

**LARISSA NERI**

**Estudo histológico dos efeitos da lesão com laser  
diodo 980 nm e 1470 nm em pregas vocais de coelhos**

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Dr. Rui Imamura

**SÃO PAULO  
2018**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Neri, Larissa

Estudo histológico dos efeitos da lesão com laser  
diodo 980nm e 1470nm em pregas vocais de coelhos /  
Larissa Neri. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Rui Imamura.

Descritores: 1.Laringe 2.Prega vocal 3.Lasers  
4.Cicatrização 5.Colágeno 6.Coelhos

USP/FM/DBD-437/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

***Dedico...***

***Aos meus pais Marcos Neri e Eliana Aparecida  
Ferreira Neri,***

*sou grata por me inspirarem no caminho do  
estudo, do trabalho e por se dedicarem a minha  
formação. Meus pilares.*

***Às minhas irmãs Cassiana Neri e Mariana Neri,***  
*amigas, meus exemplos e eternas companheiras.*

***Ao meu marido Diego dos Santos,***  
*amor e meu porto seguro.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Dr. Rui Imamura**, médico assistente doutor do Hospital das Clínicas da FMUSP e orientador desta tese, pelo qual guardo minha sincera admiração. Veio a ser meu orientador e me auxiliou nestes últimos anos. Cada etapa da pesquisa teve sua dedicação de forma ativa e comprometida. Sempre me ensinou e inspirou com sua sabedoria e responsabilidade com os pacientes. Incentivou-me e não me deixou fraquejar em momentos difíceis da minha vida pessoal. Não há como expressar a gratidão de ser orientada por esse grande nome.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP; seu conhecimento fortaleceu a Otorrinolaringologia na FMUSP e Brasil afora. Inteligente, firme e divertido serve como inspiração profissional para toda uma geração de otorrinolaringologistas.

**Ao Prof. Dr. Domingos Tsuji**, Professor Associado e Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pelos ensinamentos e exemplos durante minha formação desde a especialização. Sua humildade e sabedoria me encantam sempre.

**Ao Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP e Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, exemplo de profissional ético e competente, por todo conhecimento compartilhado.

À **Profa. Dra. Renata Cantisani di Francesco**, **Dra. Adriana Hachiya** e **Dr. Michel Burihan Cahali** pelas orientações e críticas construtivas no exame de qualificação, além de amizade e instruções durante todos esses anos.



À **Profa. Dra. Thais Mauad**, Professora Associada do Departamento de Patologia da FMUSP, pela oportunidade de trabalhar em conjunto e ter despendido seu precioso tempo comigo e com este estudo.

**Dr. Ronaldo Frizzarini**, pelo grande exemplo de pessoa e médico. Seus ensinamentos e dedicação à minha formação na especialidade jamais serão esquecidos.

Ao **Dr. Amaro Nunes Duarte Neto**, médico assistente do Departamento de Patologia da FMUSP, por ter realizado comigo as leituras das lâminas de forma dedicada. Me ajudou muito nesta etapa, especialmente na reta final. Admiro sua paciência e perseverança.

À **Dra. Luciana Almeida Lopes** e à **Dra. Marília W. Mancini** da DMC equipamentos, na pesquisa e por fornecerem equipamentos e funcionários para sua execução.

Ao meu melhor amigo e esposo **Diego Santos**. Seu amor, carinho e exemplo me fortalecem a cada dia. Obrigada por me incentivar a ser uma pessoa cada vez melhor.

Aos meus sogros, **Adriano A. dos Santos** e **Denise O. A. dos Santos**, por terem aberto as portas de sua família e corações. Obrigada.

À minha grande amiga e companheira de pós-graduação **Helena Hotz Arroyo Ramos**. Sua ajuda, parceria e amizade fizeram esse projeto caminhar.

Ao **Dr. Eduardo Pompeu**, médico veterinário do Biotério Central da FMUSP, por coordenar animais e instalações para a realização deste estudo.

Aos funcionários do biotério **Claudionor Donizete Vidotti**, **Clovis Cícero Vidotti** e **Vicente de Paula Silveira**, por me auxiliarem no manejo dos animais de forma especial.

À **Kely Cristina Soares Bispo**, funcionária do laboratório de histopatologia, pela confecção das lâminas deste projeto.

Aos **médicos assistentes do Hospital das Clínicas da FMUSP** e do **Hospital Universitário**, por dividirem comigo seus conhecimentos ao longo da minha formação nessa Instituição.

Aos **residentes, fellows e pós-graduandos contemporâneos** do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP que se tornaram grandes amigos.

Às secretárias **Maria Marilede Alves, Maria Márcia Alves e Lucivânia Lima da Silva**, que sempre me ajudaram com carinho quando precisei.

A todos os que estão lendo esta tese e que se sentem, de alguma forma, responsáveis para que ela fosse possível.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.  
*Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 Histologia da Prega Vocal Humana e da Prega Vocal do Coelho .....	8
3.2 O Coelho como Modelo Animal para Estudos Experimentais em Laringologia .....	10
3.3 Processo de Cicatrização .....	11
3.3.1 Fase inflamatória.....	12
3.3.2 Fase proliferativa.....	14
3.3.3 Fase de maturação .....	15
3.4 Cicatrização na Prega Vocal .....	16
3.5 Laser .....	18
3.5.1 Princípios do funcionamento do laser .....	19
3.5.2 Laser de diodo .....	25
3.5.2.1 Laser de diodo em otorrinolaringologia .....	27
3.5.2.2 Laser de diodo em laringe.....	30
4 MÉTODOS .....	32
4.1 Aspectos Éticos e Desenho do Estudo.....	33
4.2 Seleção da Amostra .....	33
4.2.1 Critérios de inclusão.....	33
4.2.2 Critérios de exclusão.....	34
4.3 Amostra, Grupos do Estudo e Local do Estudo.....	34
4.3.1 Local do estudo.....	34
4.3.2 Amostra e grupos de estudo .....	35
4.4 Procedimento Pré-Operatório.....	37
4.5 Anestesia dos Animais .....	37
4.6 Procedimento Cirúrgico .....	38
4.6.1 Parâmetros e estudo piloto .....	42
4.7 Procedimento pós-operatório .....	45
4.8 Eutanásia, Coleta e Isolamento das Laringes .....	45
4.9 Preparação Histológica .....	48
4.10 Análise Histológica das Pregas Vocais .....	50
4.10.1 Técnica de coloração hematoxilina-eosina .....	50
4.10.2 Técnica de coloração picrossírius .....	52

4.10.3	Técnica de coloração resorcina-fucsina .....	53
4.10.4	Técnica de imunistoquímica .....	54
4.11	Análise Estatística .....	57
5	RESULTADOS .....	58
5.1	Evolução dos Animais .....	59
5.2	Variáveis de Interesse .....	59
5.2.1	Processo inflamatório .....	60
5.2.2	Densidade e orientação das fibras elásticas e colágenas .....	74
5.2.3	Imunistoquímica para colágeno tipo I e tipo III .....	76
6	DISCUSSÃO .....	78
6.1	Delineamento do Estudo e Metodologia .....	79
6.1.1	Padronização lesão e parâmetros .....	82
6.2	Efeito do Laser Diodo .....	84
6.2.1	Parâmetros inflamatórios .....	84
6.2.2	Fibras elásticas .....	88
6.2.3	Fibras colágenas .....	89
6.3	Perspectivas Futuras .....	92
7	CONCLUSÕES .....	93
8	ANEXOS .....	95
9	REFERÊNCIAS .....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- DMC - DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda.
- AH - Ácido hialurônico
- CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono
- EGF - Fator de crescimento endotelial
- HE - Hematoxilina-eosina
- Ho:YAG - *Holmium: yttrium-aluminium-garnet*
- LP - Lâmina própria
- PF-4 - Fator plaquetário 4
- P-N - Junção de semicondutores P e N
- ppv - Pregas vocais
- PV - Prega vocal
- RFO - Resorcina-fucsina oxidada
- TGF- $\beta$  - Fator de transformação de crescimento beta

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre fases da cicatrização e células inflamatórias.....	12
Figura 2 - Estrutura básica de um sistema de laser .....	20
Figura 3 - Spectrum eletromagnético .....	22
Figura 4 - Coeficientes de absorção aproximados dos principais cromóforos teciduais.....	24
Figura 5 - Fotografia da prega vocal de coelho excluído do estudo por apresentar alteração laríngea - granuloma de prega vocal esquerda.....	34
Figura 6 - Organograma de aleatorização dos grupos de estudo .....	37
Figura 7 - Desenho esquemático do laringoscópio com suas medidas .....	39
Figura 8 - Fotografia do laringoscópio (visão lateral) e visão externa da sua posição ao realizar a laringoscopia no coelho .....	40
Figura 9 - Fotografia da realização da laringoscopia pela pesquisadora .....	40
Figura 10 - Fotografia do procedimento: pesquisador utilizando telescópio rígido com a mão esquerda e a ponteira do laser de diodo com a mão direita. Imagem gerada no <i>laptop</i> .....	41
Figura 11 - Fotografia do laser de diodo .....	41
Figura 12 - Fotografia da ponteira angulada para a passagem de fibra ótica do laser (adaptada para laringe de coelhos) .....	42
Figura 13 - Fotografia intraoperatória, da fibra ótica do laser diodo sendo acionada no início do procedimento.....	44
Figura 14 - Fotografia da incisão cervical anterior para exérese da laringe, após sacrifício .....	47
Figura 15 - Fotografia da laringe fresca excisada, visão superior.....	47
Figura 16 - Fotografia hemilaringes formolizadas .....	48
Figura 17 - Interface do programa de análise digital de imagem que mostra a micrografia com corte histológico de prega vocal corada com HE em sua visão panorâmica .....	50

Figura 18 - Corte coronal de prega vocal direita de um coelho do Grupo IV, coloração HE, em aumento de 20x.....	51
Figura 19 - Análise histológica da lesão fibrótica causada por diferentes tipos de laser de um coelho do Grupo I.....	54
Figura 20 - Análise quantitativa da fibra colágena nas lesões encontradas nos animais experimentais por meio de colorações específicas e imunoistoquímica através do programa Image Pro .....	56
Figura 21 - Aspecto pós-operatório imediato de coelho do Grupo II .....	66
Figura 22 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I (30 dias, modo de energia - pulsado).....	67
Figura 23 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II (30 dias, modo de energia – contínuo).....	68
Figura 24 - Cortes histológicos, coronais, corados com HE de prega vocal de um mesmo coelho do Grupo III (7 dias, modo de energia - pulsado).....	69
Figura 25 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III (7 dias, modo de energia - pulsado).....	70
Figura 26 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo IV (7 dias, modo de energia - contínuo).....	71
Figura 27 - Corte histológico corado resorcina-fucsina oxidada (RFO).....	74
Figura 28 - Corte histológico de um coelho do Grupo III corado com picrossírus.....	75
Figura 29 - Corte histológico da PV direita de coelho que foi submetido a procedimento com laser de diodo com marcação imunoistoquímica para colágeno tipo I .....	77
Figura 30 - Corte histológico da PV de coelho que foi submetido a procedimento com laser de diodo com marcação imunoistoquímica para colágeno tipo III.....	77



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo III (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado).....	60
Gráfico 2 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo IV (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo).....	61
Gráfico 3 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo II (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo).....	61
Gráfico 4 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo I (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado).....	62
Gráfico 5 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo III (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado).....	63
Gráfico 6 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo IV (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo).....	64
Gráfico 7 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo II (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo).....	64
Gráfico 8 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo I (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado).....	65
Gráfico 9 - Resultados pareados (interligados) da extensão do processo inflamatório de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho .....	72
Gráfico 10 - Resultados pareados (interligados) da profundidade da lesão (processo inflamatório) de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho .....	73
Gráfico 11 - Resultados pareados (interligados) da extensão linear da lesão fibrótica de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho .....	73

## RESUMO

Neri L. *Estudo histológico dos efeitos da lesão com laser diodo 980 nm e 1470 nm em pregas vocais de coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

**INTRODUÇÃO:** Os lasers têm sido utilizados em microcirurgia de laringe, permitindo corte e coagulação simultâneos que, em alguns casos, pode favorecer uma cirurgia exangue e mais precisa. Do ponto de vista vocal, o resultado cirúrgico ideal é aquele em que a lesão é removida com menor dano possível ao tecido adjacente, já que uma cicatrização inadequada da prega vocal pode resultar em disfonia de difícil reparação. O dano colateral dos lasers nos tecidos depende, entre outros fatores, do tipo de laser e de seu comprimento de onda. O laser diodo, quando comparado aos lasers mais utilizados em microcirurgias de laringe, tem como vantagens ser portátil, silencioso, transmite radiação através de uma fibra óptica fina e flexível o que facilita a manipulação do instrumento pelo cirurgião. Entretanto, as reações cicatriciais causadas pelo uso dos diferentes comprimentos de onda do laser diodo (980 nm e 1470 nm) nas pregas vocais ainda não foram estudadas. **OBJETIVO:** O objetivo desta pesquisa é estudar os efeitos histológicos da variação do comprimento de onda do laser de diodo de 980 nm e 1470 nm, no processo de cicatrização de pregas vocais de coelhos, em 7 e 30 dias após a lesão. **MÉTODO:** Vinte coelhos machos da raça *New Zealand* foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com cinco animais em cada grupo. Em cada prega vocal foi realizada uma única lesão por 7 segundos, através do contato da ponta da fibra do laser com a superfície do tecido. De um lado, o laser foi ajustado ao comprimento de onda de 980 nm e na prega vocal contralateral 1470nm. Nos grupos I e III, o modo de entrega de energia foi pulsado, enquanto que, nos grupos II e IV, foi contínuo. Após 30 dias (grupos I e II) e 7 dias (grupos III e IV) as laringes foram excisadas e submetidas a coloração com hematoxilina-eosina, além de coloração para colágeno e elastina. A análise histológica realizada foi quantitativa e subjetiva. **RESULTADOS:** Com o uso do laser diodo foi observado que o tecido apresentava sinais de manipulação (presença de reepitelização e presença de tecido de granulação com fibroblastos). Não foram observadas formações de úlceras, bolhas ou necrose. A extensão linear da lesão fibrótica apresentou diferença significativa, entre os dois comprimentos de onda, sendo maior no laser 980nm, que receberam feixes de laser no modo pulsado, em coelhos

sacrificados 7 dias após a lesão. A densidade das fibras colágenas apresentou-se elevada ao uso do laser 1470 nm no mesmo grupo de animais. **CONCLUSÃO:** O uso de laser diodo demonstrou maior extensão da lesão fibrótica (laser 980 nm, modo pulsado) e maior densidade de colágeno (laser 1470 nm, modo pulsado), em animais na fase inicial (7 dias) da cicatrização. No entanto, ao analisarmos a evolução da cicatrização, tal padrão não fora observado ao longo dos 30 dias. Desta forma, a variação do comprimento de onda do laser diodo, não causou diferenças histológicas significativas na cicatrização inicial.

Descritores: laringe; prega vocal; lasers; cicatrização; colágeno; coelhos

## ABSTRACT

Neri L. *Histological study on the effect of diode laser 980 nm and 1470 nm in vocal folds in a rabbit model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

**INTRODUCTION:** Lasers have been used in endolaryngeal microsurgery, allowing simultaneous cutting and coagulation which, in some cases, may favor a bloodless and more accurate surgery. From a vocal point of view, the ideal surgical outcome is one in which the lesion is removed with the lowest possible damage to the adjacent tissue, since inadequate healing of the vocal fold may result in dysphonia that may be difficult to repair. The collateral damage of the lasers in the tissues depends, among other factors, on the type of laser and its wavelength. The diode laser, when compared to the lasers most used in laryngeal microsurgery, has the advantages of being portable, silent and to the fact it transmits radiation through a thin and flexible optical fiber, which facilitates the manipulation of the instrument by the surgeon. However, the cicatricial reactions caused by the use of different diode laser wavelengths (980 nm and 1470 nm) in the vocal folds have not been studied. **OBJECTIVE:** The aim of this study is to study the histological effects of diode laser wavelength variation of 980nm and 1470 nm in the healing process of vocal folds of rabbits, 7 and 30 days after the injury. **METHOD:** Twenty male New Zealand white rabbits were randomized into four groups, with five animals in each group. In each vocal fold, a single spot injury was performed during 7 seconds, through the contact of the tip of the laser fiber with the surface of the tissue. On one side, the laser was adjusted to the wavelength of 980 nm and on the contralateral vocal fold, 1470 nm. In groups I and III, the mode of energy delivery was pulsed, whereas in groups II and IV, it was continuous. After 30 days (groups I and II) and 7 days (groups III and IV) the larynx were excised and stained with hematoxylin-eosin, in addition to staining for collagen and elastin. The histological analysis was quantitative and subjective. **RESULTS:** With the use of diode laser, the tissue showed signs of manipulation (presence of reepithelialization and presence of granulation tissue with fibroblasts). No ulcer, blister or necrosis formations were observed. The linear extension of the fibrotic lesion showed a significant difference between the two wavelengths, being higher in the 980 nm laser, which received laser beams in the pulsed mode, in rabbits sacrificed 7 days after the lesion. The density of the collagen fibers was elevated to the use of the 1470 nm laser in the same group of animals.

**CONCLUSION:** The use of diode laser showed a greater extension of the fibrotic lesion (980 nm laser, pulsed mode) and a higher density of collagen (laser 1470 nm, pulsed mode) in animals in the initial phase (7 days) of wound healing. However, when we analyzed the evolution of healing, such pattern had not been observed during the 30 days. Thus, the variation of wavelength of the diode laser did not cause significant histological differences in the initial healing of the vocal folds.

Descriptors: larynx; vocal cord; laser; wound healing; collagen; rabbits

# **1 INTRODUÇÃO**

O uso da voz, ainda é o meio primário de comunicação, mesmo com a crescente utilização dos meios digitais<sup>1</sup>. As alterações da qualidade vocal podem influenciar negativamente na qualidade de vida das pessoas, que dependem da voz para a comunicação verbal diária e para as necessidades de socialização<sup>2</sup>.

A fonocirurgia, para exérese de lesões laríngeas, tem como princípio respeitar a estrutura da prega vocal (PV), que embasa a teoria de corpo-cobertura de vibração<sup>3,4</sup>. No entanto, em alguns casos, o resultado de uma microcirurgia de laringe pode ser uma cicatrização inadequada, resultando em disfonia; este tem sido um grande desafio para os laringologistas<sup>5</sup>.

O desenvolvimento de novas terapias, para a prevenção e tratamento de cicatrizes, tem sido o foco de intensa investigação e o objetivo principal de tais pesquisas é possibilitar a remoção das lesões com máxima preservação dos tecidos adjacentes<sup>6-8</sup>.

Apesar de o bisturi frio ser, comumente, utilizado em fonomicrocirurgias, a ressecção de lesões mais extensas pode requerer utilização de cautérios para controle de hemostasia<sup>9</sup>. O uso de cautério foi relacionado, histologicamente, com alto grau de inflamação e necrose os quais prejudicam o processo cicatricial<sup>10</sup>.

Como exemplo do desenvolvimento de tecnologias com o objetivo de melhorar a ressecção da lesão e minimizar o processo cicatricial o laser -

*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* - tem sido utilizado e estudado em cirurgias na laringologia<sup>11,12</sup>.

A funcionalidade destes instrumentos avançados baseia-se na ação de radiação eletromagnética em determinado comprimento de onda. Na cirurgia realizada com este instrumento, feixes de laser são usados, principalmente, como bisturis, ou seja, como ferramentas para realizar incisões e ressecções, no entanto, os efeitos causados pelo laser sobre o tecido são múltiplos, dentre eles: a vaporização e a cauterização<sup>8,13</sup>.

No final da década de noventa, o laser diodo começou a ser utilizado em procedimentos da otorrinolaringologia. Este tipo de laser tem como vantagens ser compacto, portátil, silencioso e transmite radiação através de uma fibra óptica fina e flexível o que facilita a manipulação do instrumento pelo cirurgião<sup>14,15</sup>.

Alguns estudos demonstraram que o uso do laser de diodo pode ser vantajoso quando comparado aos outros tipos de lasers utilizados em fonomicrocirurgias, principalmente, pelo seu efeito de corte e coagulação simultâneo, o que resulta em efeito mínimo no tecido remanescente após a exérese da lesão<sup>16</sup>.

O comprimento de onda dos lasers de diodo disponíveis comercialmente pode variar de 800 nm a 1940 nm, influenciando no efeito tecidual desejado. Comprimentos de onda mais baixos, entre 810 nm e 980 nm, têm maior absorção pela hemoglobina, melanina e pouca absorção pela água, resultando em penetração mais profunda no tecido (até cerca de 4 mm a 5 mm de profundidade). Já lasers com maior comprimento de onda (1470



nm, 1940 nm) têm maior absorção pela água, produzindo, portanto, menor dano térmico adjacente<sup>11,17,18</sup>.

Uma variedade de parâmetros dos lasers é usada no tratamento das lesões laríngeas e sabe-se que, tanto os níveis de energia de laser, quanto os modos de pulso devem ser ajustados para otimizar a precisão de corte e quantidade de hemostasia obtida<sup>8,19</sup>.

Neste contexto, as pesquisas com uso de lasers de diodo em cirurgias laríngeas tornam-se importantes, para definir comprimentos de onda e ajustes mais adequados para seu uso na prática cirúrgica. Nenhum estudo destaca a relação dos parâmetros do laser de diodo (comprimento de onda, energia total, frequência, potência e modo de pulso), com cicatrização da prega vocal na fase aguda e 30 dias após a lesão.

Embora o laser de diodo seja utilizado em fonomicrocirurgia, os efeitos térmicos causados nos procedimentos, ainda não foram investigados<sup>20</sup>.

Faz-se necessária a definição de parâmetros adequados, a serem ajustados durante o procedimento cirúrgico laríngeo, com uso de laser diodo em diferentes comprimentos de onda. Contudo, os achados intraoperatório do grau de lesão promovido por diferentes ajustes do laser nem sempre são confiáveis para estimar seu impacto na cicatrização tecidual<sup>21</sup>. Lesões aparentemente mais extensas durante a cirurgia podem promover alterações menos acentuadas durante a cicatrização das pregas vocais (ppv). Assim sendo, estudos sistemáticos de formação de cicatriz na prega vocal são relevantes para utilização segura do laser diodo nas fonomicrocirurgias<sup>12,22,23</sup>.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos histológicos da variação do comprimento de onda do laser de diodo de 980 nm e 1470 nm no processo de cicatrização de pregas vocais de coelhos em 7 e 30 dias após a lesão, de acordo com os seguintes aspectos:

a) Extensão do processo inflamatório, extensão linear da lesão fibrótica, profundidade do processo inflamatório, padrão da inflamação (tipo de infiltrado e grau de inflamação) e outras características histopatológicas (presença ou ausência de bolhas, necrose, exocitose, espongirose, úlceras, reepitelização, fibroblastos, fibrose, edema de lâmina própria (LP) e tecido de granulação), através da coloração de hematoxilina - eosina.

b) Concentração de fibras elásticas mediante a coloração de resorcina-fucsina.

c) Concentração de colágeno por coloração de picrossírius e imunistoquímica específica para colágeno tipo I e tipo III.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 Histologia da Prega Vocal Humana e da Prega Vocal do Coelho

A histologia da prega vocal humana e a correlação com a produção vocal fisiológica foram primeiramente descritas por Hirano<sup>3</sup>, em 1974. Segundo o autor, a prega vocal humana é histologicamente dividida em: epitélio, camada superficial, camada intermediária e camada profunda da lâmina própria, e músculo vocal. A partir destes conhecimentos, a teoria de corpo e cobertura foi desenvolvida para melhor entendimento da vibração das pregas vocais. Nesta teoria a cobertura móvel, constituída pelo epitélio e camada superficial da lâmina própria vibra sobre um corpo estacionário que é formado pelo ligamento, músculo vocal e cone elástico; desta maneira, uma estrutura mais leve (cobertura) desliza sobre a mais rígida (corpo) durante a fonação<sup>3,4,24,25</sup>.

Havia um consenso bem estabelecido no qual, a estrutura das camadas das pregas vocais seria ajustável às exigências do processo de vibração durante a fonação e sua composição influenciaria na qualidade fonatória<sup>26</sup>. Segundo Ishii *et al.*<sup>27</sup>, a lâmina própria seria a estrutura mais importante da prega vocal pois, é a que mais vibra durante a fonação. Além da importância da estruturação, a composição da matriz extracelular e os tipos celulares presentes na lâmina própria influenciariam diretamente nas propriedades biomecânicas da fonação<sup>28,29</sup>.

Em estudo realizado em laringes humanas excisadas Madruga de Melo *et al.*<sup>30</sup> descreveram a visualização e entendimento organizacional das fibras colágenas, através do uso de microscopia de luz pelo método picrossírius-polarização. As fibras colágenas tipo I e tipo III foram identificadas e sua organização foi descrita com padrão semelhante a um entrelaçado denominada como “cesta de vime”. Na região logo abaixo do epitélio, assim como na região profunda da lâmina própria, superficialmente ao músculo vocal, há presença de fibras colágenas do tipo I, sendo uma faixa estreita logo abaixo do epitélio e uma banda mais densa na proximidade do músculo. Na camada intermediária foi descrita a presença de poucas fibras colágenas do tipo III. Tal modelo difere dos modelos descritos anteriormente, por outros autores, nos quais o arranjo das fibras colágenas era classicamente descrito como fibras paralelas à borda livre da prega vocal e estariam concentradas na camada profunda da lâmina própria<sup>3,27,31</sup>.

