Saunders; 2003.
- Rabau, MY; Dayan D. Polarization microscopy of picrosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol Histopathol*. 1994;9:525-8.
- Reijonen P, Leivo I, Nevalainen T, Rihkanen H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope*. 2001; 111:1068-74.
- Remande M, Lawson G. Results with collagen injection into the vocal folds for medialization. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;15:148-52.
- Remacle M, Lawson G, Degols JC, et al. Microsurgery of sulcus vergeture with carbon dioxide laser and injectable collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000; 109:141-9.
- Remacle M, Lawson G, Kechian J, Jamart J. Use of injectable autologous collagen for correcting glottic gaps: initial results. *J Voice*. 1999;13:280-8.
- Rihkanen H, Soderlund-Lehikoinen S, Reijonen P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope*. 1999;109:1854-7.
- Rihkanen H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope*. 1998;108:51-4.
- Rodgers BJ, Abdul-Karim FE, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope*. 2000;110:2012-5.
- Rousseau B, Hirano S, Chan R, Welham N, Thibeault S, Ford C, Bless D. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice*. 2004;18:116-24.
- Rousseau B, Hirano S, Scheidt T, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, Bless DM. Characterization of vocal fold scarring in canine model. *Laryngoscope*. 2003;113:620-7.

- Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Rosen DC, Heuer RJ. Autologous fat implantation for vocal fold scar: a preliminary report. *J Voice*. 1997b; 11:238-46.
- Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw MJ. Vocal fold scar. *Ear Nose and Throat J*. 1997a;76:776.
- Sato K, Hirano M. Electron microscopic investigation of sulcus vocalis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:56-60.
- Springer TA. Traffic signal for lymphocyte circulation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301.
- Tarhan E, Cakmak O, Ozdemir BH. Comparison of AlloDerm, fat, fascia, cartilage, and dermal grafts in rabbits. *Arch Facial Plast Surg* 2008;10:187-193.
- Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histological characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:183-91.
- Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan W, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice*. 2002;16:96-104.
- Tsunoda K, Baer T, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: long term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*. 2001;111:453-7.
- Tsunoda K, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold. *Laryngoscope*. 2000;110:680-2.
- Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*. 1999;109:504-8.
- Wiikmann C, da Silva MA, Áreas EPG, Imamura R, Tsuji DH, Sennes LU. A baixa viscosidade dinâmica da camada superficial da fáschia temporal sugere que ela seja um material promissor para implantação em prega vocal. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(Suppl):35.
- Woo P, Rahbar R, Wang Z. Fat implantation into Reinke's Space: a histological and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999;108:738-44.

Zeitels SM, Mauri M, Dairy SH. Medialization laryngoplasty with Gore-tex for voice restoration secondary to glottal incompetence: indications and observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112:180-4.

## APÊNDICE



### *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 09.11.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1017/05**, intitulado: "Avaliação histológica do enxerto autólogo da camada superficial e profunda da fáscia lata em pregas vocais de coelhos" apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**.

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")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**

Pesquisador (a) Executante: **Dra. Adriana Hachiya**

CAPPesq, 09 de Novembro de 2005.

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