

Jan Alessandro Socher

Impacto da mitomicina-C tópica na deposição de colágeno em torno de enxertos de gordura na prega vocal de coelhos: estudo histológico e morfométrico

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

**Área de concentração: Otorrinolaringologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Socher, Jan Alessandro

Impacto da mitomicina-C tópica na deposição de colágeno em torno de enxertos de gordura na prega vocal de coelhos : estudo histológico e morfométrico / Jan Alessandro Socher. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Cordas vocais/anatomia & histologia 2.Coelhos/cirurgia
3.Transplante autólogo/efeitos adversos 4.Colágeno/ultraestrutura 5.Mitomicina-C/uso terapêutico 6.Gordura subcutânea/transplante

USP/FM/SBD-076/09

Dedicatória

Dedico carinhosamente este trabalho

aos meus Pais Hugo e Leonir,

fontes do sopro da minha vida,

minha inspiração de trabalho, honestidade e determinação.

Cada suspiro da minha vida eu respiro por vocês.

Cada momento da minha vida eu penso em vocês.

Cada segundo da minha vida eu vivo para vocês.

Ao meu Orientador de Tese de Doutorado

Professor Doutor Luiz Ubirajara Sennes,

*Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
meu agradecimento especial pela total confiança depositada
no desenvolvimento desta tese e por todo o apoio dedicado*

nestes anos à pesquisa científica.

Todos os conselhos aliados ao seu experiente rigor científico

me inspiraram na execução deste trabalho.

Muito obrigado por ter permitido que eu concretizasse um

sonho que se tornou uma realidade tão sólida quanto a

admiração e respeito que tenho pelo senhor.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Ricardo Ferreira Bento,**

Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
agradeço por me oferecer todo o suporte e apoio desta Instituição para promover o
ensino e a pesquisa científica em um nível de excelência.

Ao **Professor Doutor Domingos Hiroshi Tsuji,**

Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
agradeço com meu sincero reconhecimento por todas as sugestões e o auxílio prestado
com sua participação ativa durante o período experimental cirúrgico desta pesquisa.

Ao **Doutor Rui Imamura,**

Médico Contratado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
agradeço pelas inúmeras sugestões e pela generosa ajuda com seu inquestionável
conhecimento e rigor científicos nos vários estágios da execução deste estudo,
especialmente na redação do artigo e na análise estatística.

Ao **Doutor Christiano Giacomo Carneiro,**

Médico Otorrinolaringologista,
meu Professor de Laringologia no Instituto Felippu de Otorrinolaringologia,
agradeço por todo o incentivo e auxílio prestados em todas as fases desta pesquisa.
Desde o início me apoiou incondicionalmente e participou ativamente na execução deste
estudo. Meu sincero reconhecimento para aquele que sempre foi para mim uma
excelente referência profissional.

Ao Doutor Alexandre Murta,
Médico Otorrinolaringologista,
meu Professor de Rinologia e Cirurgia Plástica no Instituto Felippu de
Otorrinolaringologia,
Amigo sincero,
agradeço por todas as sugestões que foram aplicadas nesta tese, principalmente naqueles
momentos adversos que eu mais precisava.

Ao Professor Doutor Paulo Hilário Nascimento Saldiva,
Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
agradeço pelo incentivo fornecendo conhecimento e estrutura para o desenvolvimento
desta pesquisa científica.

Ao Doutor Luiz Fernando Ferraz da Silva (“Burns”),
Médico Assistente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
agradeço pela disposição e pela generosa orientação prestada na avaliação histológica e
morfométrica deste trabalho.

Às Professora Doutora Marisa Dolhnikoff e Professora Doutora Thais Mauad,
Professoras do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo,
agradeço pelo apoio dispendido a estrutura e equipamentos do Museu de Anatomia
Patológica necessários para a execução deste estudo.

Ao Prof. Carlos Efrain Stein,

Professor do Departamento de Matemática do Centro de Ciências Exatas e Naturais da
Fundação Universidade de Blumenau,
agradeço pela disposição na consultoria de elaboração e revisão da análise estatística
deste trabalho científico.

Ao Dr. Alexandre Felippu,

Médico Otorrinolaringologista,
Diretor do Instituto Felippu de Otorrinolaringologia,
meu Mestre e Mentor,

agradeço por todos os ensinamentos e pelo constante incentivo profissional. Meu eterno
e sincero agradecimento por todo conhecimento e toda experiência profissional
compartilhados durante estes anos.