A prega vocal do coelho apresenta-se revestida por um epitélio escamoso, estratificado não queratinizado, a membrana basal divide o epitélio da camada da lâmina própria. A lâmina própria pode ser dividida em duas camadas, uma superficial composta por fibras finas de colágeno, entremeadas por pequenas porções de tecido gorduroso e uma camada profunda, constituída por maior quantidade de fibras colágenas grossas sobre um tecido muscular liso subjacente. Há ainda, na camada superficial glândulas submucosas, vasos sanguíneos e linfáticos finos<sup>32</sup>. Não há descrição de estrutura comparável ao ligamento vocal.

As camadas da lâmina própria dos coelhos apresentam, assim como nos humanos, grande quantidade de macromoléculas na matriz extracelular, tais como: ácido hialurônico (AH), colágeno e elastina. Embora existam diferenças estruturais entre a prega vocal humana e a prega vocal de coelhos, este modelo animal tem sido utilizado na investigação sistemática da cicatrização das pregas vocais<sup>33</sup>.

### **3.2 O Coelho como Modelo Animal para Estudos Experimentais em Laringologia**

Alguns autores consideram que os modelos animais fornecem um método ideal para investigar a cicatrização em pregas vocais já que tais estudos não poderiam ser feitos em humanos. O coelho como modelo experimental é um animal economicamente eficiente para análise da cicatrização da prega vocal e demonstra propriedades teciduais semelhantes à humana<sup>5,34</sup>. Contudo, vale ressaltar que não há modelo ideal, pois nenhum animal apresenta anatomia laríngea igual ao ser humano<sup>2</sup>.

Com o uso do coelho destacam-se algumas vantagens, dentre elas a maior precisão no controle de tempo do estudo. Quanto aos aspectos práticos outras características devem ser analisadas, como por exemplo: tamanho do animal, viabilidade técnica para o procedimento, recursos disponíveis, custo de compra e possibilidade de manutenção<sup>35,36</sup>.

Uma limitação ao uso de coelhos é o fato destes animais apresentarem capacidade fonatória diminuída; isto resultaria em menor força mecânica sobre a estrutura da prega vocal quando comparados aos

humanos. Há estudos demonstrando que as forças mecânicas externas podem influenciar o aumento da síntese de pró-colágeno, a expressão gênica de elementos da matriz extracelular e estimular *turnover* do colágeno<sup>37</sup>.

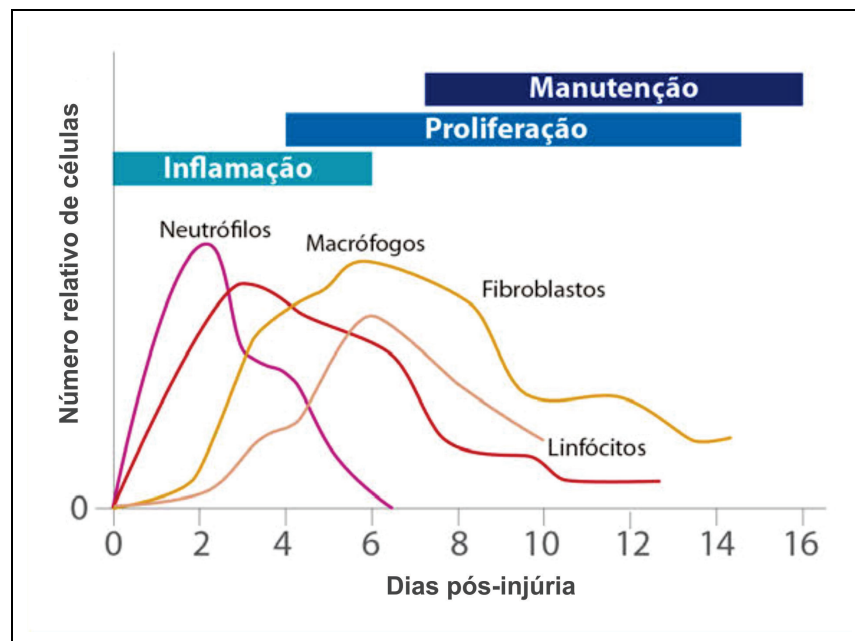
### **3.3 Processo de Cicatrização**

A capacidade regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos<sup>38</sup>. O processo de cicatrização é classicamente descrito na literatura por estudos realizados na pele. As pesquisas sobre processo cicatricial em mucosas são escassas. Desta forma, a descrição dos eventos que ocorrem durante a cicatrização de feridas na pele é utilizada como base para estudos em pregas vocais<sup>39</sup>.

É importante considerar que a cicatrização consiste em um processo dinâmico que envolve inúmeras interações celulares, ao invés de uma simples sequência de eventos consecutivos; dessa forma os estágios, didaticamente divididos, em inflamatório, proliferativo e de remodelação consistem em eventos sobrepostos e interligados (Figura 1)<sup>38,40-42</sup>.

A cicatrização tem como objetivo a restauração da função prévia do tecido lesado; a área danificada pode ser substituída por um tecido organizado, semelhante, em estrutura e função, ao tecido original ou ser substituído por um novo tecido não especializado<sup>43</sup>.





Fonte: Adaptado de Witte e Barboul<sup>42</sup>

**Figura 1 - Relação entre fases da cicatrização e células inflamatórias**

### 3.3.1 Fase inflamatória

A resposta inicial dos tecidos, após uma lesão, é a inflamação aguda. As reações que ocorrem na fase inflamatória têm como função eliminar os tecidos necróticos, proteger contra infecção local e permitir o acesso do sistema imune à área danificada.

O processo de cicatrização de feridas tem início no momento da lesão com a inflamação, esta fase tem duração média de 2 dias, podendo persistir por até duas semanas<sup>44</sup>.

Na resposta inicial há formação de um coágulo de fibrina, o qual proporciona hemostasia e recruta vários tipos celulares para a ferida<sup>45</sup>. Com a injúria tecidual ocorre a lesão dos vasos sanguíneos e consequente hemorragia, associada à exposição plaquetária. A ativação plaquetária resulta na liberação de substâncias vasoativas que causarão

vasoconstricção. Conforme as plaquetas se agregam há a formação do tampão hemostático. Embora a hemostasia possua como função primária a formação do coágulo é interessante citar uma função secundária, igualmente importante, que é o início do processo de cicatrização através da liberação de citocinas e fatores de crescimento<sup>42,46</sup>.

Os neutrófilos são as primeiras células circulantes recrutadas. Sua concentração é mais elevada no 1º e 2º dia pós-injúria; são atraídos pela interleucina 1<sup>47</sup>, fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), fator de transformação do crescimento beta (TGF-  $\beta$ ) e fator plaquetário 4 (PF-4). A função primária dos neutrófilos é a prevenção da infecção bacteriana, somada à ativação de queratinócitos, fibroblastos e células do sistema imune. A migração precoce de queratinócitos ao longo da matriz extracelular de fibrina temporária é vista dentro de horas após a lesão<sup>46-48</sup>.

Os monócitos circulantes chegam 2 a 3 dias após a lesão e diferenciam-se em macrófagos. Sua função, assim como os neutrófilos é antimicrobiana na prevenção da infecção através da produção de óxido nítrico. Os macrófagos, também participam da remoção de tecido necrótico e liberam fatores de crescimento e citocinas que irão regular a fagocitose, angiogênese e síntese da matriz dando início a formação do tecido de granulação<sup>41,49</sup>.

### 3.3.2 Fase proliferativa

Com o fim da fase inflamatória da cicatrização, inicia-se a segunda fase, a proliferativa. Nesta fase, ocorre a reepitelização com formação de uma barreira de permeabilidade, organização do tecido de granulação para reforço do tecido lesionado e angiogênese que promove adequado suprimento sanguíneo<sup>44</sup>.

Os macrófagos adotam um fenótipo anti-inflamatório e pro-fibrótico. Os fatores de crescimento que eles produzem, como o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), recrutam fibroblastos do tecido não lesado circundante<sup>49-51</sup>. Os fibroblastos são responsáveis pela produção de colágeno e ácido hialurônico; a elevação do AH ocorre nas 48 a 72 horas após a lesão, seguida de rápida queda até atingirem níveis pré-lesionais<sup>52</sup>.

Tanto os macrófagos quanto outras células estimulam a migração das células endoteliais para a ferida através da produção de fator de crescimento endotelial (EGF), entre outros fatores, resultando na formação de novos vasos sanguíneos e, portanto, no caráter hipervasculoso do tecido de granulação<sup>53</sup>.

Ocorre a migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos localizados nas bordas da ferida. Ao término da migração, há o deslocamento dos queratinócitos para camadas mais profundas e assim ocorre a reestruturação da membrana basal. Finalmente, há a organização de uma epiderme estratificada<sup>44,46</sup>.

### 1.3.3 Fase de maturação

A principal característica da fase de maturação é a deposição de colágeno. Para a cicatrização, clinicamente, é a fase mais importante, pois a quantidade, qualidade e velocidade com as quais ocorre a deposição da matriz irão determinar a resistência e o padrão da cicatriz final<sup>42</sup>.

A contração da ferida ocorre de 4 a 5 dias após a injúria tecidual. A continuidade do tecido é dada pelo movimento centrípeto de recuperação - borda da ferida para o centro – isto promove a redução do tamanho da ferida facilitando a cicatrização; neste processo estão envolvidos os miofibroblastos e os fibroblastos<sup>54</sup>.

O tampão de fibrina formado na fase inflamatória é substituído pelo tecido de granulação que, inicialmente, é rico em colágeno tipo III e vasos sanguíneos, posteriormente no tecido cicatricial há predomínio do colágeno tipo I e menor quantidade de vasos sanguíneos<sup>54,55</sup>. O pico máximo de colágeno ocorre entre 5 e 7 dias da lesão, seus níveis se estabilizam após 21 dias e ao longo da maturação tecidual seus níveis são semelhantes ao presente na pele saudável; no entanto, a organização estrutural normal – que é semelhante a “cesta de vime” – e sua tensão jamais irão se recuperar completamente. Na cicatriz as fibras de colágeno se dispõem paralelamente à pele, inicialmente são finas e engrossam gradualmente se organizando na linha de tensão da cicatriz<sup>56,57</sup>.

### 3.4 Cicatrização na Prega Vocal

As propriedades físicas das pregas vocais são alteradas pela cicatrização do tecido, as modificações descritas na relação corpo-cobertura interferem na propagação da onda mucosa. As alterações estruturais, clinicamente, resultam em disfonia, perda do controle vocal e fadiga<sup>33</sup>.

Segundo Branski *et al.*<sup>58</sup>, existem poucos trabalhos nos quais o processo cicatricial das pregas vocais são investigados. Pode-se afirmar que a cicatrização da prega vocal é semelhante ao processo descrito na derme. No entanto, sabe-se que a estrutura da lâmina própria está organizada para absorver maior impacto mecânico quando comparada a derme. Isto se justifica devido a prega vocal apresentar maior movimentação, assim como sua exposição ao estresse mecânico durante a fonação; o autor também descreve que pequenas alterações na lâmina própria podem ser corrigidas, sem que todo o processo de cicatrização seja ativado<sup>59</sup>.

Em estudo realizado por Thibeault *et al.*<sup>33</sup>, 11 coelhos foram submetidos a lesão cirúrgica na prega vocal; após 60 dias foram realizadas a análise histológica e reológica dos grupos. Foram observadas distribuições desorganizadas do colágeno por todas as camadas da lâmina própria, com redução da densidade do mesmo, quando comparados com o controle normal, isto representaria o processo de síntese e deposição do colágeno durante a fase precoce do remodelamento. Soma-se a este achado a redução na densidade da elastina na prega vocal em cicatrização e não foram encontradas diferenças em relação ao ácido hialurônico entre os grupos.

Rousseau *et al.*<sup>34</sup>, realizaram estudo em modelo canino descrevendo aspectos histológicos e reológicos da cicatrização na prega vocal após dois e seis meses da lesão cirúrgica. Foi descrito um aumento da densidade de procolágeno (precursor do colágeno) no 2º mês, com estabilização de seus níveis no 6º mês. O alcance da fase madura da cicatrização foi observado no 6º mês através da presença de feixes desorganizados de colágeno na lâmina própria. As fibras de elastina apresentavam-se desorganizadas e com densidade reduzida nos períodos. Em relação ao ácido hialurônico não foram observadas diferenças. Estes achados sugerem que o sistema do colágeno ainda não está totalmente estabilizado, mesmo após seis meses de injúria, diferentemente da derme que apresenta estabilização em torno de 21 dias.

Rousseau *et al.*<sup>5</sup> estudaram cicatrização crônica em pregas vocais de coelhos e descreveram aumento do colágeno e formação de feixes na prega vocal cicatrizada, a elastina mantinha-se desorganizada e fragmentada.

Branski *et al.*<sup>39</sup>, descreveram a cicatrização da prega vocal do coelho após lesão cirúrgica, realizando completo desnudamento do epitélio e lâmina própria em toda sua extensão. Em torno do 3º dia ocorre a fase proliferativa com aumento de células inflamatórias, fibroblastos e a deposição de uma neolâmina própria. No 5º dia ocorre a deposição de uma neomatriz com reepitelização completa e no 7º dia é descrito a deposição de colágeno mais maduro.

### 3.5 Laser

A teoria clássica entre a luz e a matéria foi desenvolvida por H.A. Lorentz, em 1952<sup>60</sup>.

A palavra LASER é um acrônimo advindo do inglês para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. O “LA” é um fluxo luminoso de alta densidade de energia que quando emitido por radiações produzem a destruição celular através de vaporização com imediata hemostasia<sup>61</sup>.

Apesar de teoria ser apresentada em 1952, os primeiros estudos experimentais envolvendo a interação coerente entre a luz e sistemas atômicos apareceram após a invenção do laser por T. H. Maiman e Javan, no início da década de 1960. Este primeiro laser desenvolvido utilizava como seu meio ativo um cristal de rubi<sup>62,63</sup>. Mais tarde outros sistemas físicos foram criados utilizando gases semicondutores, como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em mistura com o hélio e nitrogênio. Com o desenvolvimento do laser de CO<sub>2</sub> (Yahr e Strully, em 1966) experimentos em laringe de cães foram realizados por Jako, em 1968<sup>61</sup>.

Rapidamente o laser foi incorporado ao meio médico devido a sua boa propriedade de corte e hemostasia. Suas características de onda contínua, alta potência de saída e capacidade de concentrar seu feixe em pequena área, foram consideradas características positivas para o uso cirúrgico desta tecnologia. Os primeiros aparelhos de lasers foram considerados danosos aos tecidos e os ajustes do comprimento de onda ( $\lambda$ ) para melhor absorção ao tecido foram estudados durante anos<sup>64,65</sup>.

O primeiro estudo em laringe humana utilizando o laser, no caso de CO<sub>2</sub>, foi realizado por Strong e Jako, em 1972<sup>66</sup>. Posteriormente, em 1975, Strong apresenta um estudo no qual 11 pacientes com neoplasia laríngea (T1) foram adequadamente tratados utilizando laser de CO<sub>2</sub><sup>67</sup>. Através de observações das desvantagens do laser de CO<sub>2</sub>, como acesso em linha reta através de microscópio cirúrgico, alto custo e grandes dimensões do aparelho, outros lasers foram produzidos a partir da década de 1980, e cada um deles apresenta características e indicações específicas<sup>68</sup>.

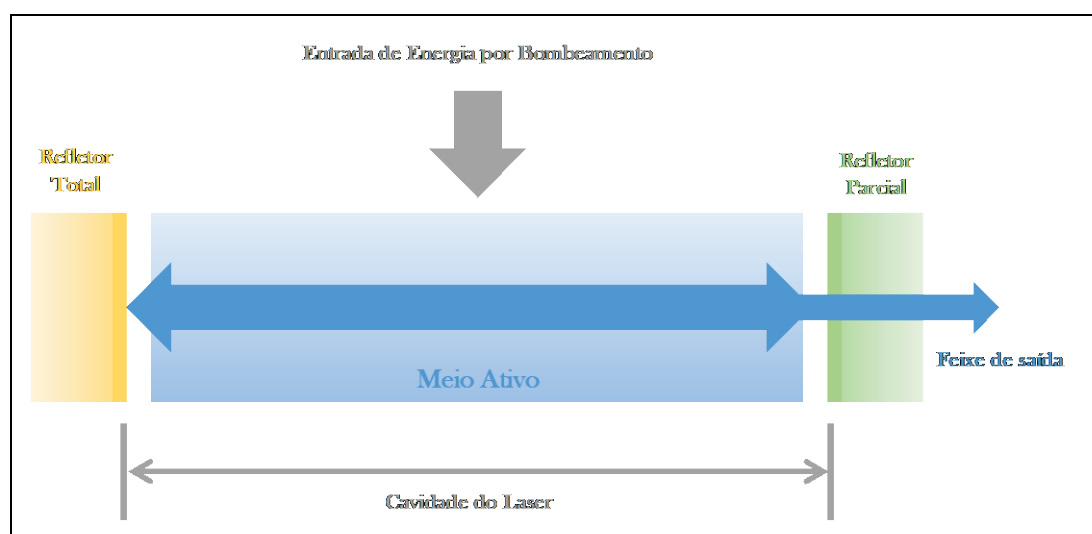
### **3.5.1 Princípios do funcionamento do laser**

Um laser é constituído por uma cavidade óptica ressonante, formada por dois espelhos (um 100% refletivo e outro parcialmente refletivo 98-95%) paralelos entre si, separados por uma região ativa. O espelho semi-refletivo é utilizado para fornecer a realimentação óptica, formando assim a cavidade ressonante. Para que ocorra a ação do laser é necessária a inversão da população no meio ativo do laser, ou seja, a população no estado excitado deverá ser maior que a população no estado fundamental. Essa inversão ocorre através da injeção de corrente elétrica na região ativa do laser<sup>8,69</sup>.

Segundo a descrição de De Martin Junior<sup>70</sup>, o funcionamento do laser pode ser dividido em quatro etapas: na primeira os elétrons encontram-se no estado fundamental (laser *off*); após a injeção da corrente na região ativa, os elétrons absorvem a energia e passam para um nível de energia excitado (etapa 2). O decaimento espontâneo de um dos elétrons para o estado fundamental origina um fóton, adicionando assim, luz a cavidade. A porção



de luz gerada por esses elétrons é refletida no espelho da cavidade e interage novamente com elétrons (etapa 3). Quando um fóton exerce interação com um elétron no estado excitado, esse elétron passa do estado fundamental e origina dois fótons com mesma fase, frequência, polarização e direção. Esse processo proporciona a amplificação da luz por emissão estimulada, uma parcela da luz gerada é refletida para dentro da cavidade do laser por um espelho semi-refletor, permitindo a saída de luz para sua utilização (etapa 4). Ou seja, uma vez que o sistema tenha uma quantidade suficiente de energia, uma parte fracionária da luz presa na cavidade escapa através de um dos espelhos que refletem. A luz que escapa da cavidade forma o feixe do laser de saída. Vários materiais diferentes podem ser utilizados como meio ativo, estes incluem: sólidos, gases, líquidos e semicondutores. A escolha do meio determina o comprimento de onda no qual ocorre a emissão estimulada. A estrutura básica para produção do laser, está exemplificada a seguir (Figura 2).

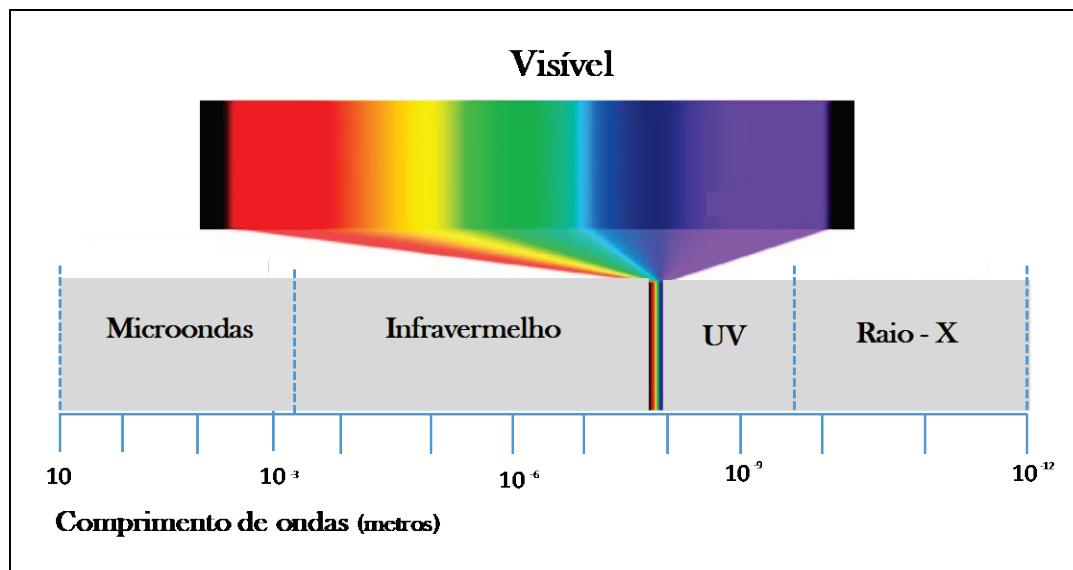


Fonte: Adaptado de Fichera<sup>8</sup>

**Figura 2 - Estrutura básica de um sistema de laser**

A compreensão da natureza da luz é baseada no fato de que ela exibe propriedades de ondas eletromagnéticas e de partículas elementares, esta característica é conhecida como a dualidade onda-partícula. As ondas eletromagnéticas podem ser consideradas como a perturbação produzida pela interação de campos elétricos e magnéticos mutuamente relacionados. Cada par de campos elétricos/magnéticos é caracterizado por um comprimento de onda ( $\lambda$ )<sup>8</sup>. A unidade utilizada para expressar esta grandeza, geralmente é o nanômetro ( $10^{-9}$  do metro = nm). Dentro desse espectro, existem ondas que podemos enxergar, como as luminosas, e outras que não são visíveis. Na escala de comprimento de onda, aquela situada abaixo da faixa visível é denominada “ultravioleta”, enquanto a que está acima, “infravermelha”<sup>71</sup>.

Em geral, a radiação é classificada de acordo com a gama de comprimentos de onda que ele contém. O espectro eletromagnético inclui os comprimentos de onda da radiação, na Figura 3, podemos observar um intervalo desde comprimentos de ondas mais longos (microondas) até mais curtos (raios x)<sup>8</sup>.



Fonte: Adaptado de Fichera<sup>8</sup>

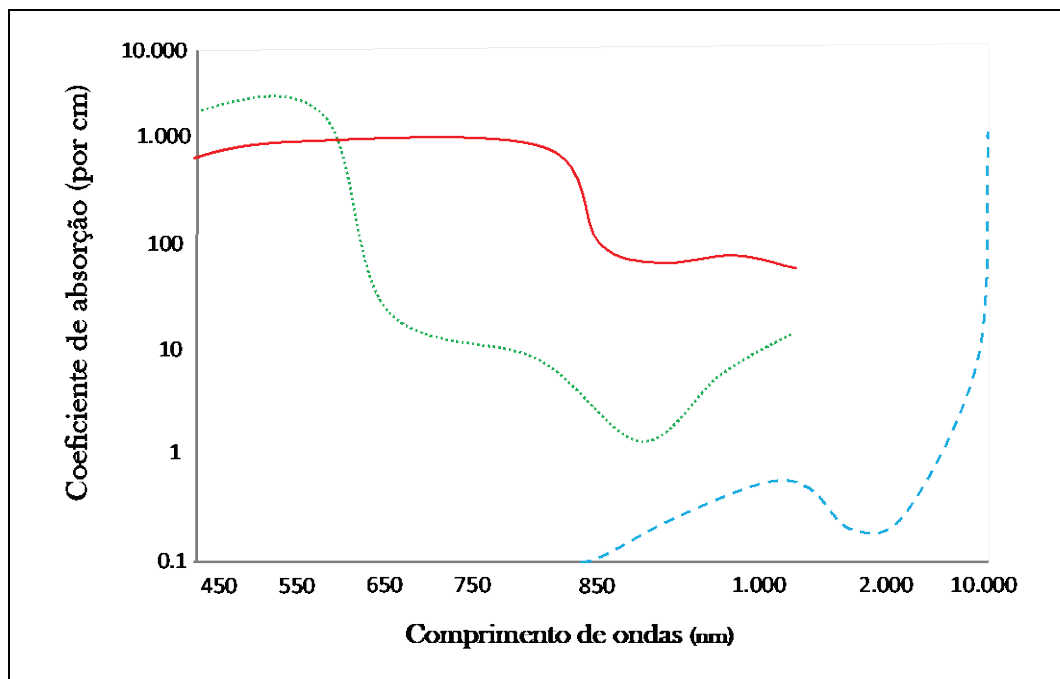
**Figura 3 - Spectrum eletromagnético**

Na teoria, em sua forma mais simples de descrição, a luz é o transporte de energia através de uma região do espaço. O transporte é associado com o fluxo de partículas subatômicas, chamadas fótons, que possuem diferentes comprimentos de ondas e são propagados em várias direções. Dessa maneira, a luz é considerada difusa e costuma ser menos intensa<sup>8,64,69</sup>.

O laser é um tipo de luz resultante do processo de emissão estimulada; os fótons emitidos apresentam a mesma fase, frequência e direção. Isso resulta nas características específicas do laser: ser unidirecional, coerente e monocromático. A unidirecionalidade ocorre devido aos fótons idênticos se propagarem em direções paralelas. A luz emitida tem único comprimento de onda, caracterizando seus fótons como de “cor pura” ou monocromáticos e é considerada uma luz coerente, já que os picos e vales de cada onda coincidem em direção, amplitude, comprimento e fase<sup>64,69</sup>.

A energia criada por uma fonte de luz pode ser entregue à matéria e alterar as suas propriedades físicas. A interação da luz com a matéria depende da quantidade de energia, bem como do tamanho da área sob irradiação. A maioria das interações do laser com os tecidos são induzidas pela absorção da energia do laser no interior do volume dos tecidos. Neste ponto, as interações térmicas desempenham um papel importante na cirurgia a laser<sup>8</sup>.

Em geral, os tecidos apresentam diferentes coeficientes de absorção e de difusão. Inúmeros trabalhos relatam valores tabelados desses coeficientes em diversos tecidos e para diferentes comprimentos de onda. No entanto, pequenas variações dos valores apresentados podem ser observadas na prática, devido à falta de homogeneidade inerente aos tecidos biológicos. Estes podem apresentar variações na quantidade de sangue, de água, e de melanina<sup>72</sup>. A profundidade de penetração do tecido é definida pelo comprimento de onda em um mesmo tecido, diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção. Por exemplo, o laser de CO<sub>2</sub> apresenta uma emissão na faixa do infravermelho centrado em 10.600 nm, sua característica é ser absorvido pela água, de forma a vaporizar os tecidos que contenham grande quantidade de água no interior de suas células<sup>73</sup>. O laser de diodo 1470 nm também tem como característica ser absorvido por tecidos ricos em água, mas essa absorção é menor quando comparado ao laser de CO<sub>2</sub><sup>11,74</sup>. Ao analisar o laser de diodo de 980 nm, este possui excelente propriedade hemostática, uma vez que, possui melhor absorção pela melanina e pela hemoglobina<sup>11,14,17</sup>. A análise dos cromóforos teciduais absorvidos por cada comprimento de onda está demonstrada na Figura 4.



Fonte: Adaptado Dilkes *et al.*<sup>78</sup>

**Figura 4 - Coeficientes de absorção aproximados dos principais cromóforos teciduais (—) melanina (.....) hemoglobina ( - - - - ) água e sua relação com comprimento de onda**

A potência útil do laser é expressa em Watts, no entanto, tal grandeza isolada não tem importância, pois a energia depositada em um tecido depende também, do tempo de exposição à radiação. Desta maneira, a definição de energia é definida pela multiplicação da potência (W) pelo tempo de exposição (em segundos) gerando um resultado representado por Joule. No caso do laser de diodo, este pode ser configurado quanto ao modo de emissão sendo as opções: emissão da luz pulsada ou ininterrupta (contínua)<sup>64</sup>.

### 3.5.2 Laser de diodo

Inicialmente, estes dispositivos de laser se desenvolveram rapidamente, pois o grande interesse em sua aplicação era na comunicação por fibras ópticas. Em 1962, o Centro de Pesquisa chefiado por Robert N. Hall demonstrou pela primeira vez, a amplificação da luz por emissão estimulada em semicondutores. O laser de diodo possui como meio ativo básico um diodo chamado junção de semicondutores P e N (P-N), que se caracteriza por apresentar duas placas condutoras dispostas uma sobre a outra. Em geral, os lasers de diodo comerciais são do tipo heterojunção, ou seja, seu meio ativo é caracterizado pela união de dois materiais distintos (como por exemplo: *gallium, aluminium, arsenide*)<sup>75</sup>.

A vantagem de utilizar um semicondutor é que estes são emissores de pequenas dimensões, permitindo a comercialização de aparelhos pequenos e portáteis, de fácil manipulação, menor custo e alta durabilidade. Os lasers de diodo, atualmente comercializados, possuem comprimento de onda entre 800 a 1940 nm e são capazes de transmitir ao tecido alvo, diferentes valores de energia<sup>11,15,18,76</sup>. O laser de diodo, que tem o comprimento de onda 810 nm é muito bem absorvido por tecidos pigmentados com presença de melanina ou hemoglobina e possui pouca absorção pela água; a sua profundidade de penetração no tecido é de 4 mm a 5mm resultando em corte e hemostasia. O comprimento de onda 980 nm tem maior absorção pela água quando comparado ao laser de 810 nm gerando menor dano térmico lateral, mas também tem como característica absorção por cromóforos como a melanina e hemoglobina. Ao compararmos

o laser 1470 nm, este tem absorção ainda maior pela água que o laser de 980 nm e estudos sugerem menor dano tecidual devido a estas características<sup>11,17,72,74,77</sup>.

É postulado que sistemas de laser diodo, os quais emitem luz de comprimentos de onda na região espectral próximo ao infravermelho (980 nm, 1470 nm), possuem uma potência de saída a qual induziriam a vaporização combinada com hemostasia numa proporção semelhante. Uma absorção efetiva pela hemoglobina e pela água do tecido são os processos iniciais de interação o que causa a formação de calor<sup>13</sup>.

Comparando-se o laser KTP, o laser de diodo de 980 nm e o laser *Holmium: yttrium-aluminium-garnet* (Ho:YAG), estes sistemas mostraram profundidade semelhante de destruição tecidual não reversível (8 mm, 10 mm e 7 mm) enquanto que para o laser de diodo de 1470 nm a profundidade foi menor<sup>13</sup>.

O laser diodo é conduzido por uma fibra óptica que pode ser manipulada através de uma sonda pelo cirurgião, sua forma de aplicação pode ser através do contato direto com o tecido ou a uma distância de poucos milímetros deste. Tais características, determinam maior precisão na técnica cirúrgica<sup>12,14</sup>.

Durante a interação do laser com o tecido alvo, a energia do laser é absorvida sob a forma de calor, determinando um aumento da temperatura local. Diferentes efeitos podem ser produzidos no tecido, dependendo do valor, duração e pico de temperatura alcançada. Estes efeitos variam de hipertermia - vaporização - carbonização. No âmbito da cirurgia a laser, os

efeitos térmicos induzidos pelo laser apresentam grande importância. A vaporização é o processo por meio do qual são realizadas as incisões. Embora, alguns efeitos do laser sejam vantajosos, outros podem ser prejudiciais; é o caso da carbonização, a qual determina a formação de tecido cicatricial, diminuindo assim, a qualidade do procedimento cirúrgico<sup>8</sup>.

### **3.5.2.1 Laser de diodo em otorrinolaringologia**

O uso de laser diodo em otorrinolaringologia já foi descrito em diversos procedimentos como: amigdalectomia, uvulopalatofaringoplastia, turbinoplastia, fotocoagulação de hemangiomas, polipectomia nasal, tratamento de lesões causadas por agentes cáusticos nas vias aéreas superiores e do trato digestivo, cirurgias bucomaxilofaciais, ressecção de cistos subglóticos em crianças, estapedotomias<sup>12,14,15,17,22,78-80</sup>. No primeiro estudo publicado por Dilkes *et al.*<sup>78</sup>, em 1994, os parâmetros utilizados para diversas cirurgias otorrinolaringológicas foram descritos.

Em 2000, o uso do laser de diodo foi descrito para realização de miringotomia nos casos de otite média com efusão, com potência de 3-4W e o laser na forma contínua. Em geral, quanto maior o tamanho do círculo realizado na membrana timpânica, mais tempo esta permanece permeável. A timpanotomia de 3 mm poderia permanecer aberta por 3 a 4 semanas<sup>61</sup>.

Em 2000, Poe *et al.*<sup>81</sup> publicaram estudo utilizando laser diodo para estapedectomia e concluíram que o uso de endoscópios de alta resolução, juntamente ao laser de diodo podem melhorar a visualização do estribo, aumentando a capacidade de realizar cirurgia minimamente invasiva.



Em 2002, Newman e Anand<sup>15</sup> realizaram ambulatorialmente, sob anestesia tópica, o uso de laser com objetivo de reduzir o volume dos cornetos inferiores. A fibra ótica foi utilizada na forma de não contato, ficando cerca de dois a três milímetros de distância do tecido. Para melhor resultado os parâmetros foram ajustados para 4 W a 6 W e duração de 100 a 140 segundos. Outro procedimento descrito por estes mesmos autores, realizado no centro cirúrgico, foi a cauterização de telengectasias nasais com uso do laser também ajustado para 4 W-6 W.

Em 2004, estudo realizado com 30 crianças submetidas à amigdalectomia e publicado por D'Erità e Marsh<sup>82</sup>, demonstraram que o laser diodo causaria menor dor no pós-operatório e assim, menor uso de medicações analgésicas quando comparado ao uso do cautério monopolar.

Os autores D'Erità e Lens<sup>83</sup>, em 2008, demonstraram o uso do laser de diodo de contato, comprimento de onda de 810 nm, para o reparo endoscópico transnasal de atresia de coana óssea bilateral, em quatro recém-nascidos de baixo peso.

Em estudo prévio, Angiero *et al.*<sup>84</sup>, utilizaram o laser diodo, de 810 nm a 830 nm (potência de 2,5 W, fibra flexível de 320 µm, modo de energia contínuo), para realização de cirurgia em glândulas submandibulares de 25 pacientes. O diagnóstico foi sialolitíase com pedras no ducto da glândula salivar acima do hilo glandular. Foi considerado pelos autores um procedimento cirúrgico seguro, com baixa taxa de complicações e uma alternativa válida à cirurgia tradicional. Já em 2014, Luers *et al.*<sup>85</sup>, publicaram um estudo para demonstrar a efetividade do uso do laser de diodo de 980

nm (potência de 6W, frequência de 6Hz, fibra flexível de 200µm) para litotripsia de sialolitíses *in vitro*. As pedras localizadas em tubo de silicone foram colocadas em contato direto com o laser, a fragmentação das pedras salivares foi observada sem aumento da temperatura adjacente; antes da realização de estudos em humanos os autores sugerem realização de estudo em animais.

O estudo publicado por Havel *et al.*<sup>86</sup> tinha como objetivo comparar o efeito de coagulação de tecido e sintomas dos pacientes, utilizando o laser diodo 1.470 nm e o laser 940 nm no tratamento de hipertrofia de cornetos inferiores. O procedimento foi realizado em 20 pacientes, sob anestesia tópica, em uma fossa nasal foi aplicado o laser 1470 nm na potência de 4 W a 5 W, e na outra fossa nasal 940 nm na potência de 12 W, modo de não contato, o laser foi utilizado até o branqueamento do tecido. A conclusão do estudo foi que o uso do laser de diodo de 1470 nm é uma boa alternativa para tratamento da hiperplasia de cornetos, pois este comprimento de onda é capaz de reduzir o tamanho dos cornetos inferiores com menor uso de energia e em menor tempo.

O uso de laser de diodo 1470 nm, para amigdalectomia foi comparado com uso laser de CO<sub>2</sub> no estudo realizado por Havel *et al.*<sup>87</sup>. A cirurgia foi realizada em 21 crianças, de um lado foi utilizado o laser de CO<sub>2</sub> (potência 12 W, modo contínuo), no lado contralateral o laser diodo 1470 nm (potência de 15 W, modo de contato e contínuo). Não houve diferença no escore de dor pós-operatória e na cicatrização quando os grupos foram analisados. No entanto, em comparação ao laser de CO<sub>2</sub>, o laser de diodo 1470 nm

proporcionou excelente capacidade de corte combinada com menor sangramento intraoperatório; o menor sangramento proporcionou um tempo cirúrgico mais curto, sendo sua utilização uma boa alternativa.

Elbadawey *et al.*<sup>88</sup>, fizeram um estudo comparando cirurgias realizadas com laser de diodo, *coblation* e instrumento frio para o procedimento de amigdalectomia em 120 pacientes. Os resultados apontam para menor sangramento e menor tempo cirúrgico ao utilizar tanto o *coblation* quanto o laser de diodo. No entanto, o escore de dor pós-operatória (na 1ª semana) foi maior com uso de laser de diodo quando comparado ao uso de *coblation*.

Recentemente, um estudo publicado em 2018 sugeriu o uso do laser diodo como uma nova alternativa para pacientes cirúrgicos com otosclerose<sup>80</sup>.

### **3.6.2.2 Laser de diodo em laringe**

O primeiro estudo que relata o uso de laser de diodo em laringe foi publicado em 1995, por Wang *et al.*<sup>89</sup>, que realizaram experimento em laringes caninas utilizando o laser no comprimento de onda 810 nm, com baixa potência.

No ano de 2000, Jameson *et al.*<sup>90</sup> publicaram um *short scientific communication*, revelando a possibilidade de procedimentos com laser em região subglótica, associado a ventilação por máscara laríngea e uso de broncoscópio. O laser de diodo utilizado tinha como comprimento de onda 980 nm, e fibra de 400 µm.

Diversos autores, a partir de 2003, iniciaram a publicação de suas experiências com uso de laser diodo em laringe, estes autores descreveram procedimentos para exérese de granulomas, tratamento de laringomalácia, pólipos em prega vocal, *web* laríngeo, carcinoma glótico, paralisia de prega vocal, estenose e hemangioma na região subglótica<sup>11,12,14,16,23,91-96</sup>.

Os parâmetros adequados a serem utilizados durante uma cirurgia com laser diodo ainda não são definidos, uma vez que, em cada estudo as combinações destes parâmetros são variáveis<sup>20</sup>. Algumas complicações foram descritas, dentre elas infecções, formação de sinéquias, granulomas e também há relato de exposição da cartilagem durante o procedimento<sup>11,12,23,93</sup>.

A literatura ainda é pobre ao descrever a extensão da lesão causada pelo uso do laser diodo nas pregas vocais, assim como a descrição das modificações histológicas no tecido cicatricial com uso dos diferentes comprimentos de onda do laser de diodo disponíveis.

## **4 MÉTODOS**

#### **4.1 Aspectos Éticos e Desenho do Estudo**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 163/14 em 27 de janeiro de 2015 (Anexo A).

Os coelhos não sofreram ferimentos ou procedimentos desnecessários, respeitando-se as normas éticas postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com a lei nº 11.794/08, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais<sup>97</sup>.

Foi realizado estudo exploratório em animais.

#### **4.2 Seleção da Amostra**

##### **4.2.1 Critérios de inclusão**

Coelhos brancos da Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), sexo masculino, sadios, jovens, com massa corporal entre 2,8 kg e 3,5 kg, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP.

#### 4.2.2 Critérios de exclusão

- Coelhos em uso de qualquer medicação.
- Coelhos com ferimentos em qualquer área do corpo ou se recuperando de qualquer dano.
- Coelhos com alteração da anatomia laríngea (Figura 5) ou com difícil laringoscopia.



**Figura 5 - Fotografia da prega vocal de coelho excluído do estudo por apresentar alteração laríngea - granuloma de prega vocal esquerda**

#### 4.3 Amostra, Grupos do Estudo e Local do Estudo

##### 4.3.1 Local do estudo

Os procedimentos foram realizados no Centro de Bioterismo da FMUSP.

### **4.3.2 Amostra e grupos de estudo**

Inicialmente, foram realizados procedimentos pilotos em quatro coelhos a fim de aprimorar as técnicas, adequar os parâmetros utilizados do laser e minimizar possíveis falhas que pudessem interferir no andamento e resultados do estudo (ver item 4.6.1).

Para se obter o parâmetro histológico de normalidade da prega vocal, um coelho foi sacrificado sem ser submetido ao experimento. Para o estudo em si, foram utilizados vinte coelhos. A amostra foi, aleatoriamente, dividida em quatro grupos com cinco animais em cada grupo; utilizamos alguns parâmetros fixos do laser, ou seja, aqueles que se repetiam em todos os procedimentos (potência, frequência e tempo de lesão) e outros parâmetros variáveis (modo de energia do pulso, comprimento de onda e tempo de sacrifício) os quais modificavam conforme o grupo e prega vocal. As comparações em relação aos parâmetros variáveis foram feitas entre as pregas vocais de um mesmo animal.

Os comprimentos de onda utilizados foram 1470 nm e 980 nm e os parâmetros de ajuste fixos e variáveis foram baseados em estudo piloto. Os parâmetros fixos do laser de diodo foram: frequência de onda (10 - medida em Hertz), potência (três - medida em Watts), tempo da lesão (7 - medido em segundo); os parâmetros variáveis: modo de energia (pulsado x contínuo), comprimento de onda (980 nm x 1470 nm) e tempo de sacrifício (7 e 30 dias).

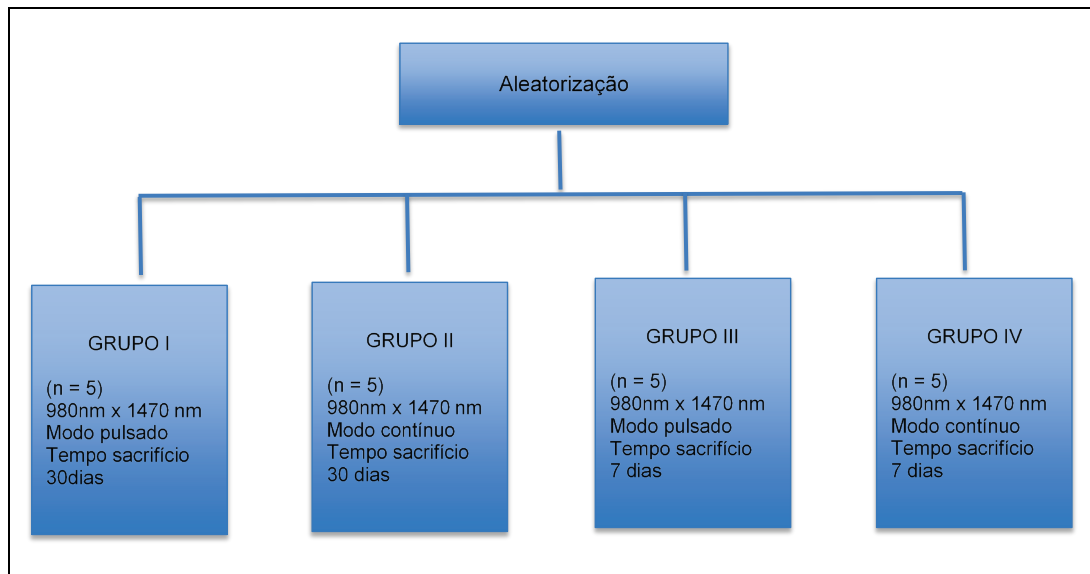
A prega vocal de um mesmo coelho foi, aleatoriamente, randomizada sendo que uma recebeu intervenção com o laser de diodo com comprimento



de onda de 1470 nm e a contralateral com 980 nm de comprimento de onda (site *randomization.com*). O cirurgião não teve acesso à lista de aleatorização durante o ato cirúrgico (Anexo B).

Segue abaixo a distribuição dos grupos do estudo (Figura 6):

- Parâmetros fixos: Potência - 3 W,  
Frequência: 10 Hz,  
Tempo de lesão: 7 segundos,  
Fibra óptica: 400  $\mu$ m
- Grupo I: em uma das pregas vocais foi usado laser de 980 nm e na prega vocal contralateral de 1470 nm, sendo o modo de emissão pulsado, tempo de sacrifício do coelho 30 dias.
- Grupo II: em uma das pregas vocais foi usado laser de 980 nm e na prega vocal contralateral de 1470 nm, sendo o modo de emissão contínuo, tempo de sacrifício do coelho 30 dias.
- Grupo III: em uma das pregas vocais foi usado laser de 980 nm e na prega vocal contralateral de 1470 nm, sendo o modo de emissão pulsado, tempo de sacrifício do coelho 7 dias.
- Grupo IV: em uma das pregas vocais foi usado laser de 980 nm e na prega vocal contralateral de 1470 nm, sendo o modo de emissão contínuo, tempo de sacrifício do coelho 7 dias.



**Figura 6 - Organograma de aleatorização dos grupos de estudo**

#### 4.4 Procedimento Pré-Operatório

Os animais foram mantidos em jejum por três horas antes do procedimento. Foram pesados e identificados com tatuagem na orelha esquerda.

#### 4.5 Anestesia dos Animais

A anestesia utilizada nos animais foi sedação induzida com administração intramuscular de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) e os animais foram mantidos sob ventilação espontânea.

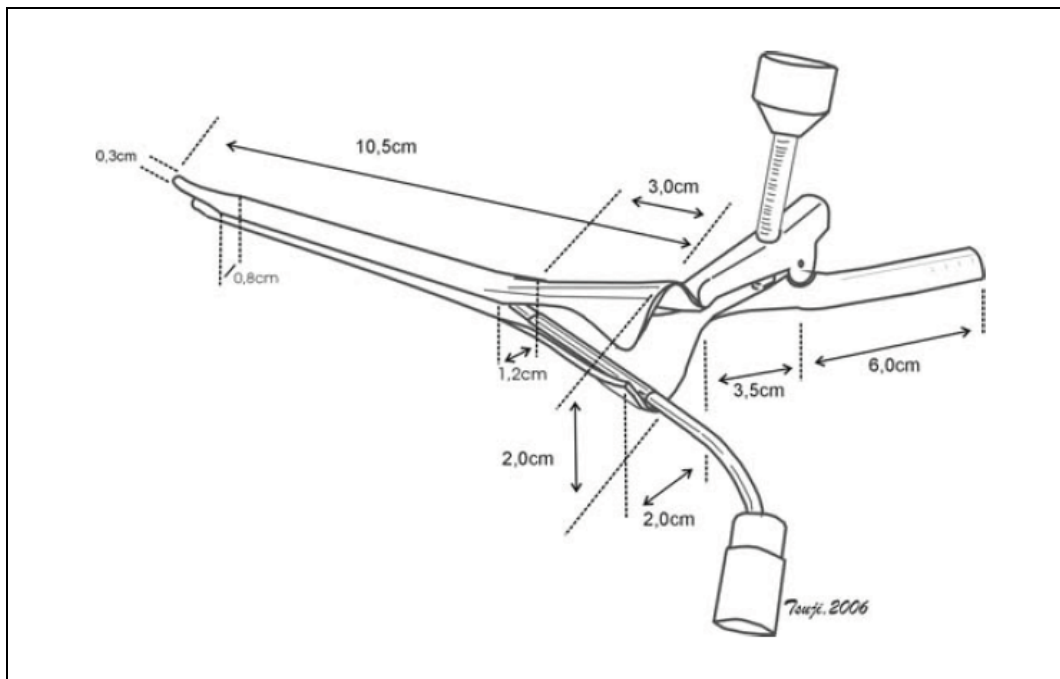
#### 4.6 Procedimento Cirúrgico

Após a sedação, os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal, hiperextensão cervical através do uso de um coxim dorsal e submetidos a laringoscopia direta. A laringoscopia foi realizada com um instrumento confeccionado no ano de 2006, pela empresa Ferrari® Medical de São Paulo, a pedido do grupo de Laringologia da FMUSP sob direção do Prof Dr Domingos Tsuji; já utilizado e descrito por Arroyo-Ramos *et al.*<sup>21</sup>, Campagnolo *et al.*<sup>98</sup>, Dias Garcia *et al.*<sup>99</sup> e Takahashi-Ramos<sup>100</sup> (Figuras 7 a 9).

Após a laringoscopia a intervenção das pregas vocais foi realizada sob orientação visual usando um telescópio rígido de 4,0 mm, com angulação de 30 graus (Karl Storz®, Alemanha) conectado a uma câmera para endoscopia (Ferrari® Medical, modelo MFX-10H, Brasil) e as imagens eram visualizadas na tela de um *laptop* (MacBook Air, Apple, Mac OS X Lion 10.7.5, USA). Após realizar a laringoscopia de suspensão, o pesquisador segurou o telescópio com a mão esquerda e a ponteira do laser de diodo própria para procedimentos em coelhos (Cânula ENT Modelo X2-400-10-140-30 ST, DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda. [DMC]) com a mão direita (Figura 10).

Foi utilizado o laser de Diodo Medlaser (DMC, Carlos, SP. Número de série: 2160. Registro na ANVISA: 80030810129) com comprimentos de onda 980 nm e 1470 nm (Figura 11); utilizando uma fibra ótica de 400 µm de diâmetro (Modelo: Kit Introdutor para Cateter FO 400, DMC, São Carlos) através de uma ponteira confeccionada para laringe de coelhos (Figura 12).

Todos os procedimentos foram realizados pelo pesquisador, o mesmo não teve acesso à lista de aleatorização durante o ato cirúrgico, quanto ao modo do pulso (contínuo x pulsado) e ao comprimento de onda a ser utilizado em cada prega vocal. Estes ajustes foram realizados por um técnico alheio ao estudo.



**Figura 7 - Desenho esquemático do laringoscópio com suas medidas. Modelo desenvolvido de acordo com a anatomia de coelhos**



**Figura 8 - Fotografia do laringoscópio (visão lateral) e visão externa da sua posição ao realizar a laringoscopia no coelho**



**Figura 9 - Fotografia da realização da laringoscopia pela pesquisadora**

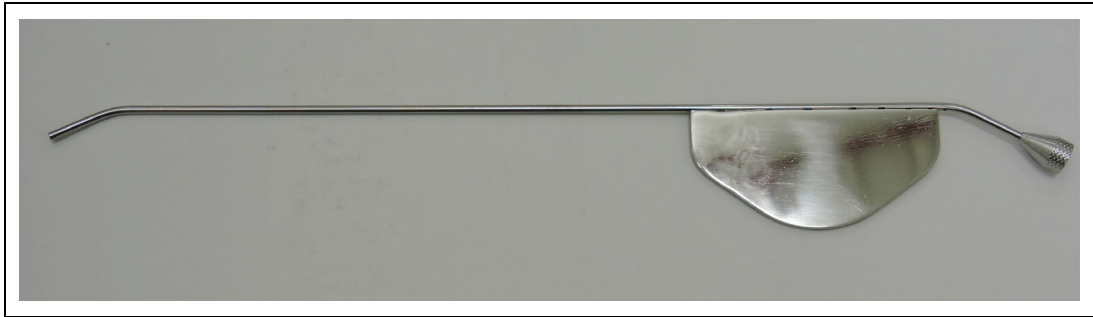




Figura 10 - Fotografia do procedimento: pesquisador utilizando telescópio rígido com a mão esquerda e a ponta do laser de diodo com a mão direita. Imagem gerada no *laptop*. Laser diodo posicionado a esquerda do pesquisador



Figura 11 - Fotografia do laser de diodo, DMC, São Carlos - SP



**Figura 12 - Fotografia da ponteira angulada para a passagem de fibra ótica do laser (adaptada para laringe de coelhos), DMC, São Carlos-SP**

#### **4.6.1 Parâmetros e estudo piloto**

No primeiro estudo piloto foram utilizados dois coelhos com a finalidade de compreender se a utilização do laser de diodo 1470 nm na prega vocal era viável e para definição dos parâmetros a serem utilizados; foram observados os aspectos macroscópicos no intraoperatório, pós-operatório imediato, 7 e 30 dias após o procedimento. Ao excluirmos a possibilidade de insuficiência respiratória por edema glótico e inviabilidade do animal por complicações pós-operatórias, escolhemos usar este comprimento de onda em uma das pregas vocais.