Ao Dr. Edgar Arruda Salomé Filho,

Médico Otorrinolaringologista,
meu Amigo e meu “Pai” nesta profissão,
agradeço por todos os conselhos e por toda a confiança depositada desde o início num
dia qualquer no ambulatório do Sistema Único de Saúde de Blumenau/Santa Catarina.

Aos membros da banca de qualificação

Doutor Michel Cahali,

Doutor Rui Imamura,

Professor Doutor Domingos Hiroshi Tsuji,

Doutora Renata Cantisani di Francesco e

Doutor Christiano Giacomo Carneiro

agradeço por todas as sugestões, ponderações e correções pertinentes aplicadas
integralmente na redação final deste trabalho científico.

Aos meus colegas de Pós-Graduação e residentes da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a

Doutor Rogério Borghi Bühler,

Doutor Flávio Akira Sakae,

Dr^a Adriana Hachiya,

Dr^a Roberta Ismael Dias Garcia e,

Dr. Fabrício Scapini,

agradeço pelo companheirismo, apoio e por dividirem as alegrias e dificuldades encontradas durante estes anos de pesquisa científica.

À Dayra Dill,

minha Amiga,

minha Amada,

minha “polaquinha” do coração,

agradeço por seu companheirismo em todos os momentos, sejam felizes ou mesmo desfavoráveis, sejam naquelas tristezas ou alegrias.

Aos colegas e residentes do Instituto Felippu de Otorrinolaringologia,

agradeço pelo apoio e motivação.

Aos funcionários da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **Márcia, Bárbara, Lucy, Marileide, Ofélia, Lucia, Jorge, Edizira, Ana Paula, Katia** e bióloga **Melissa**, agradeço por todo o apoio e auxílio prestados nas diversas fases desta pesquisa.

Aos funcionários do Museu de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **Reginaldo, Ana** e técnica do Laboratório de Patologia **Cássia**, agradeço por todo o auxílio prestado na fase de confecção e análise das lâminas.

A minha irmã **Tatiana Kely Socher**,
agradeço por estar sempre presente, apesar das adversidades, com suas sugestões,
principalmente naqueles momentos mais difíceis.

À FAPESP –

Fundação de Amparo e Ensino à Pesquisa do Estado de São Paulo,
agradeço por aprovar e financiar os relevantes custos para a execução deste estudo,
principalmente no que diz respeito à aquisição de materiais e equipamentos necessários
não somente para este mas também para projetos futuros.

Ao CNPQ –

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
agradeço pela contribuição financeira através da bolsa de estudos, incentivo fundamental
para o desenvolvimento e a manutenção desta pesquisa científica.

Finalmente,

a todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão deste
projeto, mas que por eventual esquecimento da minha parte não estejam relacionadas,
meu sincero agradecimento.

*“As tempestades fazem com que os carvalhos
criem raízes mais profundas”.*

*George Herbert
Filósofo americano*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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 A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva D. S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

Revista *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* – Instruções para autores

Revista *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* – Submissão do artigo

Revista *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* – Artigo

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	08
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 INSUFICIÊNCIA GLÓTICA	11
3.2 USO DE ANIMAIS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS	13
3.3 A CASCATA DE EVENTOS DO PROCESSO CICATRICIAL.....	14
3.4 A ESTRUTURA DAS FIBRAS COLÁGENAS	20
3.5 CICATRIZAÇÃO NA PREGA VOCAL DE COELHOS	22
3.6 ENXERTO DE GORDURA AUTÓLOGA NAS PREGAS VOCAIS.....	24
3.7 ESTUDOS COM ENXERTO DE GORDURA NAS PREGAS VOCAIS	29
3.8 A MITOMICINA -C E SUAS APLICAÇÕES	42
3.9 IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO PELO MÉTODO DA PICROSSÍRIUS-POLARIZAÇÃO	48
3.10 ANÁLISE COMPUTADORIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO	52
3.11 BIOESTATÍSTICA E SUAS APLICAÇÕES	57
3.12 MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL	58
3.13 MEDIDAS DE DISPERSÃO OU DE VARIABILIDADE.....	60
3.14 TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (K-S)	62
3.15 TESTE “t” DE STUDENT	63
3.16 TESTES DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).....	64
3.17 TESTE DE TUKEY (HSD)	68
4 MÉTODOS	69