O outro estudo piloto foi realizado com objetivo de padronização da lesão na prega vocal. Neste estudo também foram utilizados dois coelhos.

No primeiro coelho foi realizado um corte transversal na prega vocal com laser diodo 980 nm e na prega vocal contralateral o corte foi repetido, utilizando o laser de 1470 nm. Durante o procedimento, notamos dificuldade técnica para realização do corte transversal, por via endoscópica, já que o espaço para realizar a movimentação da fibra ótica do laser é reduzido; além disso,

consideramos que fatores relacionados com a confecção do corte, como: pressão da fibra óptica sobre o tecido, número e velocidade de passagens do laser para obter o corte poderiam constituir vieses na interpretação dos achados histológicos. Dessa maneira, descartamos a realização de lesão através do corte transversal.

No segundo coelho, após laringoscopia e visão adequada da glote do animal, foi realizada uma lesão pontual no terço médio de uma prega vocal com laser de diodo com comprimento de onda 980 nm e na outra prega vocal a mesma lesão foi realizada com o laser de diodo 1470 nm. A lesão pontual foi realizada através do modo de contato no qual a fibra óptica toca a mucosa sem pressioná-la e sem movimentá-la durante 7 segundos.

Pelos motivos previamente expostos, optou-se por realizar a lesão pontual em ambas as pregas vocais. Tal lesão inexistente na prática clínica; no entanto, acreditamos que ela seja adequada para o estudo da cicatrização após o uso do laser de diodo conforme foi demonstrado em estudos anteriores<sup>6</sup>.

Antes de realizarmos a lesão pontual, padronizamos a realização de aspiração da região glótica sem tocar nas pregas vocais com objetivo de não haver estase salivar local; previamente ao acionamento do laser a ponta da fibra óptica foi clivada e pré-carbonizada em papel carbono. Assegurando dessa maneira, que a fibra óptica não apresentasse nenhuma irregularidade em sua ponta e que emitisse o mesmo padrão de irradiação em ambas as pregas vocais.

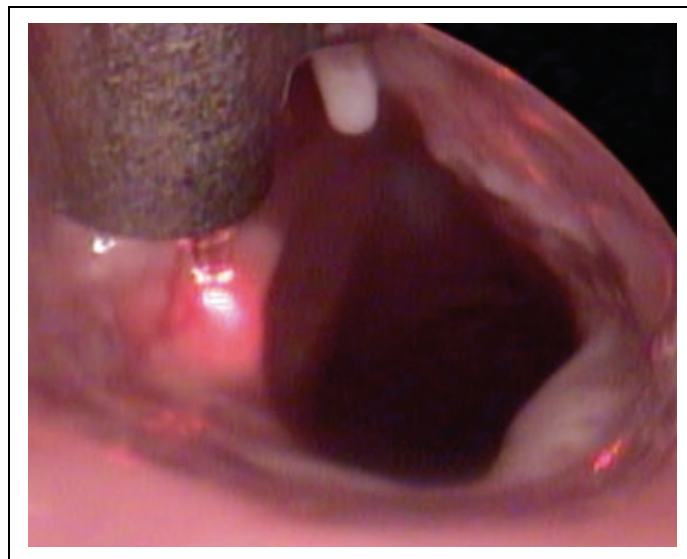
Durante o procedimento, a fibra ficou sob contato direto com o tecido, superficialmente ao mesmo, de forma que o pesquisador tocava com a fibra



do laser na prega vocal em ângulo de 90°, sem aprofundar a fibra na mesma (Figura 13).

O procedimento iniciava-se, apenas quando o pesquisador se certificava de que não havia pressão na prega vocal. O tempo foi padronizado em 7 segundos. O parâmetro a ser pesquisado foi ajustado conforme os grupos expostos no item 4.3.2.

O coelho que teve sua prega vocal utilizada como parâmetro histológico de normalidade, foi anestesiado e submetido à laringoscopia direta para realização da endoscopia laríngea. Após a verificação de que não havia alterações anatômicas, este coelho foi sacrificado no mesmo dia e sua laringe foi coletada para análise histológica.



**Figura 13 - Fotografia intraoperatória, da fibra ótica do laser diodo sendo acionada no início do procedimento**

#### **4.7 Procedimento pós-operatório**

Após realizar o procedimento cirúrgico os animais permaneceram na sala cirúrgica para recuperação anestésica por uma hora, sob os cuidados do pesquisador. Posteriormente, foram encaminhados para acomodações em gaiolas individuais no Centro de Bioterismo da FMUSP onde receberam cuidados diários de alimentação em ambiente adequado.

Após o procedimento, se notados sinais de desconforto no período pós-operatório, os coelhos poderiam receber analgésicos (opioides 0,3 mg/kg IM). No entanto, assim como observado em seres humanos a fonocirurgia não causou dor nos animais.

Todos os animais receberam antibióticos de uso veterinário Flotril® 10% (Enrofloxacin. Laboratório Shering-Plough Saúde Animal Ind. Com. Ltda, Brasil) em dose única diária nos 3 dias após o procedimento (concentração 2,5 mg/kg peso).

#### **4.8 Eutanásia, Coleta e Isolamento das Laringes**

Os animais dos grupos I e II foram sacrificados 30 dias após o procedimento cirúrgico. Já os animais dos grupos III e IV foram sacrificados 7 dias após o procedimento.

Anteriormente ao sacrifício, os coelhos foram previamente anestesiados (quetamina 50 mg/kg associada a xilazina 10 mg/kg), e em plano profundo foi administrado propofol 10 mg/mL.

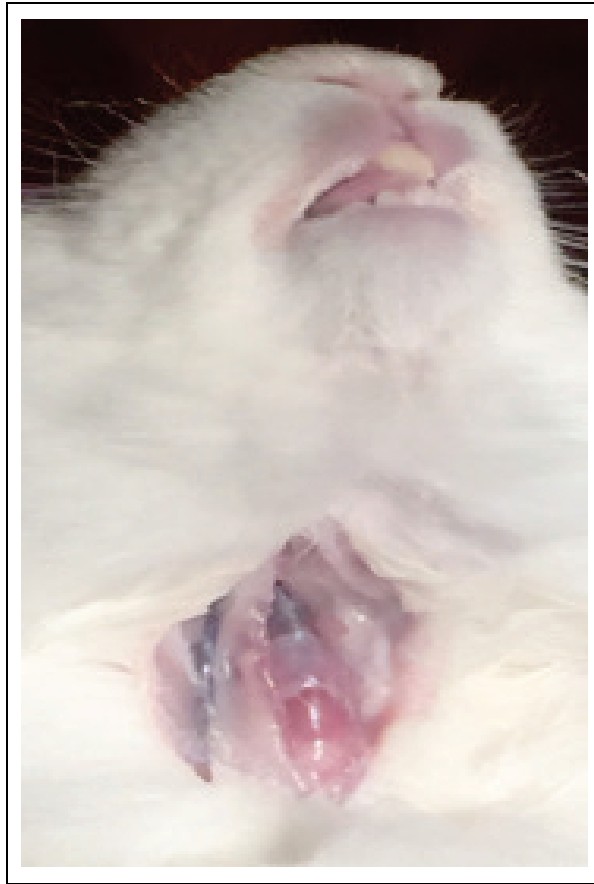
Após certificação do óbito do coelho foi realizada a coleta da laringe; ambos os procedimentos também ocorreram no Centro de Bioterismo da FMUSP.

Foi realizada incisão cervical anterior no coelho e excisão da laringe em bloco único (Figura 14), desde a região superior da epiglote até o primeiro anel traqueal. A peça foi devidamente dissecada e a laringe foi isolada (Figura 15); as laringes excisadas foram submersas em substância fixadora (formaldeído 10% tamponado com acetato de sódio). Após 24 horas, as peças foram retiradas do formaldeído tamponado e a laringe foi aberta através de uma incisão longitudinal na linha média posterior entre as cartilagens aritenoides e uma incisão anterior mediana (na cartilagem tireoide) e dessa forma obtendo-se duas hemilaringes (Figura 16).

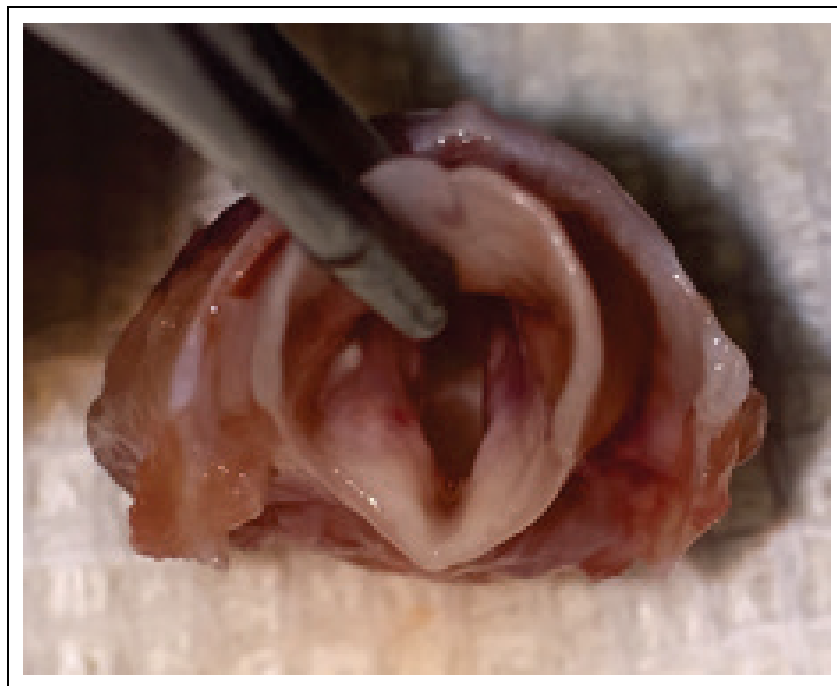
Cada hemilaringe foi isolada, colocada em cassetes, identificada adequadamente e encaminhada ao Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia da FMUSP.

Após o uso dos animais no experimento, os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos brancos, identificados, congelados em freezer até serem enviados para incineração juntamente com lixo hospitalar do Instituto (conforme regras do Manual de Normas Técnicas Biotério de Experimentação Animal - Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Não foram observadas intercorrências e todos os animais sobreviveram até o último dia do procedimento.



**Figura 14 - Fotografia da incisão cervical anterior para exérese da laringe, após sacrifício**



**Figura 15 - Fotografia da laringe fresca excisada, visão superior**



**Figura 16 - Fotografia hemilaringes formolizadas**

#### **4.9 Preparação Histológica**

As peças encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia da FMUSP foram desidratadas com álcool etílico à 95% submetidas à diafanização em xilol, impregnadas e incluídas em parafina em estufa à 60°C.

A seguir, os blocos de parafina foram cortados em lâminas no plano coronal com a utilização de um micrótomo na espessura de 3 µm. Os cortes foram realizados no sentido anteroposterior e o número de lâminas histológicas obtidas, para cada peça, foram suficientes para melhor visualização da lesão e das estruturas a serem avaliadas. Em seguida, foram desparafinizadas e sinalizadas.

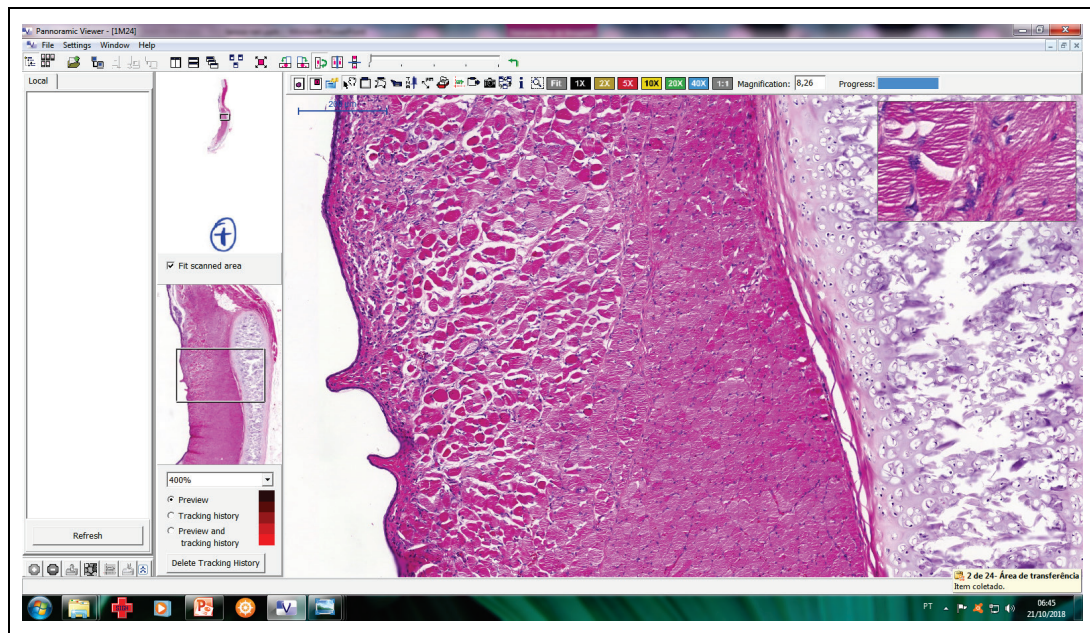
Um mesmo técnico da patologia participou de todo o processo acompanhado do pesquisador, desde o corte até a coloração, de modo a manter uma padronização dos procedimentos.

Uma a cada cinco lâminas da série preparada foi corada com hematoxilina-eosina (HE). Para cada hemilaringe uma quantidade variável de lâminas foram confeccionadas.

As lâminas coradas com HE foram analisadas pelo pesquisador e dois patologistas, esta análise foi realizada para obtenção da melhor lâmina. A lâmina selecionada era aquela que apresentava a melhor visualização das estruturas a serem analisadas, e presença do centro da lesão. A lâmina corada com HE foi utilizada como referência para as demais colorações realizadas.

As lâminas a serem coradas com picrossírius foram as imediatamente anteriores às escolhidas para coloração aquelas pelo HE. Já as lâminas coradas com resorcina-fucsina e realização de técnica de imunohistoquímica foram as subsequentes às utilizadas para análise da coloração HE.

Todas as lâminas selecionadas para o estudo passaram pelo processo de digitalização com auxílio do *scanner* Panoramic Scan (3DHitech, Budapeste, Hungria) e transportadas para o *software* Panoramic Viewer<sup>®</sup> 1.3 para Windows<sup>®</sup> (3DHitech, Budapeste, Hungria). O *software* Image ProPlus<sup>®</sup> para Windows<sup>®</sup> (Media Cybernetics Inc, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) foi utilizado para análise das imagens digitalizadas (Figura 17).



**Figura 17 - Interface do programa de análise digital de imagem que mostra a micrografia com corte histológico de prega vocal corada com HE em sua visão panorâmica (canto superior esquerdo), zoom 400% (canto superior direito) e no centro da tela o aumento desejado (Aumento de 20x)**

#### **4.10 Análise Histológica das Pregas Vocais**

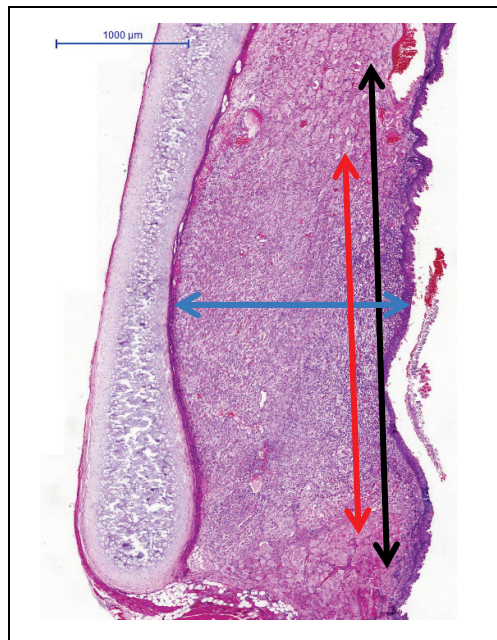
Foram utilizadas colorações: hematoxilina e eosina (HE), coloração de resorcina-fucsina, picrossírius, além de técnica de imunohistoquímica<sup>6,101</sup> para análise de diversos parâmetros que serão descritos nas suas respectivas colorações.

##### **4.10.1 Técnica de coloração hematoxilina-eosina**

As lâminas coradas com HE foram analisadas, por um patologista e pelo pesquisador, quanto ao processo inflamatório. Esta análise foi realizada mediante a coleta de dados objetivos (variáveis contínuas, em micrometros  $\mu\text{m}$ ) e subjetivos (variáveis categóricas/ordinais).



As análises objetivas foram realizadas através de um comando do programa Pannoramic Viewer®. A extensão do processo inflamatório foi delimitada, assim como a extensão linear da lesão fibrótica (ambas no sentido crânio caudal da lâmina HE, ou seja, da supraglote até a subglote). A profundidade da lesão foi delimitada no sentido do epitélio para a cartilagem. Todas essas variáveis foram expressas em micrometros ( $\mu\text{m}$ ). Para essa avaliação, foi utilizado um aumento de 20X (Figura 18).



**Figura 18 - Corte coronal de prega vocal direita de um coelho do Grupo IV, coloração HE, em aumento de 20x, evidenciando: seta preta- extensão linear do processo inflamatório, seta vermelha- a extensão linear da lesão fibrótica e a seta azul- a profundidade da lesão**

As análises subjetivas dos dados foram categorizadas da forma descrita a seguir. O processo inflamatório foi analisado utilizando-se um *score* de 0 a 3, sendo: 0. ausência de processo inflamatório; 1. infiltrado inflamatório leve (menos de 25% de células inflamatórias na totalidade dos campos examinados); 2. infiltrado inflamatório moderado (25% a 50% de



células inflamatórias na totalidade dos campos examinados); 3. infiltrado inflamatório acentuado (valor superior a 50% de células inflamatórias na totalidade dos campos examinados). O tipo de infiltrado apresentado foi classificado como: 1. supurativo; 2. misto; 3. linfomononuclear ou 4. granulomatoso. O edema de lâmina própria e a quantidade de eosinófilos foram graduados em: 1. pouco; 2. moderado; 3. intenso. A profundidade da lesão foi graduada conforme extensão da lesão, sendo: grau 1. atinge a camada muscular superficialmente; grau 2. atinge a camada muscular profundamente; grau 3. a lesão atinge as áreas do pericôndrio; ou grau 4. se a lesão atinge a área cartilaginosa. Foi considerada presença ou ausência de exocitose, espongiose, bolha, ulceração, necrose coagulativa, fibroblasto, tecido de granulação e fibrose, (0. ausência, 1. presença). O tipo da fibrose foi classificado sendo 1. frouxo ou 2. denso.

A integridade do epitélio foi avaliada através da sua capacidade de reepitelização sendo classificada em: 0. sem sinais de reepitelização e 1. com sinais de reepitelização.

#### **4.10.2 Técnica de coloração picrossírius**

Para o estudo das fibras colágenas, os cortes histológicos foram corados através do método de coloração picrossírius. Neste método, os cortes histológicos foram, primeiramente, desparafinados, hidratados e então corados por uma hora, numa solução de 0,1 % de Sirius Red (Sirius Red F 3B 200, Mobay Chemical Co., Union, NJ, EUA) após esse processo foram dissolvidos em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram lavados por

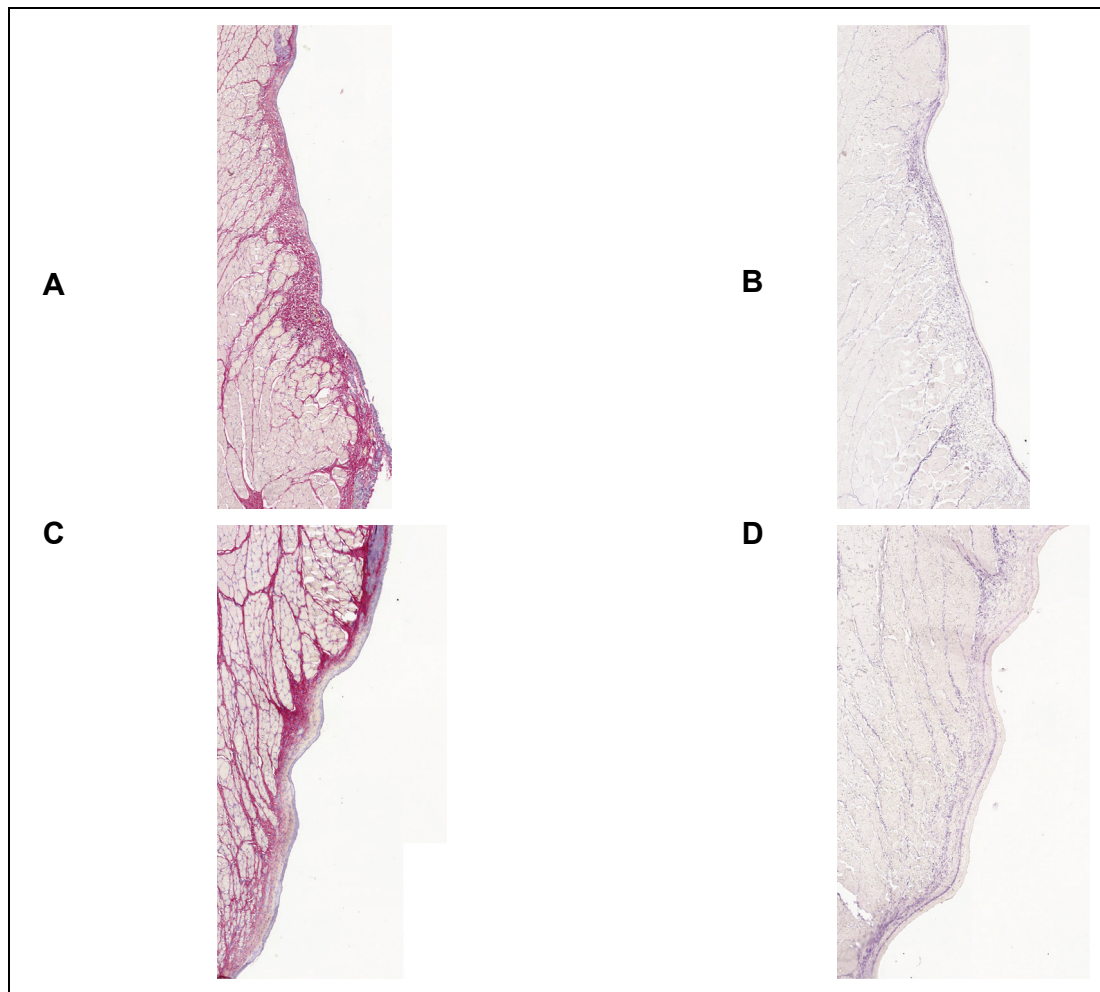
cinco minutos em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Harris por dois minutos. As lâminas foram observadas sob microscopia de luz normal, identificando-se as fibras colágenas<sup>102</sup>. As lâminas foram scaneadas e as capturas foram realizadas no programa Panoramic Viewer® e análise da densidade de fibras colágenas nas áreas de lesão foram executadas por meio do programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockvillw, MD, EUA) ajustando -se a gama de cores que variam do rosa para o vermelho (Figuras 19 A e C). Ao analisar as fibras colágenas sob luz não polarizadas, estas aparecem vermelhas sob fundo amarelo.

#### **4.10.3 Técnica de coloração resorcina-fucsina**

Através do uso desta coloração foram avaliadas as densidades e orientações das fibras elásticas.

As fibras do sistema elástico possuem um conjunto de caracteres histoquímicos que aumentam, grandemente, sua afinidade tintorial, facilitando sua evidenciação. As lâminas coradas com resorcina-fucsina foram previamente oxidadas pela oxona-resorcina-fucsina (RFO).

As lâminas foram scaneadas e as capturas foram realizadas no programa Panoramic Viewer® e análise da densidade de fibras elásticas nas áreas de lesão foram executadas por meio do programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockvillw, MD, EUA) ajustando-se a gama de cores em violeta (Figuras 19 B e D).



**Figura 19 - Análise histológica da lesão fibrótica causada por diferentes tipos de laser de um coelho do Grupo I: Corte histológico da PV direita do coelho, corado com picrossírus (A) e corte corado com resorcina- fucsina oxidada (RFO) (B) (Aumento de 100x); Corte histológico da PV esquerda do coelho corado com picrossírus (C) e corado com resorcina- fucsina oxidada (RFO) (D) (Aumento de 120x)**

#### **4.10.4 Técnica de imunoistoquímica**

Utilizada para análise da expressão do colágeno tipo I e tipo III as reações de imunoistoquímica utilizam anticorpo monoclonal anti-humano. Para o colágeno tipo I o anticorpo utilizado é o USBiological, MA, USA, na titulação 1:1000; já para o colágeno tipo III o anticorpo é o Santa Cruz Biotechnology, CA, USA na titulação 1:50.