4.1 AMOSTRAGEM.....	70
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	70
4.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS	73
4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE MITOMICINA-C	73
4.5 TÉCNICA CIRÚRGICA	74
4.5.1 Anestesia dos coelhos	74
4.5.2 Posicionamento dos coelhos	74
4.5.3 Abordagem da laringe	75
4.5.4 Preparo e obtenção do enxerto de gordura.....	75
4.5.5 Aplicação da solução de Mitomicina-C e inserção do enxerto de gordura.....	76
4.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	79
4.7 ISOLAMENTO DA PREGA VOCAL.....	79
4.8 PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS	80
4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	82
4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	83
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	89
5 RESULTADOS	93
5.1 CARACTERÍSTICAS DOS COELHOS	94
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO ENXERTO DE GORDURA	95
5.3 RELAÇÃO DO ENXERTO DE GORDURA COM AS ESTRUTURAS ADJACENTES	95
5.4 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE AS PREGAS VOCAIS	97
5.5 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS E AS PREGAS VOCAIS	99
5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS NAS PREGAS VOCAIS DE CONTROLE	99
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS NAS PREGAS VOCAIS COM MITOMICINA-C	100
6 DISCUSSÃO	102
6.1 A UTILIZAÇÃO DE COELHOS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS	103
6.2 APLICAÇÃO DA MITOMICINA-C NA LARINGOLOGIA	107
6.3 O USO DE ENXERTO AUTÓLOGO DE GORDURA	110
6.4 MÉTODO ESTEREOLÓGICO OU MORFOMÉTRICO	112
6.5 MÉTODO DE COLORAÇÃO POR PICROSSÍRIUS-POLARIZAÇÃO.....	115
6.6 DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS	117
6.7 PROCESSO CICATRICIAL NA PREGA VOCAL DE COELHOS	119
6.8 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE AS PREGAS VOCAIS	120
6.9 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NAS PREGAS VOCAIS DE CONTROLE	122
6.10 DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS NAS PREGAS VOCAIS COM MITOMICINA-C	123
7 CONCLUSÕES	126
8 ANEXOS	129
ANEXO A – APROVAÇÃO DA CAPPesq DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMUSP	130
ANEXO B - EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA DOS DIFERENTES GRUPOS DE COELHOS	131
ANEXO C – LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G1 (7 DIAS).....	132
ANEXO D – LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G2 (14 DIAS)	134
ANEXO E – LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G3 (30 DIAS).....	137
ANEXO F – LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G4 (90 DIAS).....	140
ANEXO G – TESTE “t” DE <i>STUDENT</i>	142
ANEXO H - TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE UM FATOR COM REPETIÇÃO (PVE)	144
ANEXO I - TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE UM FATOR COM REPETIÇÃO (PVD)	146
ANEXO J – INCREMENTO DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS G1 E G4	148
9 REFERÊNCIAS	149
10 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	173

LISTA DE ABREVIATURAS

Acad.	do inglês <i>Academy</i> , academia
Am.	do inglês <i>American</i> , americano(a)
Anat.	do inglês <i>Anatomy</i> , anatomia
Ann.	do inglês <i>Annals</i> , anais
Appl.	do inglês <i>Applied</i> , aplicado(a)
Arch.	do inglês <i>Archives</i> , arquivos
Arq.	arquivos
Biochem.	do inglês <i>Biochemistry</i> , bioquímica
Biol.	do inglês <i>Biology</i> ou <i>Biological</i> , biologia ou biológico(a)
Br.	do inglês <i>British</i> , britânico(a)
Bras.	brasileiro(a)
Braz.	do inglês <i>Brazilian</i> , brasileiro(a)
Cad.	cadernos
Chir.	do alemão <i>Chirurgie</i> ou <i>Chirurgische</i> , cirurgia ou cirúrgico(a)
Clin.	do inglês <i>Clinical</i> , clínico(a)
colab.	colaborador(es)
Corp.	do inglês <i>Corporation</i> , corporação
Crit.	do inglês <i>Critical</i> , crítico(a)

Cytochem.	do inglês <i>Cytochemistry</i> , citoquímica
Dermatol.	do inglês <i>Dermatology</i> , dermatologia
Dr.	doutor
ed.	edição
Engl.	do inglês <i>England</i> , inglês(a)
et al.	e outros
Eur.	do inglês <i>European</i> , europeu ou européia
ex.	exemplo
Exp.	do inglês <i>Experimental</i> , experimental
fig.	figura
Ginecol.	do inglês <i>Gynecology</i> , ginecologia
Histochem.	do inglês <i>Histochemistry</i> , histoquímica
Histol.	do inglês <i>Histology</i> ou <i>Histological</i> , histologia ou histológico(a)
Histopathol.	do inglês <i>Histopathology</i> , histopatologia
Inc.	do inglês <i>Incorporation</i> , empresa
Inst.	instituto
Int.	do inglês <i>International</i> , internacional
Invest.	do inglês <i>Investigative</i> , investigativo(a)
J.	do inglês <i>Journal</i> , jornal
Jpn.	do inglês <i>Japanese</i> , japonês(a)
Laryngol.	do inglês <i>Laryngology</i> , laringologia
Med.	do inglês <i>Medical</i> ou <i>Medicine</i> , médico(a) ou medicina
Mem.	memórias

N.	do inglês <i>New</i> , novo(a)
Oftal.	oftalmologia
Oftalmol.	oftalmologia
Ophtal.	do inglês <i>Ophtalmology</i> ou <i>Ophtalmological</i> , oftalmológico(a)
Ophthalmol.	do inglês <i>Ophtalmology</i> , oftalmologia
Otol.	do inglês <i>Otology</i> , otologia
Otolaryngol.	do inglês <i>Otolaryngology</i>
Otorhinolaryngol.	do inglês <i>Otorhinolaryngology</i> , otorrinolaringologia
Otorrinolaringol.	otorrinolaringologia
p.	página(s)
Pediatr.	do inglês <i>Pediatry</i> ou <i>Pediatrics</i> , pediatria ou pediátrico(a)
p. ex.	por exemplo
Phoniatr.	do inglês <i>Phoniatica</i> , foniatria ou foniátrica
Physiol.	do inglês <i>Physiology</i> ou <i>Physiological</i> , fisiologia ou fisiológico(a)
Plast.	do inglês <i>Plastical</i> , plástica
PO	pós-operatório
Prof.	professor
Reconstr.	do inglês <i>Reconstrutive</i> , reparadora
Rel.	do inglês <i>Release</i> , liberação
Relat.	do inglês <i>Related</i> , relacionado(a)
Res.	do inglês <i>Research</i> , pesquisa
Rev.	revista
Rhinol.	do inglês <i>Rhinology</i> , rinologia

Soc.	do inglês <i>Society</i> , sociedade
Spec.	do inglês <i>Specialties</i> , especialidades
Suppl.	do inglês <i>Supplement</i> , suplemento
Surg.	do inglês <i>Surgery</i> ou <i>Surgical</i> , cirurgia ou cirúrgico(a)
Toxicol.	do inglês <i>Toxicology</i> ou <i>Toxicological</i> , toxicologia ou toxicológico
Treat.	do inglês <i>Treatment</i> , tratamento
v.	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau <i>Celsius</i> , unidade de medida de temperatura
(C)	fibras colágenas
cm	centímetro, equivalente a um centésimo do metro
CO₂	gás carbônico
dp	desvio-padrão
F	razão F – <i>Snedocor</i> , estatística
g	grama, equivalente a um centésimo do quilograma
G	enxerto de gordura
G1	grupo 1, sacrificado 7 dias após a enxertia de gordura
G2	grupo 2, sacrificado 14 dias após a enxertia de gordura
G3	grupo 3, sacrificado 30 dias após a enxertia de gordura
G4	grupo 4, sacrificado 90 dias após a enxertia de gordura
h	hora
KCl	cloreto de potássio
kg	quilograma, unidade de medida de massa
l	litro, unidade de medida de volume ou capacidade
LP	lâmina própria
m	metro, unidade de medida de comprimento padrão