Os cortes histológicos foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-Sigma) seguindo, primeiramente a realização de desparafinação e hidratação, seguido por bloqueio com ácido fórmico (duração de 3 minutos); após o processo as lâminas foram lavadas com água corrente e água destilada. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes ( $H_2O_2$ ) 3% por quatro vezes; após esse processo foi realizada a lavagem com água corrente, água destilada e TBS/Tween.

Para cada colágeno a ser identificado foi realizada a recuperação antigênica.

No caso do colágeno tipo I, a recuperação antigênica foi obtida em temperatura alta, tampão citrato pH de 6, na panela de pressão à 121°C durante três minutos; após esse processo foi realizada a lavagem com água corrente, água destilada e TBS/Tween.

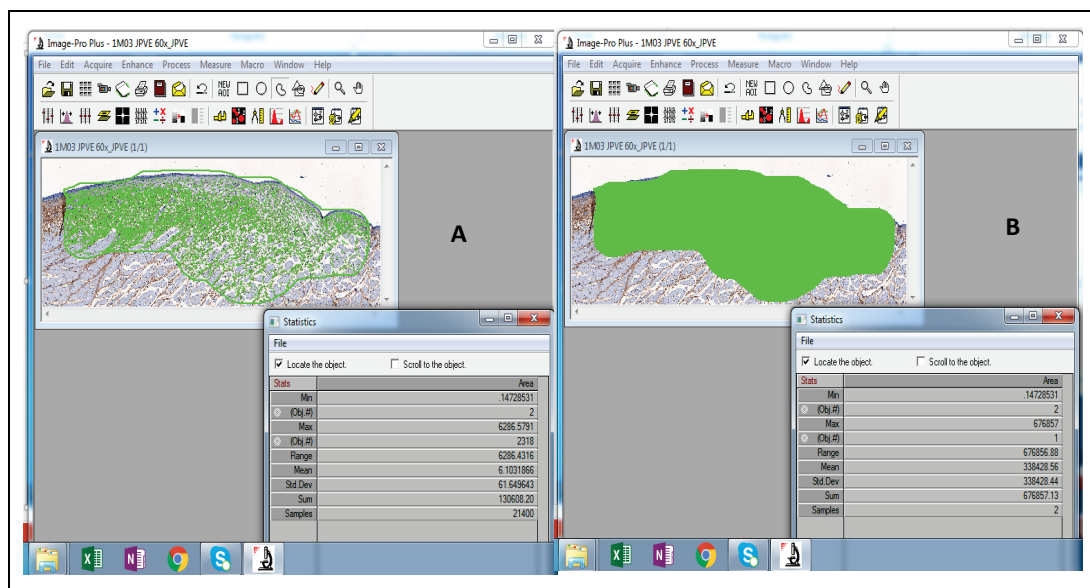
Para o colágeno tipo III a recuperação antigênica foi obtida com proteinase K em estufa de 37°C por 30 minutos; após esse período foi realizada a lavagem com água corrente, água destilada e TBS/Tween.

Os anticorpos primários do Colágeno tipo I (USBiological, MA, USA), titulação 1:1000, e o Colágeno tipo III (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) titulação 1:50, foram aplicados sobre os cortes e as lâminas incubadas *overnight*. Após a etapa anterior, as lâminas foram lavadas em TBS/Tween e incubadas em estufa à 37°C com anticorpo secundário Vectastain anti-Goat (Vector Laboratories, CA, USA).

Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS/Tween e realizou-

se a revelação com cromógeno 3.3 diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich, USA). Foram lavadas com água corrente e água destilada e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha). Em seguida, foram lavadas novamente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia de Entellan (Merck, Alemanha).

Uma exemplificação da análise quantitativa da fibra colágena em lesões encontradas nos animais experimentais por meio de colorações específicas e imunohistoquímica, através do programa Image Pro, está demonstrada da Figura 20.



**Figura 20 - Análise quantitativa da fibra colágena nas lesões encontradas nos animais experimentais por meio de colorações específicas e imunohistoquímica através do programa Image Pro. Interface do programa de análise digital de imagem que mostra: (A) micrografia com delimitação da área de interesse e reconhecimento das fibras colágenas, marcando-as em verde; (B) micrografia com marcação da área total da lesão. Ambas expressas em  $\mu\text{m}^2$  e em aumento de 100x**

#### **4.11 Análise Estatística**

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para avaliar os dados contínuos pareados (laser diodo 980 nm *versus* 1470 nm). Os dados categóricos foram analisados através do teste de Fischer. Comparações estatísticas entre animais (em relação ao tempo de sacrifício e modo de energia do laser) não foram feitas devido à possibilidade de viés de performance. Tais dados foram analisados de modo descritivo, com avaliação de tendências. O programa STATA version 11.2 (Stata Corp, College Station, TX, USA) foi utilizado para as análises e adotou-se o nível de significância de 0,05. Como este estudo foi exploratório, não foram adotadas medidas para corrigir o erro tipo I decorrente de múltiplas comparações.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Evolução dos Animais**

Não houve nenhuma morbidade ou intercorrência documentada durante o período observacional. Todos os animais sobreviveram até o dia programado para o sacrifício.

### **5.2 Variáveis de Interesse**

Nas lâminas que foram coradas pelo HE, alguns achados se repetem em todos os quatro grupos.

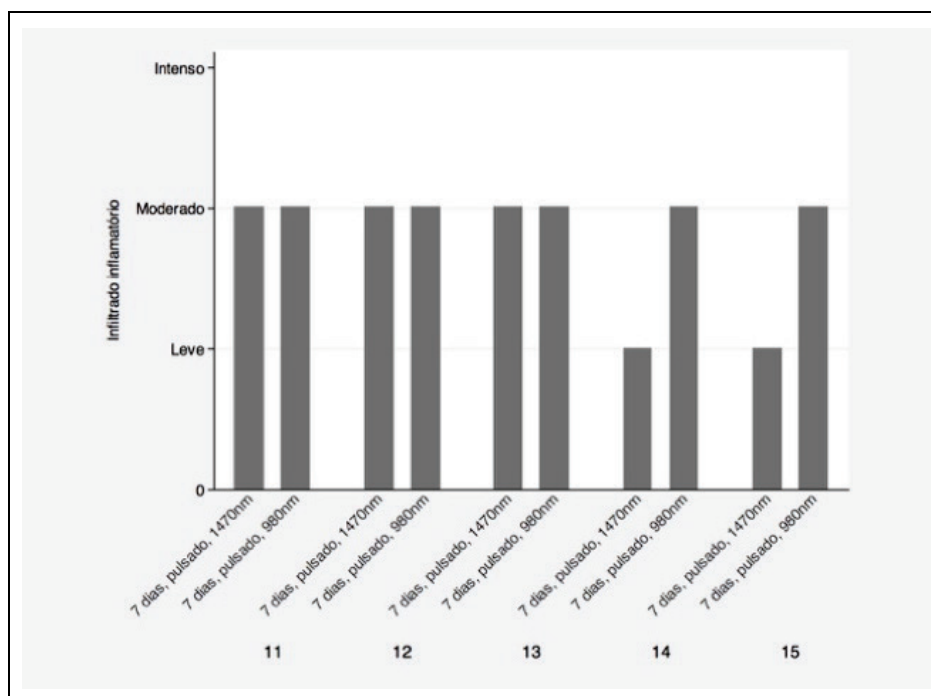
Não foram observadas formações de úlceras, bolhas ou necrose em nenhum dos grupos. Assim como, não foram observadas presença de exocitose de células inflamatórias e espongiose nas lâminas analisadas. No entanto, o tecido apresentava sinais de manipulação, pois fora analisada a presença de reepitelização e presença de tecido de granulação com fibroblastos, tais achados foram observados nas lâminas analisadas.



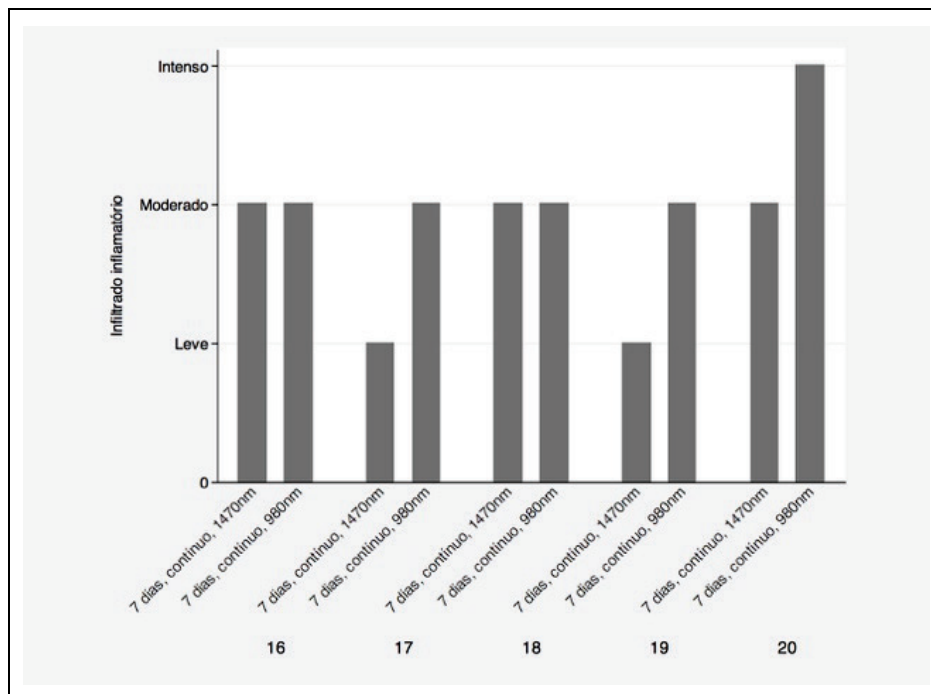
### 5.2.1 Processo inflamatório

De modo geral, o infiltrado inflamatório apresentou maior exuberância nos grupos de coelhos que foram sacrificados com 7 dias (Gráficos 1 e 2). Quando analisado o grupo de coelhos que foram sacrificados com 30, dias há maior infiltrado inflamatório no modo de entrega de energia contínuo (Gráfico 3) quando comparado ao modo pulsado (Gráfico 4). Não foram demonstradas diferenças, significativas, entre as pregas vocais submetidas à intervenção com laser diodo de 980 nm e 1470 nm quanto a intensidade do infiltrado inflamatório em nenhum dos grupos.

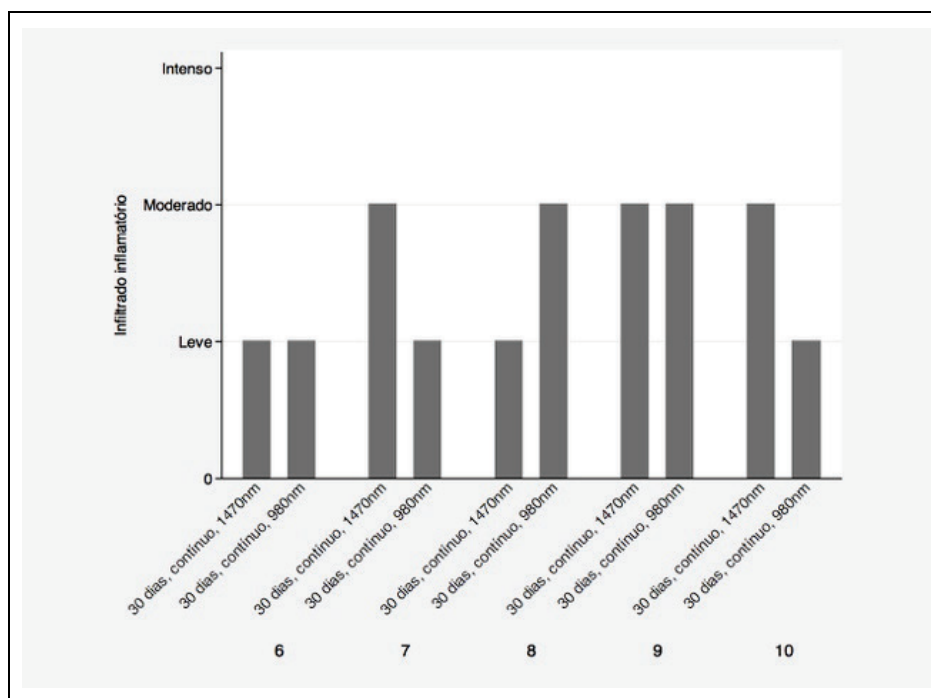
**Gráfico 1 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo III (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado)**



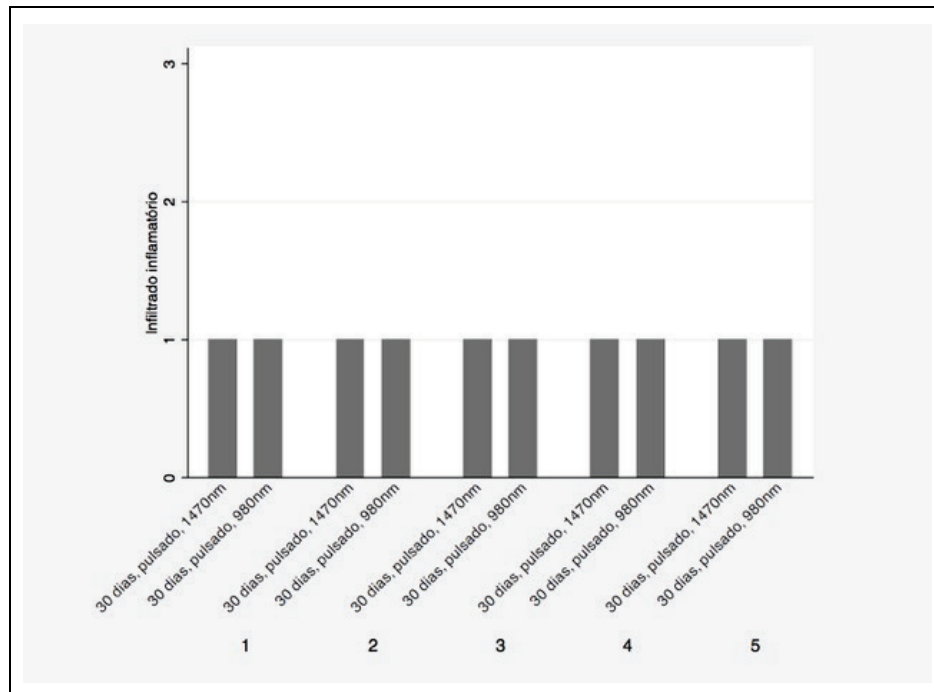
**Gráfico 2 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo IV (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo)**



**Gráfico 3 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo II (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo)**



**Gráfico 4 - Intensidade do infiltrado inflamatório em coelhos do Grupo I (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado)**



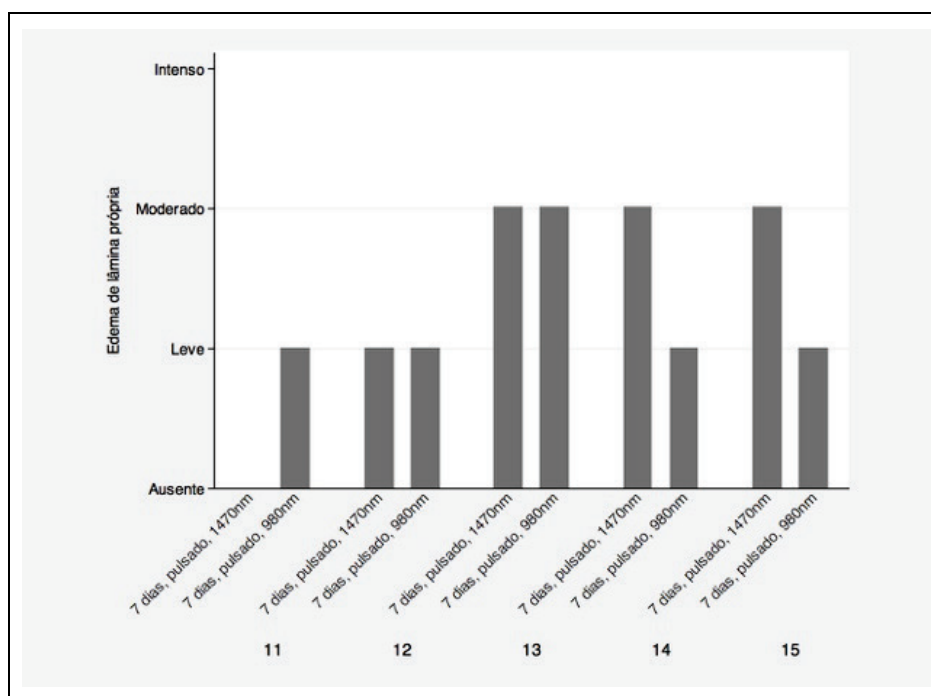
O tipo do infiltrado inflamatório observado, nos grupos I e II, sacrificados 30 dias após o procedimento, foi linfomononuclear. Nos grupos III e IV, sacrificados após 7 dias, foram observados apenas tipo misto de infiltrado inflamatório; demonstrando mudança no padrão inflamatório no período do estudo. Não foram demonstradas diferenças, significativas, entre as pregas vocais (laser de diodo de 980 nm e 1470 nm) quanto ao tipo de infiltrado inflamatório.

Em algumas pregas vocais de animais com tempo de sacrifício de 7 dias observou-se a presença de eosinófilos, e a presença deste tipo celular não foi observado em nenhum animal sacrificado com 30 dias.

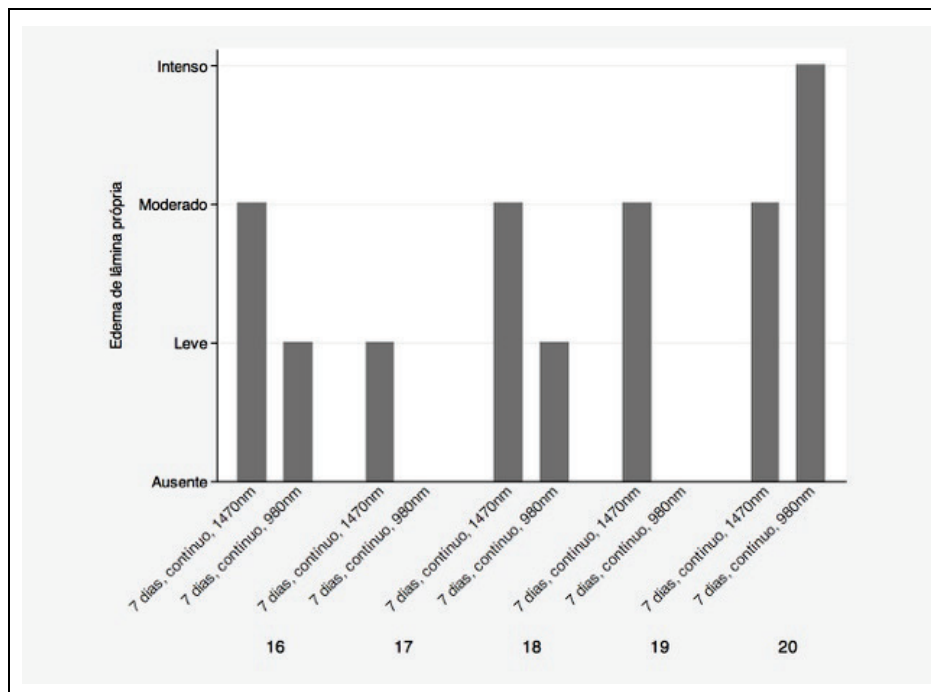
Achados referentes ao edema de lâmina própria tiveram grande variabilidade. Dentre os coelhos sacrificados após 7 dias do procedimento,

não observamos clara diferença entre os lasers no modo pulsado ou contínuo (Gráficos 5 e 6). Nos coelhos submetidos ao laser no modo contínuo, foi observada tendência a um maior edema na lâmina própria nas pregas vocais que receberam o laser 1470 nm. Ao avaliar o edema nos grupos com sacrifício em 30 dias foi observado tendência de maior edema de lâmina própria, no grupo que recebeu o laser no modo contínuo (Gráfico 7). Nos coelhos que receberam o laser no modo pulsado e foram sacrificados com 30 dias a intensidade do edema da lâmina própria foi, em sua maioria, classificada como ausente ou leve, apenas um animal apresentou edema moderado em uma de suas pregas vocais (Gráfico 8).

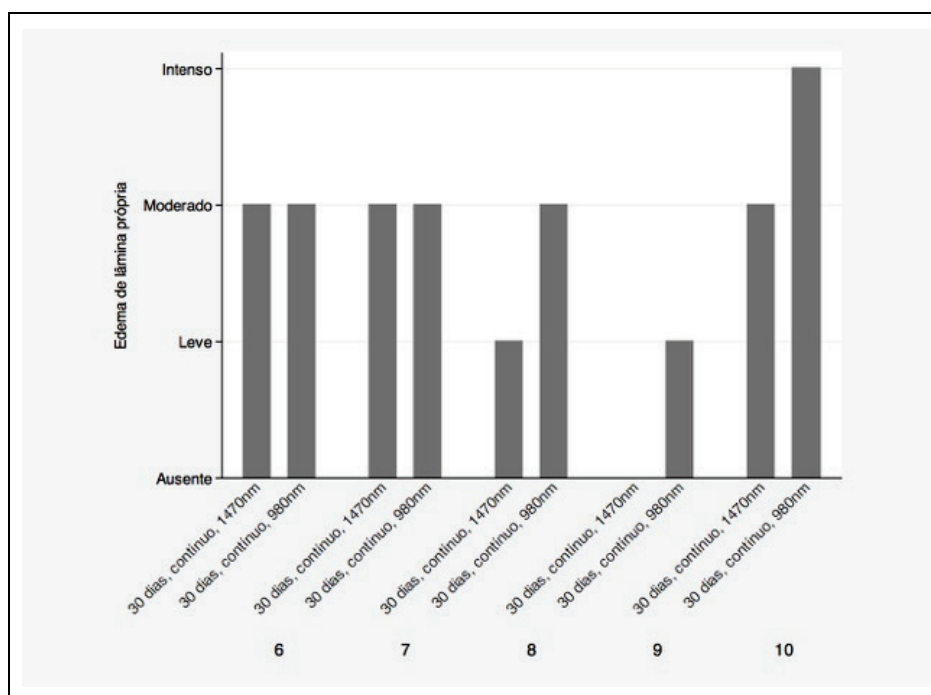
**Gráfico 5 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo III (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado)**



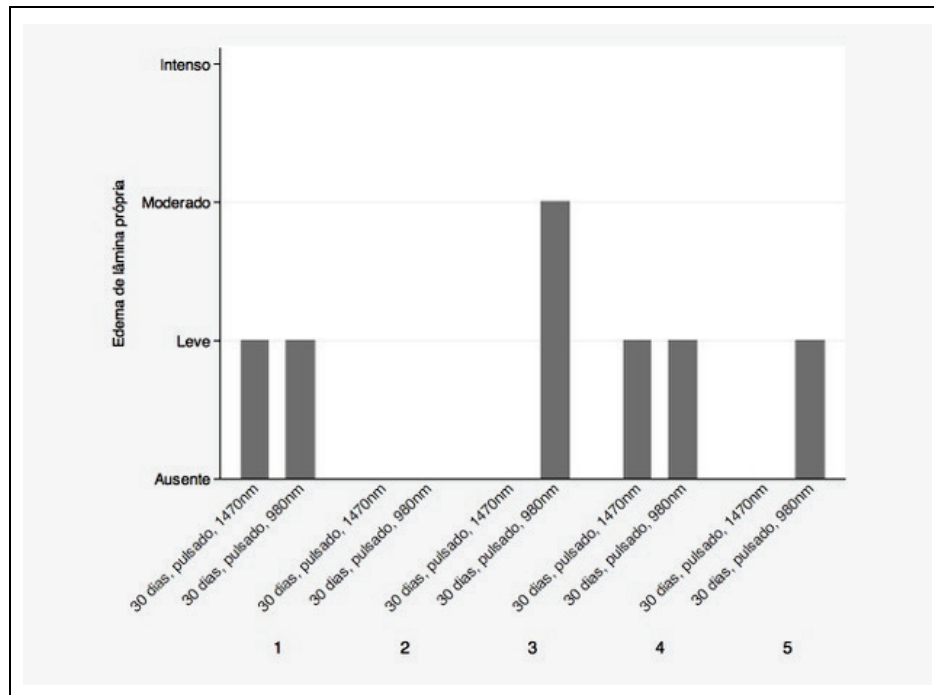
**Gráfico 6 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo IV (sacrificados 7 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo)**



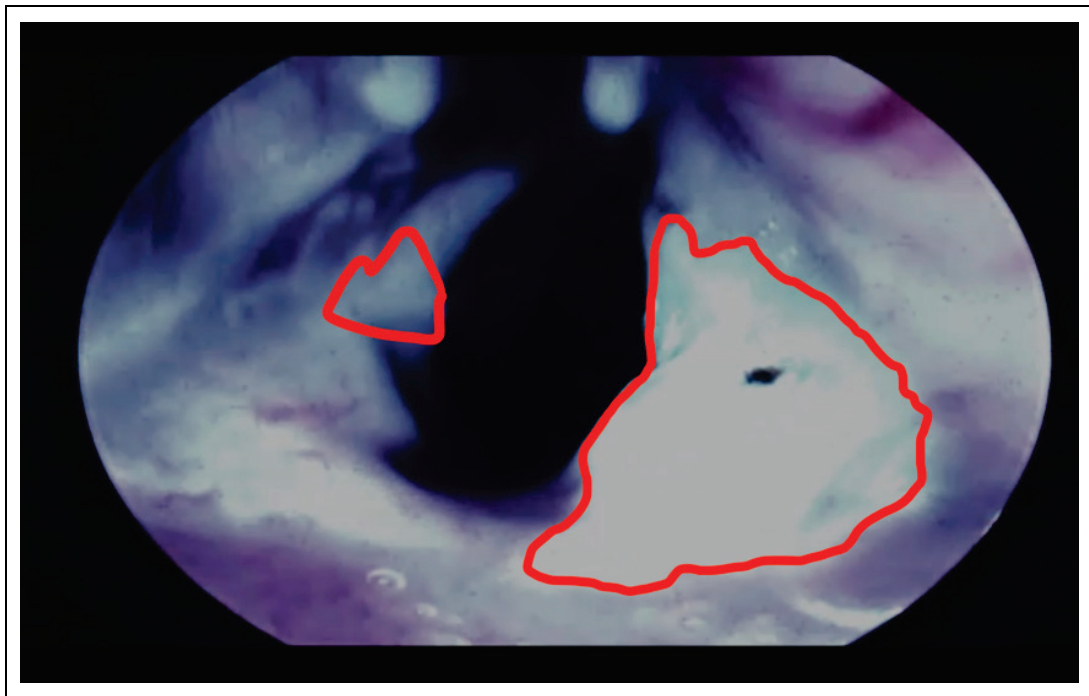
**Gráfico 7 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo II (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: contínuo)**



**Gráfico 8 - Intensidade do edema de lâmina própria em coelhos do Grupo I (sacrificados 30 dias pós-procedimento, modo de pulso do laser: pulsado)**



A observação macroscópica da lesão no intraoperatório permite ao cirurgião graduar subjetivamente a lesão de uma prega vocal pelo grau de edema ou branqueamento do tecido. Contudo, a análise histológica do grau de lesão, por exemplo, pela extensão do processo inflamatório, nem sempre demonstrou concordância com os achados intraoperatório (Figura 21). Na maioria dos casos (10/15 ou 67%) em que identificamos assimetria do grau de lesão entre as pregas vocais, o lado pior era do laser de 1470 nm.