M	músculo tireoaritenóideo
mg	miligrama, equivalente a um milésimo do quilograma
ml	mililitro, equivalente a um milésimo do litro
mm	milímetro, equivalente a um milésimo do metro
(n)	conjunto de números naturais representando uma amostragem
<i>p</i>	proporção, representação da significância estatística
pH	inverso do logaritmo da concentração de íons H ⁺
PP	coloração por método de picrossírius-polarização
PVD	prega vocal direita
PVE	prega vocal esquerda
®	marca registrada
S	fase ou período de síntese da divisão celular
SR	picrossírius-red sem polarização
UI	unidade internacional, medida padronizada
V	volt
W	watt
X	unidades de aumento microscópico
(x)	linhas, coordenadas
(y)	colunas, coordenadas
µm	micrômetro, equivalente a um milionésimo do metro
µm²	micrômetro quadrado, unidade de medida de área
%	porcentagem, por cento
Sx	somatória de todos os valores de uma seqüência

<	menor que, elemento representativo matemático
>	maior que, elemento representativo matemático
=	menor ou igual que, elemento representativo matemático
=	maior ou igual que, elemento representativo matemático
=	igual, elemento representativo matemático
Q1	primeiro quartil
Q2	segundo quartil
Q3	terceiro quartil

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	do inglês <i>Analysis of Variance</i> , teste de análise de variância
BPP	do inglês <i>bits-per-pixel</i> , bits-por-pixel
CAPPesq	Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxicilina-eosina, método de coloração
HC	Hospital de Clínicas
HSD	do inglês <i>Honestly Significant Difference</i> ou teste de Tukey
IPEM	Instituto de Pesos e Medidas
K-S	Kolmogorov-Smirnov, teste de normalidade
LIM	Laboratório de Investigação Médica
ORL	Otorrinolaringologia
PVP-I	polivinilpirrolidona-iodo
RGB	do inglês <i>Red-Green-Blue</i> , vermelho-verde-azul, modelo de cor
RNA	do inglês <i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico

SP Estado de São Paulo, Brasil

USP Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto de Gustav Neuber (1850-1932). Fonte: Sankt Elisabeth Krankenhaus Kiel, Alemanha 25
- Figura 2.** Esquema demonstrando estrutura molecular da mitomicina-C com seu anel deaziridina, o grupo quinona e o grupo octano 42
- Figura 3.** Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando calibração do programa de análise de imagens para campo de lâmina a ser analisado sob objetiva de 20X; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 55
- Figura 4.** Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando a mensuração espacial de um campo de lâmina a ser analisado a partir da criação de uma máscara de gradientes de cor azul pelo programa de análise de imagens; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 56

Figura 5. – Imagem que demonstra o ambiente e instalações de cuidados pós-operatórios sob a supervisão de zootecnistas e veterinários na granja RG em Suzano/SP..... 72

Figura 6. Imagem que demonstra o frasco de solução injetável de mitomicina-C (5mg) utilizada para aplicação tópica (0,4mg/ml) na prega vocal dos coelhos 74

Figura 7. Imagem que demonstra a incisão na pele e subcutâneo do coelho com identificação dos planos musculares 75

Figura 8. Imagem que demonstra o uso de microscópio para manipulação cirúrgica da laringe dos coelhos 77

Figura 9. Manipulação microscópica da laringe que permite acessar a prega vocal direita através do descolamento de bolsão com esculpador de Hollemback (seta) para permitir a aplicação de solução tópica de mitomicina-C e a introdução do enxerto de gordura 77

Figura 10. Demonstração do descolamento de bolsão com esculpador de Hollemback entre a lâmina própria (LP) e o músculo tireoaritenóideo (M) em desenho esquemático da prega vocal esquerda 78

Figura 11. Demonstração esquemática onde se observa o enxerto de gordura (G) introduzido entre a lâmina própria (LP) e o músculo tireoaritenóideo (M) na prega vocal direita (com mitomicina-C) e na prega vocal esquerda (sem mitomicina-C) 78

Figura 12. Imagem que demonstra os cassetes com as peças fixadas em formalina após a identificação dos coelhos e a origem anatômica da amostra (prega vocal direita ou esquerda) 80

Figura 13. Esquema demonstrando a confecção do bloco de parafina a partir do qual eram cortadas lâminas com espessura de 3µm e coradas com hematoxilina-eosina e *Sirius Red*; (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tireoartenóideo; (G) = enxerto de gordura; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 50X 81