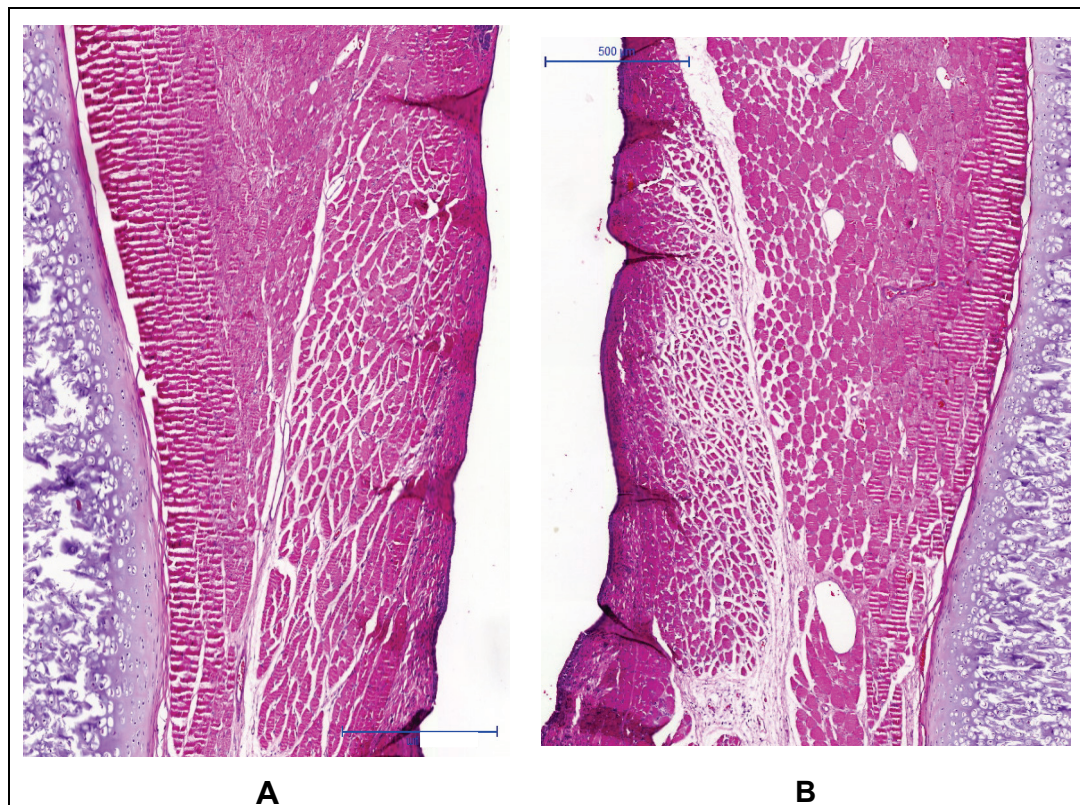


**Figura 21 -** Aspecto pós-operatório imediato de coelho do Grupo II. As lesões em pregas vocais esquerda e direita foram causadas por laser de diodo 980 nm e 1470 nm, respectivamente. O grau de lesão, estimado pelo branqueamento da mucosa (delimitado pela linha vermelha) é evidentemente maior do lado direito. Contudo, a extensão do processo inflamatório dos lados esquerdo e direito 30 dias após o procedimento foram, respectivamente, de 3242,62  $\mu\text{m}$  e 1919,47  $\mu\text{m}$

No Grupo I (no qual se comparou os comprimentos de onda 980 e 1470 nm, no modo de entrega de energia pulsado e tempo de sacrifício de 30 dias) não houve diferenças significantes nas análises objetivas (extensão do processo inflamatório, extensão linear da lesão fibrótica, profundidade do processo inflamatório). Também não houve diferença estatística nas análises subjetivas (grau de inflamação, tipo de infiltrado, edema da lâmina própria, tipo de fibrose, tecido de granulação, quantidade de eosinófilos e fibroblastos, e grau geral da lesão) entre o laser de 980 e 1470 nm.

Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I são mostrados na Figura 22.



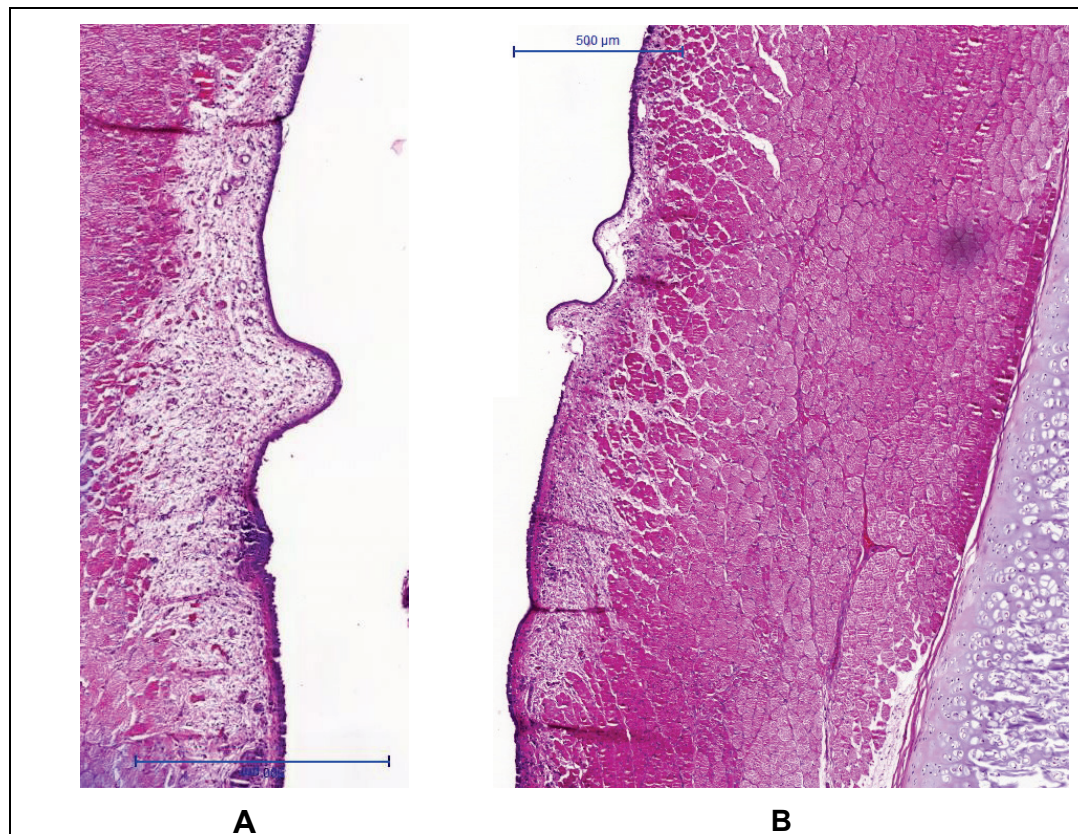


**Figura 22 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I (30 dias, modo de energia - pulsado): (A) Prega vocal direita que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 980 nm (Aumento de 60x); (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 1470 nm (Aumento de 40x)**

No Grupo II, em que foi usado modo de pulso contínuo e tempo de sacrifício 30 dias, não houve diferenças significantes nas análises objetivas (extensão do processo inflamatório, extensão linear da lesão fibrótica, profundidade do processo inflamatório); e tampouco nas análises subjetivas (grau de inflamação, tipo de infiltrado, edema da lâmina própria, tipo de fibrose, tecido de granulação, quantidade de eosinófilos e fibroblastos, e grau geral da lesão).

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II, podem ser vistos na Figura 23.



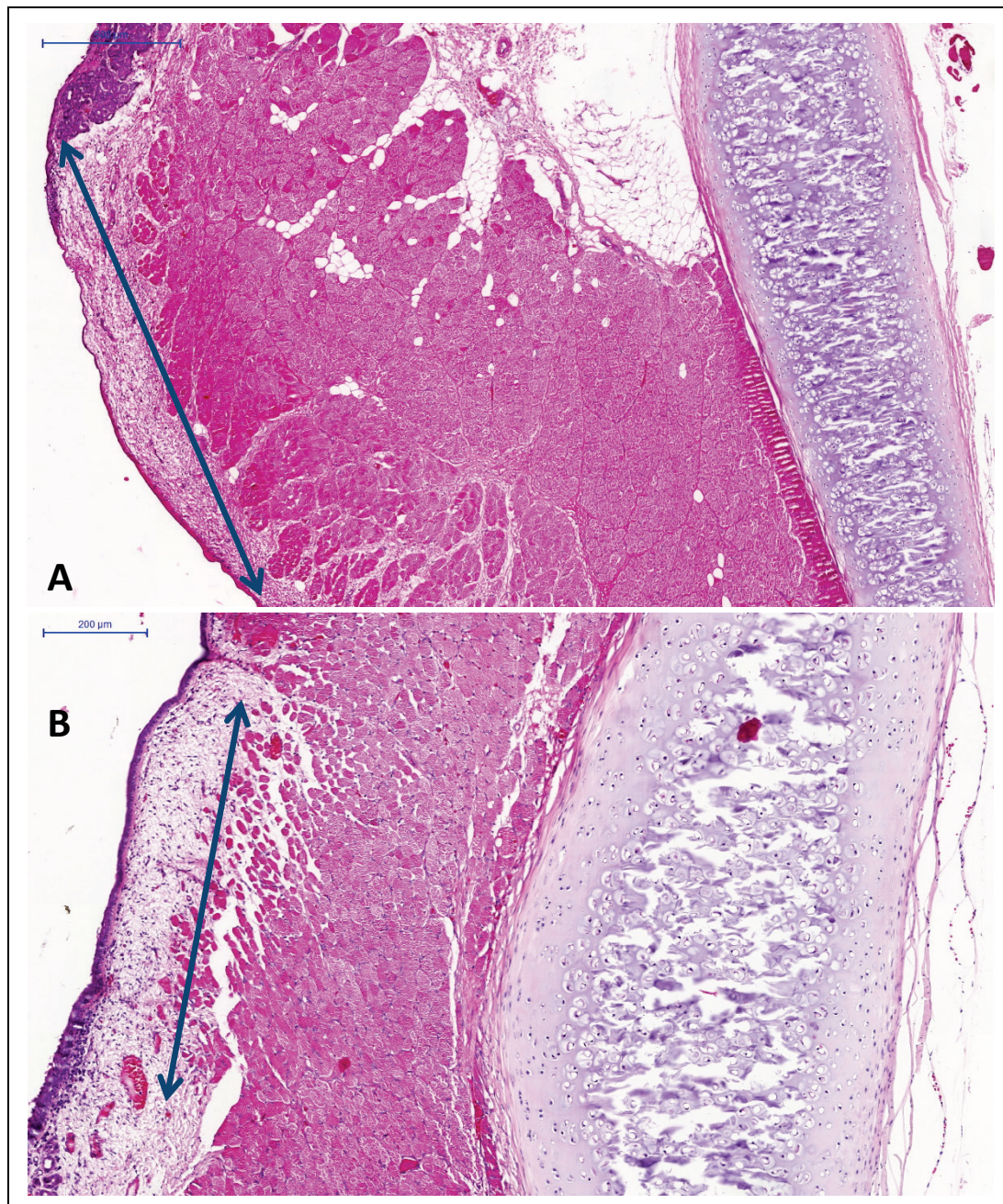


**Figura 23 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II (30 dias, modo de energia – contínuo): (A) Prega vocal direita que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 1470 nm (Aumento de 60x); (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 980 nm (Aumento de 40x)**

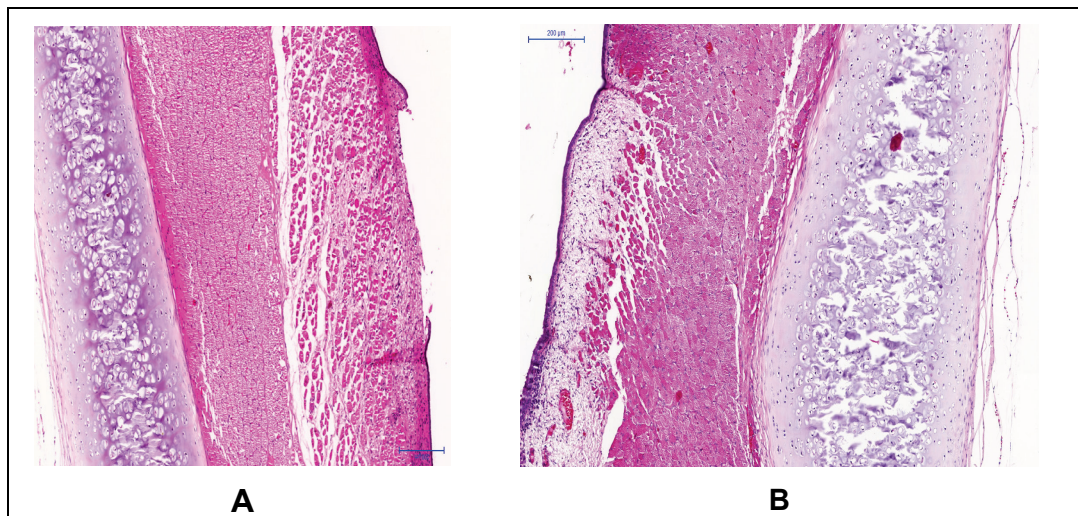
No Grupo III, comparou-se o uso de modo pulsado em coelhos sacrificados 7 dias após o procedimento. Das variáveis objetivas, a extensão linear da lesão fibrótica (no sentido crânio caudal da laringe) apresentou diferença significativa ( $p=0,043$ ) entre os dois comprimentos de onda, sendo maior no laser 980 nm (Figura 24). As outras características analisadas objetivas e subjetivas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III, podem ser vistos na Figura 25.





**Figura 24 -** Cortes histológicos, coronais, corados com HE de prega vocal de um mesmo coelho do Grupo III (7 dias, modo de energia - pulsado). A seta demonstra a extensão linear da lesão fibrótica induzida pelo uso do laser diodo. (A) Prega vocal direita, feixes de laser com comprimento de onda de 980 nm (Aumento 43x); (B) Prega esquerda, feixes de laser com comprimento de onda de 1470 nm (Aumento 80x)

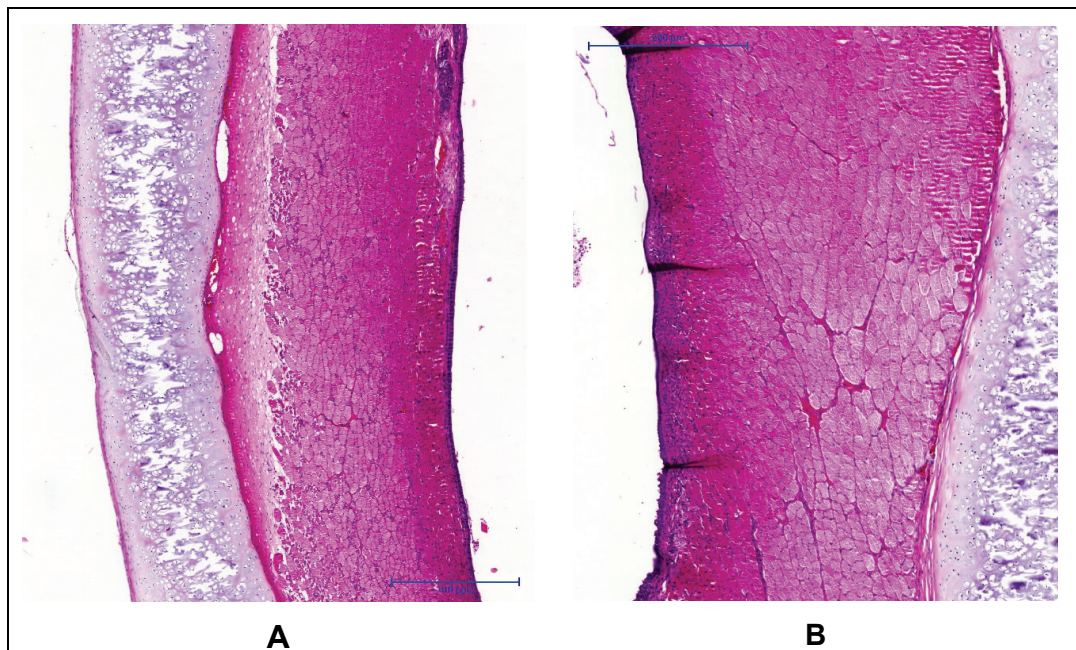


**Figura 25 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III (7 dias, modo de energia - pulsado): (A) Prega vocal direita que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 980 nm (Aumento de 80x); (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 1470 nm (Aumento de 80x)**

No Grupo IV, em que foi usado modo de pulso contínuo e tempo de sacrifício 7 dias, não houve diferenças significativas nas análises objetivas (extensão do processo inflamatório, extensão linear da lesão fibrótica, profundidade do processo inflamatório); e tampouco nas análises subjetivas (grau de inflamação, tipo de infiltrado, edema da lâmina própria, tipo de fibrose, tecido de granulação, quantidade de eosinófilos e fibroblastos, e grau geral da lesão).

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo IV, podem ser vistos na Figura 26.

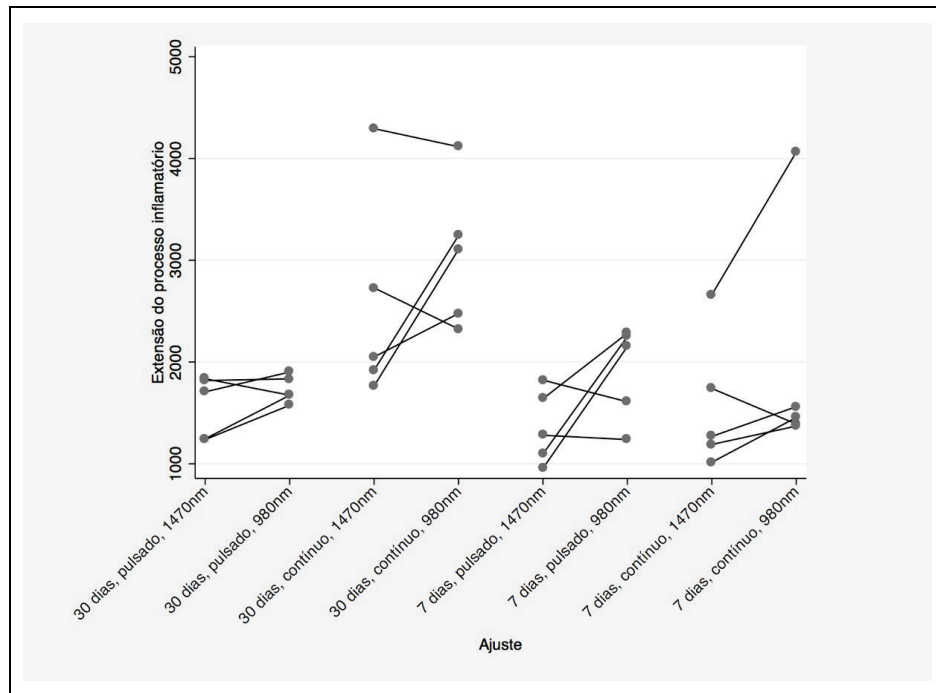




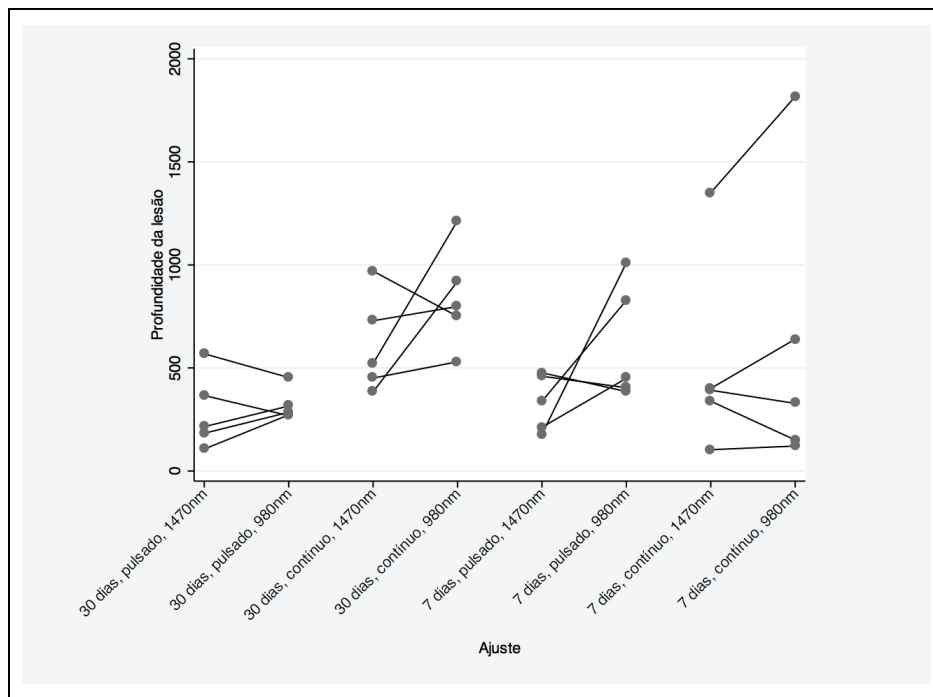
**Figura 26 - Cortes histológicos coronais corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo IV (7 dias, modo de energia - contínuo): (A) Prega vocal direita que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 1470 nm (Aumento de 40x); (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo comprimento de onda 980 nm (Aumento de 50x)**

Os Gráficos 9 a 11 mostram os dados pareados (pregas vocais de um mesmo coelho são interligadas) dos diferentes grupos quanto às análises objetivas (extensão do processo inflamatório, extensão linear da lesão fibrótica, profundidade do processo inflamatório).