Figura 14. Fotomicrografia demonstrando corte de prega vocal esquerda com enxerto de gordura visualizada sob luz polarizada onde as fibras colágenas adquirem coloração amarela, laranja e vermelha; (LP) = lâmina própria; (G) = enxerto de gordura; (M) = músculo tireoaritenóideo; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 50X; grupo G2 (sacrifício com 14 dias) 83

Figura 15. Imagem demonstrando microscópio acoplado a câmera digital e sistema de análise do Laboratório de Imagens e Morfometria (LIM-05) 84

Figura 16. Calibração do sistema digital de análise de imagens e do programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.1 85

Figura 17. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando campo de lâmina a ser analisado: (a) o campo da esquerda sob coloração HE; e (b) o campo da direita pelo método de *picrossirius-red* sem polarização com as fibras colágenas coradas em amarelo, laranja e vermelho; (G) = enxerto de gordura; (M) = músculo tireoaritenóideo; aumento de 200X 85

Figura 18. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando campo de lâmina a ser analisado utilizando máscara (cor azul) estabelecida para identificar as fibras colágenas e calcular área ocupada pelas mesmas (μm^2); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 86

Figura 19. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando utilização de máscara (cor azul) estabelecida para calcular a área total do campo analisado (μm^2); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 87

Figura 20. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando o cálculo da área fracional ou proporcional de fibras colágenas / campo analisado (%); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 87

Figura 21. Fotomicrografia sob método de coloração por picrossírius-polarização (aumento de 50X) demonstrando a análise dos campos (aumento de 200X) em torno do enxerto com a medida da área proporcional de fibras colágenas por campo (%), através do qual se obtém a média aritmética final da concentração proporcional de colágeno para o enxerto (%); onde: (LP) = lâmina própria; (G) = gordura e; (M) = músculo tireoaritenóideo 88

Figura 22. Fotomontagem de corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho do grupo G4 (sacrifício com 90 dias), corada com *picrossirius-red* sem polarização (SR) e com polarização (PP); onde (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tireoaritenóideo; (G) = gordura; aumento de 50X 95

Figura 23. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho (porção intermembranosa) submetida a enxerto de gordura (G); onde (M) = músculo tireoaritenóideo e (C) = fibras colágenas; coloração HE; aumento de 200X 96

Figura 24. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho (porção intermembranosa) submetida a enxerto de gordura (G) demonstrando a disposição das fibras colágenas (C) em rede (birrefringência amarela, laranja e vermelha) a partir do bloco gorduroso em direção ao músculo tireoaritenóideo (M); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 96

Figura 25. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita (porção intermembranosa) do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) submetida a enxerto de gordura (G) demonstrando a disposição das fibras colágenas (C) com birrefringência amarela, laranja e vermelha com desorganização da lâmina própria (LP); onde (M) = músculo tireoaritenóideo; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X 96

Figura 26. Fotomicrografia do corte histológico transversal de prega vocal de coelho demonstrando a evidente estruturação em camadas: epitélio (EP), lâmina própria (LP) e músculo (M); coloração HE; aumento de 50X. Fonte: Murta, 2005 105

Figura 27. Esquema demonstrando secção perpendicular (em vermelho) ao bordo livre das pregas vocais direita (mitomicina-C) e esquerda (controle), onde (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura 114

Figura 28. Fotomicrografia demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X; grupo G1 (sacrifício com 7 dias) 117

Figura 29. Fotomicrografia demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X; grupo G1 (sacrifício com 7 dias) 117

Figura 30. Fotomicrografia de prega vocal direita que recebeu aplicação tópica de mitomicina-C (grupo G2 sacrificado com 14 dias) demonstrando redução da concentração de fibras colágenas (tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho), onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X 118

Figura 31. Fotomicrografia de prega vocal esquerda que não recebeu aplicação de mitomicina-C (grupo G2 sacrificado com 14 dias) demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X 118

Figura 32. Fotomicrografia de prega vocal direita que recebeu aplicação tópica de mitomicina-C do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) demonstrando redução da concentração de fibras colágenas (tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho), onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X 119

Figura 33. Fotomicrografia de prega vocal esquerda que não recebeu aplicação de mitomicina-C do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X 119

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico esquemático demonstrando a distribuição dos 28 coelhos operados: 24 coelhos foram utilizados no presente estudo enquanto outros 4 coelhos tiveram que ser excluídos da análise 71