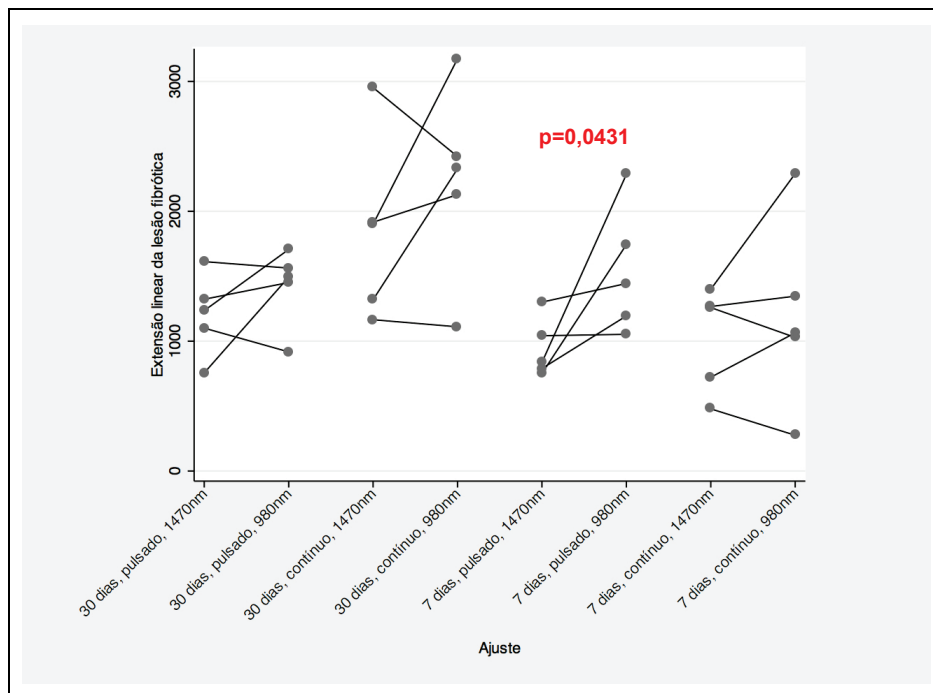
**Gráfico 9 - Resultados pareados (interligados) da extensão do processo inflamatório de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho**



**Gráfico 10 - Resultados pareados (interligados) da profundidade da lesão (processo inflamatório) de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho**

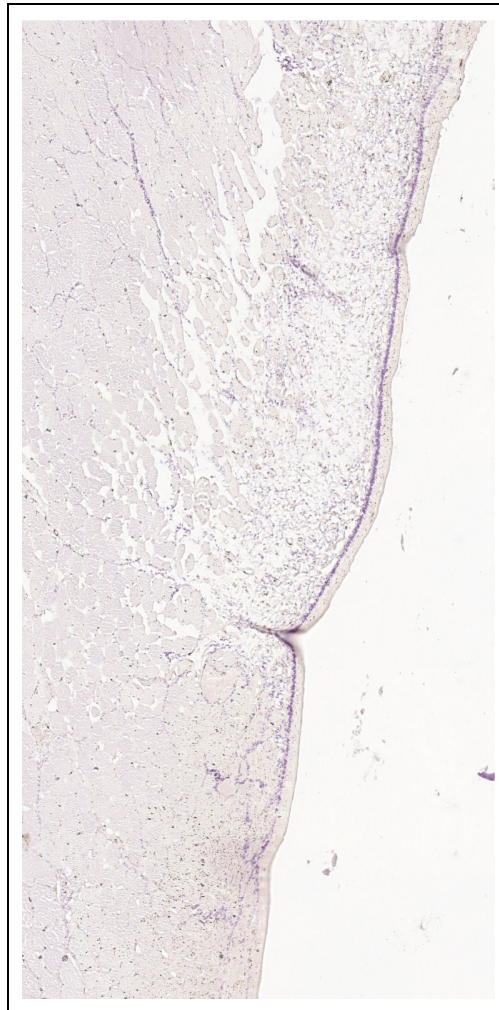


**Gráfico 11 - Resultados pareados (interligados) da extensão linear da lesão fibrótica de acordo com o comprimento de onda, modo de pulso do laser e tempo de sacrifício do coelho**



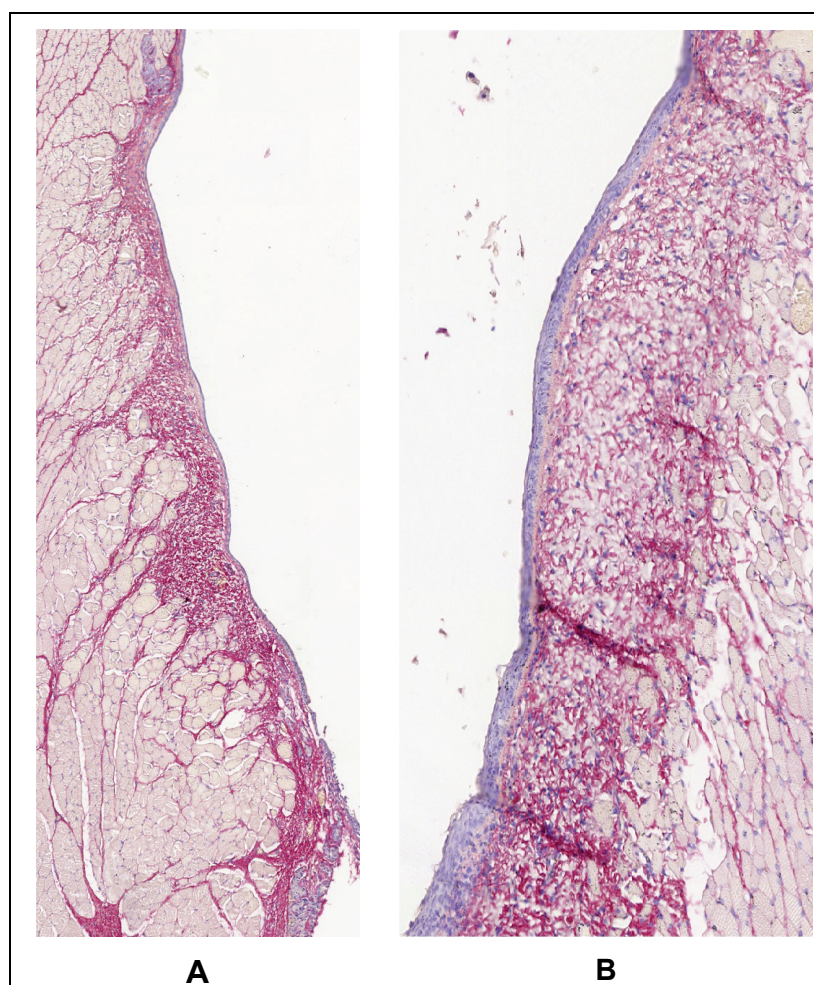
### 5.2.2 Densidade e orientação das fibras elásticas e colágenas

As fibras elásticas apresentaram-se fragmentadas, pouco desorganizadas nas proximidades às áreas de lesões e distribuíram-se ora verticalmente ora horizontalmente. Foi observado, perda parcial da linearidade na camada submucosa, independente do grupo analisado, e distribuição esparsa nas áreas de injúria (Figura 27). Não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras elásticas nas análises nas análises pareadas entre as pregas vocais de cada grupo de coelhos.



**Figura 27 - Corte histológico corado resorcina-fucsina oxidada (RFO) da PV esquerda de um coelho do Grupo III, que recebeu feixe de laser diodo com comprimento de onda 1470 nm (Aumento de 120x)**

As fibras colágenas apresentaram-se delgadas e pouco organizadas nas áreas de tecido de granulação em todos os grupos analisados. A densidade de fibras colágenas mostrou-se significativamente mais elevada com uso do laser com comprimento de onda 1470 nm, no grupo III ( $p=0,043$ ) (Figura 28). Não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras colágenas nas análises nos Grupos I, II e IV.



**Figura 28 - Corte histológico de um coelho do Grupo III corado com picrossírus (A) PV direita do coelho (Aumento de 100x), comprimento de onda do laser diodo 980 nm; (B) PV esquerda do coelho, comprimento de onda do laser diodo 1470 nm (Aumento de 120x)**



### **5.2.3 Imunoistoquímica para colágeno tipo I e tipo III**

As análises das lâminas da imunoistoquímica para colágeno tipo I (Figura 29) apresentaram marcação com boa especificidade, sem identificação de outros componentes teciduais. Ao analisar as áreas de lesões, na camada submucosa e muscular superficial, o colágeno tipo I apresentou-se com aspecto fragmentado, sem formação de feixes coesos e entre as fibras marcadas observou-se presença de edema intersticial. Não houve diferença estatística quanto a análise do colágeno tipo 1 entre pregas vocais de coelhos de um mesmo grupo.

As análises das lâminas da imunoistoquímica para colágeno tipo III (Figura 30) demonstraram positividade em apenas três casos. Nos demais, observou-se marcação inespecífica em células musculares da laringe, e não houve marcação do colágeno III intersticial nas áreas com sinais de lesão pelo laser. Essa marcação inespecífica não foi considerada, de modo que não interferiram na análise dos resultados.

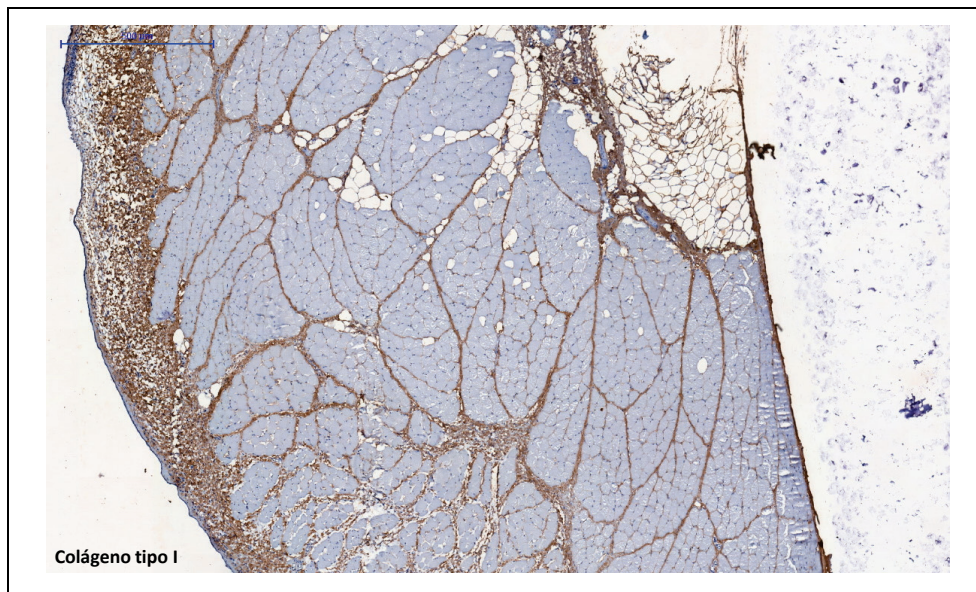


Figura 29 - Corte histológico da PV direita de coelho que foi submetido a procedimento com laser de diodo com marcação imunistoquímica para colágeno tipo I (USBiological, MA, USA), titulação 1:1000, peroxidase, aumento 150x

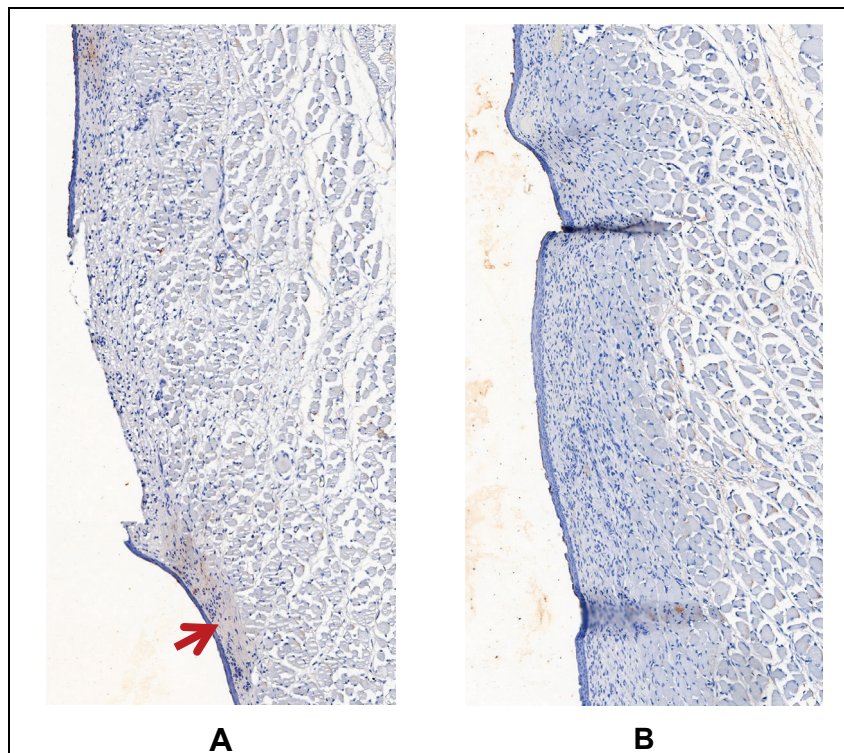


Figura 30 - Corte histológico da PV de coelho que foi submetido a procedimento com laser de diodo com marcação imunistoquímica para colágeno tipo III (Santa Crus Biotechnology, CA, USA), titulação 1:50, proteinase K, aumento 120x; (A) prega vocal direita de coelho do Grupo III com pouca marcação para colágeno tipo III (seta). (B) prega vocal esquerda de coelho do Grupo I com marcação negativa para colágeno tipo III

## **6 DISCUSSÃO**

## 6.1 Delineamento do Estudo e Metodologia

A cicatriz na prega vocal é a principal causa de disfonia após microcirurgia de laringe<sup>7,103</sup>.

Na atualidade, a disfonia pós-cirurgia ainda representa um dos maiores desafios da laringologia; sendo que a fonocirurgia ideal seria aquela na qual a lesão é removida na sua totalidade com menor dano ao tecido adjacente. Conseqüentemente, a estrutura da prega vocal seria preservada e a funcionalidade da mesma se reestabeleceria<sup>103,104</sup>.

Algumas lesões requerem o uso de instrumentos cirúrgicos capazes de realizar corte e coagulação simultânea; as desvantagens conhecidas com o uso do eletrocautério foram superadas com o uso da tecnologia a laser. O laser pode ser usado para produzir corte tecidual sem sangramento excessivo, formando uma incisão ou ablação com dano térmico mínimo ao tecido saudável circundante quando comparado ao eletrocautério<sup>10,18</sup>.

O laser diodo tem sido utilizado como instrumento em fonocirurgia<sup>24</sup>, no entanto, dados sobre as conseqüências teciduais na prega vocal e a evolução da cicatrização ainda são escassos na literatura<sup>20</sup>.

Este estudo foi desenhado com intuito de avaliar o efeito do uso do laser diodo em pregas vocais nas fases iniciais da cicatrização, utilizando diferentes comprimentos de onda. Para isto, comparou-se extensão e

profundidade da lesão e da fibrose, assim como, presença de alterações inflamatórias e presença de fibras de colágeno e elásticas.

Estudos com modelos animais têm sido fundamental para o processo de avaliação do desempenho funcional destas recentes terapias *in vivo*<sup>36</sup>.

O modelo animal escolhido para o estudo foi o coelho, sua escolha é justificada pela semelhança dos aspectos histológicos de sua prega vocal com a do ser humano<sup>5,33</sup>. A prega vocal do coelho é caracterizada pela presença de epitélio escamoso que recobre o espaço subepitelial, a lâmina própria que contém os componentes da matriz extracelular como colágeno, elastina, e, mais profundamente, o músculo tireoaritenoide<sup>33</sup>. A distribuição de colágeno e elastina são semelhantes à prega vocal humana<sup>32</sup>. Destacam-se ainda, o custo relativamente barato, facilidade de manutenção e a acessibilidade relativa das suas pregas vocais para manipulação cirúrgica deste animal<sup>5,33</sup>.

A escolha do tempo pós-operatório, no qual os animais foram sacrificados foi baseado em estudos preliminares. A avaliação da cicatrização no 7º dia pós-injúria foi motivada pela análise de estudos que avaliaram a resposta inflamatória aguda<sup>39,98,105-107</sup>. Soma-se, que o entendimento da fase aguda da cicatrização, pós-injúria, é essencial, já que a menor reação inflamatória neste período minimiza a formação de cicatrizes. As respostas histológicas foram observadas quatro semanas pós-lesão, por algumas razões. Em estudo prévio, foi demonstrado que os níveis de expressão gênica de citocinas inflamatórias retornam aos valores basais 21 dias após a biópsia de pregas vocais do coelho<sup>98,108</sup>. Da mesma forma,

as características histológicas das pregas vocais se recuperaram, voltando ao normal 30 dias após a irradiação com laser pulsado<sup>109</sup>. Rousseau *et al.*<sup>5</sup>, afirmam que, em quatro semanas, as fases inflamatória e proliferativa da cicatrização estão completas, e a ferida deve estar na fase de remodelação, a qual deve ser iniciada na terceira semana. Os achados deste estudo, portanto, devem refletir a fase inicial da cicatrização e não a cicatriz madura, a qual, seria observada no 6º mês pós-operatório<sup>5</sup>.

A metodologia deste estudo incluiu a análise histopatológica das peças por diferentes métodos de coloração: hematoxilina-eosina, resorcina-fucsina de Weigert e picrossírius.

A coloração com HE permite a observação das alterações histológicas do processo inflamatório com a identificação dos componentes celulares e desta forma caracteriza a arquitetura tecidual.

A coloração resorcina-fucsina de Weigert revela dados para fibras do sistema elástico<sup>110,111</sup>.

O método picrossírius é específico e sensível para fibras colágenas. Este método é superior à outras colorações descritas, como à de Van Gieson e os tricrômios as quais falham em corar fibras colágenas muito finas<sup>102</sup>. Se usadas estas colorações a avaliação da quantidade de fibras de colágeno pode ser comprometida. Apesar de Junqueira *et al.*<sup>112</sup> descreverem a possibilidade de diferenciar os subtipos de colágeno pelo método de picrossírius – polarização, no qual os subtipos (colágeno I, III, IV) eram vistos com diferentes cores na luz polarizada, trabalhos subsequentes demonstraram que a polarização também é influenciada pela espessura das

fibras de colágeno<sup>113</sup>. Optou-se por utilizar o método picrossírius sem polarização para quantificar a densidade total de colágeno. Para distinção entre os subtipos (colágeno tipo I e tipo III) foi utilizada a técnica de imunistoquímica.

### **6.1.1 Padronização lesão e parâmetros**

A escolha da lesão na prega vocal baseou-se em estudos pilotos. Nestes, o tamanho da laringe do coelho limitou a precisão cirúrgica da realização de outra lesão que não a puntiforme, em modo de contato, sem pressionar a mucosa. Além disso, a injúria térmica lateral no tecido ao realizar a cordectomia com o laser é desconhecida. Para a cordectomia seria necessário realizar diferentes números de passadas do laser na prega vocal e na contralateral, resultando em não padronização da lesão. Por esse motivo, a lesão puntiforme foi escolhida para este trabalho; com objetivo de diminuir o viés de performance.

O intuito em lesar ambas as pregas vocais de um animal com o laser diodo foi avaliar qual comprimento de onda (980 nm e 1470 nm) provocaria maior alteração histopatológica inicial a qual pode refletir negativamente na formação da cicatriz madura.

Sabe-se que para qualquer tipo de laser a interação entre os cromóforos teciduais e o comprimento de onda é determinante na consequência da lesão térmica ao tecido adjacente<sup>114</sup>.

O laser com comprimento de onda de 980 nm é absorvido por cromóforos como a melanina e oxihemoglobina e menos absorvido pela

água quando comparado ao laser 1470 nm<sup>77</sup>. O laser diodo de comprimento de onda de 1470 nm tem maior absorção pela água e suas características de interação com o cromóforo tecidual são mais próximas ao laser de CO<sub>2</sub><sup>76</sup>.

Existem alguns dados publicados sobre os efeitos do laser de diodo de 940 nm em mucosa nasal, mostrando que este proporciona penetração tecidual mais profunda, com uma camada de carbonização mais fina e zona de coagulação entre um a três milímetros. Em contraste, o laser de CO<sub>2</sub> (10.600 nm) proporciona uma vaporização superficial do tecido, com uma ampla zona de carbonização e profundidade de penetração 0,1 mm. Tais dados foram avaliados por meio de microscopia ótica (coloração com hematoxilina e eosina) e microscopia eletrônica de varredura<sup>115</sup>.

Amplamente utilizado em cirurgias laríngeas, o laser de CO<sub>2</sub> ( $\lambda = 10.600$  nm), quando comparado ao laser diodo, tem absorção, ainda maior, pela água dos tecidos. Esta característica proporciona ao laser de CO<sub>2</sub> uma boa precisão cirúrgica, porém com menor capacidade de coagulação. Newman e Anand<sup>15</sup> referem que o laser diodo tem maior profundidade de penetração sendo ideal para fotocoagulação, já o laser de CO<sub>2</sub> é melhor utilizado para vaporização tecidual.

O tempo de exposição do tecido com o laser e a potência escolhida são parâmetros que definem a quantidade geral de energia fornecida ao tecido<sup>64</sup>. Assim, foi padronizada uma potência baixa (3 W) e tempo de exposição curto (7 segundos) para todos os procedimentos. A lesão foi pontual, pois a realização de uma incisão dificilmente teria precisão técnica igualitária; com o risco de gerar tempos diferentes para cada procedimento. A lesão realizada na prega



vocal não tinha o objetivo de causar uma úlcera ou uma incisão e sim proporcionar contato do laser com o tecido para que os danos térmicos no local lesionado e nas regiões adjacentes à lesão pudessem ser avaliados.

É importante ressaltar, que a presença de pequenos fragmentos de tecido carbonizado na ponta da fibra óptica ou nas superfícies anatômicas cirúrgicas, podem ocasionar a absorção de todos os comprimentos de onda da luz e provocar rapidamente um aquecimento. Portanto, é imprescindível remover a camada carbonizada<sup>116</sup>. Para evitar esse erro cada procedimento era precedido de clivagem da fibra óptica, assim a fibra utilizada não tinha restos de tecido; e o laser entrava em contato com o tecido uma única vez não havendo o risco de contato com tecido carbonizado na prega vocal.

Os demais parâmetros estudados (modo de energia pulsado ou contínuo, frequência de pulso, potência) foram definidos de acordo com trabalho anterior realizado pelo grupo de Laringologia da Universidade de São Paulo (*unpublished data*)<sup>21</sup>.

## **6.2 Efeito do Laser Diodo**

### **6.2.1 Parâmetros inflamatórios**

Os parâmetros de escolha do laser de diodo influenciam no dano térmico causado no tecido que pode variar, desde apenas um aquecimento térmico até a desnaturação de proteínas, vaporização da água e carbonização. Assim, o comprimento de onda, ajuste da potência, modo de energia, tempo de exposição são parâmetros importantes do laser que interferem na lesão térmica aos tecidos<sup>114,117</sup>.

A literatura mostra uma tendência de evolução do laser diodo em busca de um comprimento de onda mais próximo ao do CO<sub>2</sub> (Tabela 1).

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que observa lesões do laser diodo de 1470 nm em pregas vocais. Seria de se esperar que, por ter um comprimento de onda mais próximo do laser de CO<sub>2</sub>, o laser de 1470 nm promovesse uma lesão menor que o laser de 980 nm, tanto no intraoperatório, como na avaliação histológica. Contudo, não pudemos comprovar este fato, pelo menos na análise da fase aguda da cicatrização. Na verdade, para o tipo de lesão produzida no estudo, o laser de 1470 nm aparentou ser mais lesivo no intraoperatório que o laser de 980 nm. Contudo, tal diferença não se manteve na análise histológica da cicatrização, sendo que para algumas análises, o laser de 1470 nm aparentou ser menos lesivo.

**Quadro 1 - Evolução do comprimento de onda do laser de diodo em cirurgias laríngeas**

Autores	Ano	Tipo de doença laríngea	$\lambda$ (nm)	Potência (W)	Modo de radiação
Saetti <i>et al.</i> <sup>22</sup>	2003	Paralisia ppvv bilateral	810	10	-
Ferri <i>et al.</i> <sup>91</sup>	2006	Paralisia ppvv bilateral	810	10	Contínuo
Saetti <i>et al.</i> <sup>11</sup>	2008	Hemangioma/linfangioma subglótico	810	5 - 8	Contínuo/pulsado
Fanjul <i>et al.</i> <sup>95</sup>	2008	Diagnósticos variados	820+20	10 - 15	-
Ferri e Amato <sup>12</sup>	2008	Carcinoma glótico	810	5 - 60	Contínuo
Bajaj <i>et al.</i> <sup>14</sup>	2010	Diagnósticos variados	805	3 - 5	Contínuo
Liu <i>et al.</i> <sup>92</sup>	2013	Disfonia ventricular	810	máx. 5	Contínuo
Tunçel <i>et al.</i> <sup>93</sup>	2013	Carcinoma glótico	980	4 - 9	Contínuo
Karasu <i>et al.</i> <sup>16</sup>	2014	Pólipo vocal	980	3 - 5	Contínuo
Cömert <i>et al.</i> <sup>94</sup>	2014	Carcinoma glótico	980	4 - 9	Contínuo
Karkos <i>et al.</i> <sup>96</sup>	2016	Carcinoma glótico	980	6 - 8	Contínuo

Fonte: Adaptado Arroyo *et al.*<sup>20</sup>.

Onde:  $\lambda$  = comprimento de onda, ppvv = pregas vocais e máx. = máximo

No presente estudo, as 40 pregas vocais analisadas, após 7 e 30 dias do procedimento, apresentaram sinais de reepitelização completa. Este dado é semelhante ao encontrado por alguns autores que utilizaram instrumento frio e ao final da primeira semana pós-injúria observaram reepitelização completa<sup>39,105</sup>.

Em contraste, Imaizumi *et al.*<sup>107</sup> realizaram três diferentes cirurgias em pregas vocais de ratos com uso de instrumento frio. Essas lesões foram classificadas como lesão subepitelial (ressecção do epitélio e camada superficial da lâmina própria); lesão transmucosa (ressecção de epitélio e lâmina própria) e lesão transmuscular (ressecção do epitélio, lâmina própria

e porção superficial do músculo vocal). A cicatrização da ferida foi avaliada histologicamente em vários momentos até 35 dias após a lesão. Foi observado que a cicatrização completa ocorreu 14 dias após a cirurgia para lesão subepitelial e no 35º dia para lesão transmucosa. A lesão permaneceu presente no dia 35 para a lesão transmuscular.

A possível explicação para a reepitelização da lesão na fase aguda da cicatrização, observada no presente estudo, é que esta varia de acordo com a extensão e a profundidade da ressecção<sup>107</sup>. Desta forma, quanto menor a extensão da lesão, mais precoce é a reepitelização.

A extensão linear da lesão fibrótica foi maior no grupo de coelhos sacrificados com 7 dias pós-procedimento, modo de energia pulsado e comprimento de onda 980 nm. Esse achado demonstra que o comprimento de onda de 980 nm, a partir do ponto de indução da lesão à laser, apresenta um raio de agressão maior que o diodo 1470 nm; pelo menos na fase inicial, com 7 dias de evolução. Isto pode ser justificado pela maior absorção do laser de 980 nm no tecido devido à presença de abundante vascularização na submucosa.

Isto vem, ao encontro com a discussão sobre laser e absorção tecidual, visto que a interação fototérmica ocorre quando a energia do laser é absorvida pelo tecido e transformada em calor. Este é o ponto principal, que determina a capacidade do laser realizar corte e coagulação simultâneos. A extensão da absorção do calor é guiada pela presença de cromóforos nos tecidos (neste caso, a hemoglobina) e está fortemente relacionada ao o comprimento de onda do laser, sendo este, um dos parâmetros que determina o calor gerado no tecido<sup>18</sup>.

A maneira de utilizar o laser também vem evoluindo no que tange o modo de entrega de energia (contínuo ou pulsado). Segundo trabalho de Arroyo-Ramos *et al.*<sup>21</sup>, a utilização do laser diodo em pregas vocais parece ser suficiente no modo pulsado para ao menos lesões benignas e quando a margem cirúrgica é importante. O mesmo padrão evolutivo também aconteceu com o laser de CO<sub>2</sub>.

O objetivo deste estudo não era comparar modos de entrega do laser e optamos por limitar as análises estatísticas para dados pareados de um mesmo coelho (diodo 980 nm e 1470 nm), devido ao risco de viés de performance. Contudo, para algumas análises, como o grau de infiltrado inflamatório 30 dias após a lesão, o modo pulsado parece ser realmente menos lesivo que o contínuo.

### **6.2.2 Fibras elásticas**

As fibras elásticas têm papel essencial nas propriedades biomecânicas das pregas vocais<sup>18</sup>, e isto tem relação com sua densidade e organização no tecido<sup>33</sup>. Na prega vocal humana sem lesão, as fibras elásticas são abundantes na camada intermediária.

No presente estudo, as fibras elásticas apresentaram-se pouco desorganizadas nas proximidades às áreas de lesões e distribuíram-se ora verticalmente ora horizontalmente. Foi observada, perda parcial da linearidade na camada submucosa e distribuição esparsa nas áreas de injúria. Estes achados estão em concordância com a literatura<sup>5</sup>. Não houve diferença na densidade de fibras elásticas quando comparamos o uso de diferentes comprimentos de onda na prega vocal.

### 6.2.3 Fibras colágenas

O presente estudo descreve, principalmente, as fases iniciais do reparo à lesão. Isto se justifica pela observação do processo de epitelização, formação de tecido de granulação e início da fase de remodelação com a expressão de colágeno. O colágeno observado apresentou fibras delgadas e pouco organizadas nas áreas de tecido de granulação, em todos os grupos analisados, conforme seria esperado em cicatrizes na fase aguda.

A densidade de fibras colágenas mostrou-se mais elevada com o uso do laser com comprimento de onda 1470 nm, modo pulsado, no grupo de coelhos sacrificados com 7 dias pós-injúria. Este achado pode ser justificado, pois a metodologia de identificação de colágeno através da coloração picrossírius pode marcar outras fibras, além do colágeno tipo I. Ao analisar a imunistoquímica, deste mesmo grupo, este padrão não se repetiu<sup>51</sup>.

Não foram observadas diferenças estatísticas quanto à densidade de fibras colágenas nas análises nos Grupos I, II e IV.

A identificação de fibras de colágeno tipo I e III por imunistoquímica estão elevadas nos tecidos lesionados. Sabe-se, que os tecidos com maior concentração de colágeno são mais propensos a fibrose cicatricial<sup>103</sup>.

No presente estudo, o colágeno tipo I foi identificado em todas as pregas vocais analisadas. Ao analisar as áreas de lesões, na camada submucosa e muscular superficial, o colágeno tipo I apresentou-se com aspecto fragmentado, sem formação de feixes coesos e entre as fibras marcadas observou-se presença de edema intersticial.

Não houve diferença estatística quanto a análise do colágeno tipo I entre coelhos do mesmo grupo. Ao analisar a lesão como um todo, não houve uma diferença quanto a extensão, profundidade e gravidade da mesma ao comparar o uso de diferentes comprimentos de onda. Desta maneira, foi possível a identificação do colágeno tipo I, porém não houve diferença na quantificação deste componente entre coelhos do mesmo grupo.

Reconhecemos que os resultados negativos do estudo podem decorrer do número relativamente pequeno de pregas vocais analisadas (40 no total), limitando o poder das análises e aumentando o risco de resultados falso-negativos (erro tipo II). Por outro lado, acreditamos que diferenças entre os lasers de 980 nm e 1470 nm, se existirem, não devem ser de grande magnitude.

As análises das lâminas colágeno tipo III demonstraram positividade em apenas três casos. Nos três casos analisados foram observados presença de eosinófilos e neutrófilos, demonstrando um processo ainda em fase subaguda de resolução para este modelo experimental. O colágeno tipo III é precoce e possivelmente foi substituído pelo colágeno tipo I o qual foi observado em todas as lâminas.

Estes achados no presente estudo, corroboram com os de Mau *et al.*<sup>6</sup>, que compararam presença de colágeno tipo I e III em prega vocal de coelho quatro semanas após injúria por laser Holmium:YAG *versus* prega vocal controle. Os pesquisadores observaram presença de colágeno tipo I nas pregas vocais que sofreram lesão com laser, mas não do colágeno tipo III.

Em outro trabalho, o qual contrasta com o atual estudo, o uso de instrumento frio foi escolhido para lesionar as pregas vocais. Neste, os autores observaram a diminuição de colágeno tipo I do 5º ao 7º dia, enquanto o tipo III permaneceu inalterado do dia 3º ao 14º dia. De acordo com os achados combinados, de colágeno tipo I e tipo III, após agressão na prega vocal com instrumento frio, os autores sugerem que a substituição do colágeno tipo I pelo colágeno tipo III, começa por volta do 7º dia<sup>105</sup>. No presente estudo, observamos colágeno tipo I nos animais sacrificados após 7 e 30 dias de lesão e o colágeno tipo III foram observados apenas em lâminas nas quais a lesão apresentavam características mais agudas; com tais achados, provavelmente, o colágeno tipo III foi substituído precocemente nas pregas vocais deste estudo.

Ao analisar a cicatrização de feridas cutâneas o colágeno tipo III é sintetizado rapidamente sendo utilizado como suporte; enquanto o colágeno tipo I é sintetizado, posteriormente, provavelmente 3 dias após a lesão<sup>51</sup>.

Também foi descrito, que em lesões realizadas no palato o colágeno tipo III apareceu precocemente quando comparado ao colágeno I. Este padrão sugere que o colágeno tipo III aparece na lesão mais precocemente que o tecido de granulação e é substituído pelo colágeno tipo I, o que vai de encontro com o achado deste estudo. Para concluir, o colágeno tipo III teria função na estruturação do tecido de granulação e o colágeno tipo I poderia acrescentar força a este novo tecido lesionado das pregas vocais<sup>55</sup>.



### **6.3 Perspectivas Futuras**

Este estudo foi o primeiro a analisar as reações histopatológicas após lesão com laser diodo com diferentes comprimentos de onda, nas fases agudas da cicatrização, demonstrando não haver diferença no infiltrado inflamatório e na quantificação de colágeno tipo I e III.

A metodologia do estudo, entretanto, não incluiu avaliação da fase crônica da cicatrização e avaliação funcional das pregas vocais. Dessa forma, novos estudos que avaliem fases mais tardias da cicatrização, assim como, as propriedades viscoelásticas dessas pregas vocais, por meio de métodos reológicos adaptados ao modelo animal, permitiriam saber se o uso deste instrumento têm impacto na vibração cordal.

## **7 CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso de diferentes comprimentos de onda na prega vocal do coelho não apresenta diferença significativa na extensão do processo inflamatório, na profundidade da lesão e na quantificação de colágeno tipo I e III.

- Embora o uso do comprimento de onda 980 nm, pulsado, possa ser capaz de aumentar a extensão da lesão fibrótica na fase inicial (7 dias) quando comparado ao comprimento de onda 1470 nm; ao analisarmos a evolução da cicatrização, tal padrão não foi observado aos 30 dias sugerindo que este padrão não se perpetua nas fases evolutivas da cicatrização.

- A análise do colágeno por coloração picrossírius demonstrou que este foi significativamente aumentado no comprimento de onda 1470 nm, modo pulsado, quando analisado os animais sacrificados com 7 dias. Tal achado, também não foi perpetuado na fase avançadas da cicatrização (30 dias) e não foi confirmado pelo método de imunoistoquímica que é considerado superior para análise do colágeno.

Desta forma, podemos sugerir que não há diferenças histológicas significativas na cicatrização inicial quando utilizamos laser com os comprimentos de onda 980 nm ou 1470 nm.

## **8 ANEXOS**

**Anexo A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 27/01/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **163/14** intitulado: **“Estudo da cicatrização de pregas vocais em coelhos pelo uso do laser diodo a 980 nm e 1470 nm”** que utilizará **20** animais da espécie **coelho**, apresentado pelo Departamento de Otorrinolaringologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Rui Imamura**

**Pesquisador (a) Executante: Larissa Neri**

**CEUA-FMUSP, 27 de Janeiro de 2015**

**Dr. Eduardo Pompeu**  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

## Anexo B - Tabelas de aleatorização dos parâmetros variáveis utilizado em cada grupo

### Grupo 1 - Modo de energia: Pulsado | Tempo de sacrifício: 30 dias

	PVD $\lambda$ (nm)	PVE $\lambda$ (nm)
Coelho 1	1470	980
Coelho 2	980	1470
Coelho 3	980	1470
Coelho 4	980	1470
Coelho 5	1470	980

### Grupo 2 - Modo de energia: Contínuo | Tempo de sacrifício: 30 dias

	PVD $\lambda$ (nm)	PVE $\lambda$ (nm)
Coelho 6	980	1470
Coelho 7	1470	980
Coelho 8	1470	980
Coelho 9	980	1470
Coelho 10	1470	980

### Grupo 3 - Modo de energia: Pulsado | Tempo de sacrifício: 7 dias

	PVD $\lambda$ (nm)	PVE $\lambda$ (nm)
Coelho 11	980	1470
Coelho 12	980	1470
Coelho 13	1470	980
Coelho 14	980	1470
Coelho 15	1470	980

### Grupo 4 - Modo de energia: Contínuo | Tempo de sacrifício: 7 dias

	PVD $\lambda$ (nm)	PVE $\lambda$ (nm)
Coelho 16	980	1470
Coelho 17	1470	980
Coelho 18	980	1470
Coelho 19	1470	980
Coelho 20	1470	980

## **9 REFERÊNCIAS**

1. Benninger M, Murry T. *The performer's voice*. San Diego, CA: Plural Publishing, 2006.
2. Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope*. 2000;110(5 Pt 1):814-24.
3. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1974;26(2):89-94.
4. Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Daniloff R, editor. *Speech science: recent advances*. San Diego, CA: College-Hill Press, 1985. p. 1-46.
5. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, Bless DM. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice*. 2004;18(1):116-24.
6. Mau T, Du M, Xu CC. A rabbit vocal fold laser scarring model for testing lamina propria tissue-engineering therapies. *Laryngoscope*. 2014;124(10):2321-6.



7. Mitchell JR, Kojima T, Wu H, Garrett CG, Rousseau B. Biochemical basis of vocal fold mobilization after microflap surgery in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2014;124(2):487-93.
8. Fichera L. *Cognitive supervision for robot-assisted minimally invasive laser surgery - Springer Theses*. Genova: University of Genova; 2016.
9. Liboon J, Funkhouser W, Terris DJ. A comparison of mucosal incisions made by scalpel, CO2 laser, electrocautery, and constant-voltage electrocautery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;116(3):379-85.
10. Tipton WW, Garrick JG, Riggins RS. Healing of electrosurgical and scalpel wounds in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*. 1975;57(3):377-9.
11. Saetti R, Silvestrini M, Cutrone C, Narne S. Treatment of congenital subglottic hemangiomas: our experience compared with reports in the literature. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(8):848-51.
12. Ferri E, Armato E. Diode laser microsurgery for treatment of Tis and T1 glottic carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2008;29(2):101-5.
13. Sroka R. In-vitro comparison of the tissue vaporisation capabilities of different lasers. *Med Laser Appl*. 2008;22(4):227-31.
14. Bajaj Y, Pegg D, Gunasekaran S, Knight LC. Diode laser for paediatric airway procedures: a useful tool. *Int J Clin Pract*. 2010;64(1):51-4.
15. Newman J, Anand V. Applications of the diode laser in otolaryngology. *Ear Nose Throat J*. 2002;81(12):850-1.

16. Karasu MF, Gundogdu R, Cagli S, Aydin M, Arli T, Aydemir S, Yuce I. Comparison of effects on voice of diode laser and cold knife microlaryngology techniques for vocal fold polyps. *J Voice*. 2014;28(3):387-92.
17. Angiero F, Benedicenti S, Romanos GE, Crippa R. Treatment of hemangioma of the head and neck with diode laser and forced dehydration with induced photocoagulation. *Photomedicine and laser surgery*. 2008;26(2):113-8.
18. Guney M, Tunc B, Gulsoy M. Investigating the ablation efficiency of a 1940-nm thulium fibre laser for intraoral surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(8):1015-21.
19. Rubinstein M, Armstrong WB. Transoral laser microsurgery for laryngeal cancer: a primer and review of laser dosimetry. *Lasers Med Sci*. 2011;26(1):113-24.
20. Arroyo HH, Neri L, Fussuma CY, Imamura R. Diode Laser for laryngeal surgery: a systematic review. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2016;20(2):172-9.
21. Arroyo Ramos HH. Estudo histológico dos efeitos agudos de lesão com laser de diodo 980 nm em pregas vocais de coelhos [[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.
22. Agada FO, Bell J, Knight L. Subglottic cysts in children: a 10-year review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70(8):1485-8.

23. Saetti R, Silvestrini M, Cutrone C, Barion U, Mirri L, Narne S. Endoscopic treatment of upper airway and digestive tract lesions caused by caustic agents. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(1):29-36.
24. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations *Otol Fukuoka*; 1975. 239-45 p.
25. Hirano M. Structure of vocal fold en normal and disease states: anatomical and physical studies. *ASHA Rep*; 1981;(11):11-30.
26. Milutinovic Z, Polic D, Milenkovic S, Sretenovic V. Spatial arrangement of the structural elements of vocal fold layers: an adjustment to the vibration process. *J Voice*. 1998;12(1):17-20.
27. Ishii K, Yamashita K, Akita M, Hirose H. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(11):1055-64.
28. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett*. 1990;268(2):386-93.
29. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol*. 1996;116(5):778-82.
30. Madruga de Melo EC, Lemos M, Aragao Ximenes Filho J, Sennes LU, Nascimento Saldiva PH, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113(12):2187-91.

31. Gray SD. Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000;33(4):679-98.
32. Kurita S, Nagata K, Hirano M. *A comparative study of the layer structure of the vocal fold.* San Diego: Hill Press, 1983.
33. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice.* 2002;16(1):96-104.
34. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, Bless DM. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope.* 2003;113(4):620-7.
35. Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cir Bras.* 2009;24(4):325-8.
36. Bless DM, Welham NV. Characterization of vocal fold scar formation, prophylaxis, and treatment using animal models. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;18(6):481-6.
37. Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today.* 1998;4(2):69-75.
38. Balbino CA, Paulo UdS, Pereira LM, Paulo UdS, Curi R, Paulo UdS. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005;41(1):27-51.

39. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(1 Pt 1):19-24.
40. Schilling JA. Wound healing. *Surg Clin North Am*. 1976;56(4):859-74.
41. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
42. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
43. Coltran R, Kumar V, Robbins S. *Inflamação e reparo*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
44. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
45. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005;31(6):674-86; discussion 86.
46. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
47. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol*. 1985;121(3):394-403.

48. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013. p. 379-88.
49. Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(7):357-68.
50. Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, Senarath-Yapa K, McArdle A, Tevlin R, Wearda T, Paik KJ, Duldulao C, Hong WX, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing: an update. *Regen Med*. 2014;9(6):817-30.
51. Stephens P, Thomas DW. The cellular proliferative phase of the wound repair process. *J Wound Care*. 2002;11(7):253-61.
52. Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol*. 1986;119(2):219-34.
53. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-58.
54. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003;200(4):500-3.

55. Cornelissen AM, Stoop R, Von den Hoff HW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(1):1-7.
56. Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res*. 1985;5(6):481-92.
57. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*. 1998;25(3):321-40.
58. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. *J Voice*. 2005;19(2):283-9.
59. Branski RC, Verdolini K, Sandulache V, Rosen CA, Hebda PA. Vocal fold wound healing: a review for clinicians. *J Voice*. 2006;20(3):432-42.
60. Lorentz HA. *The theory of electrons*. New York: Dover, 1952.
61. Pinto JA, D'Ávila JS. *Laser em otorrinolaringologia e cirurgia de cabeça e pescoço*. Aracaju: n.i., 2006. p. 324.
62. Maiman TH, Hughes Research Laboratories M, California. *Optical and microwave-optical experiments in ruby*. *Phys Rev Lett*. 1960;4(11):564.

63. Javan A, Bell Telephone Laboratories MH, New Jersey, W. R. Bennett J, Bell Telephone Laboratories MH, New Jersey, Herriott DR, Bell Telephone Laboratories MH, New Jersey. Population Inversion and Continuous Optical Maser Oscillation in a Gas Discharge Containing a He-Ne Mixture. *Phys Rev Lett*. 1961;6(3):106.
64. Yan Y, Olszewski AE, Hoffman MR, Zhuang P, Ford CN, Dailey SH, Jiang JJ. Use of lasers in laryngeal surgery. *J Voice*. 2010;24(1):102-9.
65. Ossoff RH, Matar SA. The advantages of laser treatment of tumors of the larynx. *Oncology (Williston Park)*. 1988;2(9):58-61, 4-5.
66. Strong MS, Jako GJ. Laser surgery in the larynx. Early clinical experience with continuous CO2 laser. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1972;81(6):791-8.
67. Strong MS. Laser excision of carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 1975;85(8):1286-9.
68. Ossoff RH, Coleman JA, Courey MS, Duncavage JA, Werkhaven JA, Reinisch L. Clinical applications of lasers in otolaryngology--head and neck surgery. *Lasers Surg Med*. 1994;15(3):217-48.
69. Dhar P, Malik A. Anesthesia for laser surgery in ENT and the various ventilatory techniques. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2011;1(2):60-6.



70. De Martin Junior J. Sistema de laser de diodo de cavidade estendida para padrões de frequência [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.
71. Lopes LA. *Laserterapia: conceitos e aplicações* [cited 2017 Nov 2]. Available from: [http://www.nupen.com.br/Revista\\_port/introducao.php](http://www.nupen.com.br/Revista_port/introducao.php).
72. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol*. 2013;58(11):R37-61.
73. Fortune DS, Huang S, Soto J, Pennington B, Ossoff RH, Reinisch L. Effect of pulse duration on wound healing using a CO2 laser. *Laryngoscope*. 1998;108(6):843-8.
74. Merlo I. *Laser 1470*. In: V Simpósio Internacional de Flebologia; Belo Horizonte - MG, 2014.
75. Silfvast WT. *Laser Fundamentals*. 2<sup>a</sup> ed. EUA: Cambridge University Press; 2004.
76. Fornaini C, Merigo E, Sozzi M, Rocca JP, Poli F, Selleri S, Cucinotta A. Four different diode lasers comparison on soft tissues surgery: a preliminary ex vivo study. *Laser Ther*. 2016;25(2):105-14.
77. Havel M, Betz CS, Leunig A, Sroka R. Diode laser-induced tissue effects: in vitro tissue model study and in vivo evaluation of wound healing following non-contact application. *Lasers Surg Med*. 2014;46(6):449-55.

- 
78. Dilkes MG, Cameron I, Quinn SJ, Kenyon GS. Preliminary experience with an 810 nm wavelength diode laser in ENT surgery | SpringerLink. *Lasers Med Sci.* 1994;9(4):261-4.
  79. Veit JA, Nordmann M, Dietz B, Sommer F, Lindemann J, Rotter N, et al. Three different turbinoplasty techniques combined with septoplasty: Prospective randomized trial. *Laryngoscope.* 2017;127(2):303-8.
  80. Hamerschmidt R, Saab SS, Carvalho B, Carmo CD. Short-Term Audiological results of diode laser in comparison with manual perforation in stapes surgery. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2018;22(2):119-24.
  81. Poe DS. Laser-assisted endoscopic stapedectomy: a prospective study. *Laryngoscope.* 2000;110(5 Pt 2 Suppl 95):1-37.
  82. D'Eredita R, Marsh RR. Contact diode laser tonsillectomy in children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131(5):732-5.
  83. D'Eredita R, Lens MB. Contact-diode laser repair of bony choanal atresia: a preliminary report. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008;72(5):625-8.
  84. Angiero F, Benedicenti S, Romanos GE, Crippa R. Sialolithiasis of the submandibular salivary gland treated with the 810- to 830-nm diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):517-21..

85. Luers JC, Petry-Schmelzer JN, Hein WG, Gostian AO, Huttenbrink KB, Beutner D. Fragmentation of salivary stones with a 980 nm diode laser. *Auris Nasus Larynx*. 2014;41(1):76-80.
86. Havel M, Sroka R, Leunig A, Patel P, Betz CS. A double-blind, randomized, intra-individual controlled feasibility trial comparing the use of 1,470 and 940 nm diode laser for the treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates. *Lasers Surg Med*. 2011;43(9):881-6.
87. Havel M, Sroka R, Englert E, Stelter K, Leunig A, Betz CS. Intraindividual comparison of 1,470 nm diode laser versus carbon dioxide laser for tonsillotomy: a prospective, randomized, double blind, controlled feasibility trial. *Lasers Surg Med*. 2012;44(7):558-63.
88. Elbadawey MR, Hegazy HM, Eltahan AE, Powell J. A randomised controlled trial of coblation, diode laser and cold dissection in paediatric tonsillectomy. *J Laryngol Otol*. 2015;129(11):1058-63.
89. Wang Z, Pankratov MM, Rebeiz EE, Perrault DF, Jr., Shapshay SM. Endoscopic diode laser welding of mucosal grafts on the larynx: a new technique. *Laryngoscope*. 1995;105(1):49-52.
90. Jameson JJ, Moses RD, Vellayappan U, Lathi KG. Use of the laryngeal mask airway for laser treatment of the subglottis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;123(1 Pt 1):101-2.
91. Ferri E, Garcia Purrinos FJ. Diode laser surgery in the endoscopic treatment of laryngeal paralysis. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006;57(6):270-4.

92. Liu SC, Lin DS, Su WF. The role of diode laser in the treatment of ventricular dysphonia. *J Voice*. 2013;27(2):250-4.
93. Tuncel U, Comert E. Preliminary results of diode laser surgery for early glottic cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;149(3):445-50.
94. Comert E, Tuncel U, Dizman A, Guney YY. Comparison of early oncological results of diode laser surgery with radiotherapy for early glottic carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;150(5):818-23.
95. Fanjul M, Garcia-Casillas MA, Parente A, Canizo A, Lain A, Matute JA, Vásquez J. Diode laser application for the treatment of pediatric airway pathologies. *Cir Pediatr*. 2008;21(2):79-83.
96. Karkos PD, Stavrakas M, Markou K. Early glottic cancer and difficult laryngoscopy: flexible endoscopic diode laryngeal laser-assisted surgery - a pilot study of an oncologically safe tool. *Clin Otolaryngol*. 2016;41(6):830.
97. Miziara ID, Magalhaes AT, Santos M, Gomes EF, Oliveira RA. Research ethics in animal models. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(2):128-31.
98. Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PH. Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;119(2):133-9.

99. Dias Garcia RI, Tsuji DH, Imamura R, Mauad T, Ferraz da Silva LF. Effects of hepatocyte growth factor injection and reinjection on healing in the rabbit vocal fold. *J Voice*. 2012;26(5):667.e7-12.
100. Takahashi-Ramos MT. *Estudo histomorfométrico do efeito da injeção de dexametasona na fase tardia de cicatrização de prega vocal de coelho* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.
101. Divi V, Benninger M, Kiupel M, Dobbie A. Coblation of the canine vocal fold: a histologic study. *J Voice*. 2012;26(6):811.e9-13.
102. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.
103. Benninger 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.
104. Woo P, Casper J, Colton R, Brewer D. Diagnosis and treatment of persistent dysphonia after laryngeal surgery: a retrospective analysis of 62 patients. *Laryngoscope*. 1994;104(9):1084-91.
105. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(4):285-92.

- 
106. Leydon C, Imaizumi M, Yang D, Thibeault SL, Fried MP. Structural and functional vocal fold epithelial integrity following injury. *Laryngoscope*. 2014;124(12):2764-9.
  107. Imaizumi M, Thibeault SL, Leydon C. Classification for animal vocal fold surgery: resection margins impact histological outcomes of vocal fold injury. *Laryngoscope*. 2014;124(11):E437-44.
  108. Thibeault SL, Duflo S. Inflammatory cytokine responses to synthetic extracellular matrix injection to the vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(3):221-6.
  109. Lin Y, Yamashita M, Zhang J, Ling C, Welham NV. Pulsed dye laser-induced inflammatory response and extracellular matrix turnover in rat vocal folds and vocal fold fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2009;41(8):585-94.
  110. Paulsen F, Kimpel M, Lockemann U, Tillmann B. Effects of ageing on the insertion zones of the human vocal fold. *J Anat*. 2000;196 (Pt 1):41-54.
  111. Nita LM, Battlehner CN, Ferreira MA, Imamura R, Sennes LU, Caldini EG, et al. The presence of a vocal ligament in fetuses: a histochemical and ultrastructural study. *J Anat*. 2009;215(6):692-7.
  112. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41(3):267-74.

- 
113. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989;93(1):27-9.
114. D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(6):764-73.
115. Janda P, Sroka R, Baumgartner R, Grevers G, Leunig A. Laser treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates: a review. *Lasers Surg Med*. 2001;28(5):404-13.
116. Spencer P, Cobb CM, Wieliczka DM, Glaros AG, Morris PJ. Change in temperature of subjacent bone during soft tissue laser ablation. *J Periodontol*. 1998;69(11):1278-82.
117. Schaffer CJ, Reinisch L, Polis SL, Stricklin GP. Comparisons of wound healing among excisional, laser-created, and standard thermal burns in porcine wounds of equal depth. *Wound Repair Regen*. 1997;5(1):52-61.
118. Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(1):77-85.