Gráfico 2. Comparação das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre os grupos G1, G2, G3 e G4 para as pregas vocais com e sem a aplicação de mitomicina-C prévia ao enxerto de gordura 101

Gráfico 3. Comparação das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre as pregas vocais direitas e esquerdas para cada grupo (G1, G2, G3 e G4) ...121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formação de grupos e sub-grupos de estudo 73

Tabela 2. Comparação entre as médias e medianas de área proporcional de colágeno (%) entre as pregas vocais direitas e esquerdas entre os diferentes grupos de coelhos estudados através do teste “t” de *Student*..... 98

RESUMO

Socher, J.A. Impacto da mitomicina-C tópica na deposição de colágeno em torno de enxertos de gordura na prega vocal de coelhos: estudo histológico e morfométrico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2009. 185p.

Desde o início de 1990, a enxertia de gordura na prega vocal é descrita como um método para reparar a insuficiência glótica. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da aplicação tópica de mitomicina-C no processo cicatricial de enxertos autólogos de gorduras inseridos em pregas vocais de coelhos através da medida da deposição de colágeno. Vinte e oito coelhos foram submetidos a enxertia de gordura em ambas pregas vocais. As pregas vocais direitas recebeu previamente a aplicação tópica de mitomicina-C (0,4mg/ml) durante cinco minutos enquanto que as pregas vocais esquerdas formavam o grupo controle (sem mitomicina-C). Quatro grupos com 6 coelhos cada foram sacrificados com 7, 14, 30 e 90 dias após a cirurgia de enxertia. As pregas vocais foram removidas para estudo histológico com a intenção de quantificar a deposição de colágeno através da coloração por Picrossírius Red sob microscopia polarizada. A deposição de colágeno foi menor em todos os grupos de pregas vocais que receberam aplicação tópica de mitomicina-C quando comparada com as pregas vocais do grupo controle. No presente estudo, a aplicação tópica de mitomicina-C antes da enxertia de gordura reduziu significativamente a deposição de colágeno ($p = 0,05$).

Palavras-chave: (1) CORDAS VOCAIS/anatomia&histologia; (2) COELHOS/cirurgia; (3) ENXERTO AUTÓLOGO/efeitos adversos; (4) COLÁGENO/ultraestrutura; (5) MITOMICINA-C/uso terapêutico; (6) GORDURA SUBCUTÂNEA/transplante.

SUMMARY

Socher, J.A. *Impact of topical mitomycin-C in the deposition of collagen around fat grafts in vocal folds of rabbits: histologic and morphometric study* [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2009. 185p.

Since the early 1990s, fat implantation in the vocal fold is described as a method of repairing glottal insufficiency. The aim of this study was to evaluate the effect of topical application of mitomycin in the healing process with collagen deposition measurement around of autologous fat implants inserted in rabbits vocal folds. Twenty-eight rabbits were submitted to a fat implant in the both vocal folds. The right vocal folds received previously topical application of mitomycin (0,4mg/ml) for five minutes and the left vocal folds were the control group (without mitomycin). Four groups of 6 rabbits each were sacrificed 7, 14, 30 and 90 days after the implantation. The samples of the vocal folds were collected for histological analysis with the purpose of quantifying the collagen deposition by Picrosirius Red stain under polarization microscopy. The collagen deposition was lower in all groups of vocal folds with topical application of mitomycin than in control groups. In the present study, the topical application of mitomycin before the fat grafts reduced significantly the collagen deposition ($p = 0,05$).

Keywords: (1) VOCAL CORDS/anatomy & histology; (2) RABBITS/surgery; (3) TRANSPLANTATION, AUTOLOGOUS/adverse effects; (4) COLLAGEN FIBERS/ultrastructure; (5) MITOMYCIN/therapeutic use; (6) SUBCUTANEOUS FAT/transplantation.

REVISTA *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* -

INSTRUÇÕES PARA AUTORES

ANNALS OTOLOGY, RHINOLOGY & LARYNGOLOGY

Friday, June 13th, 2008

ABOUT US INSIDE ANNALS RESOURCES SUBSCRIBERS SEARCH

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SUBMISSION

Send manuscripts to Richard J. H. Smith, MD, Editor, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, The University of Iowa Hospitals and Clinics, 200 Hawkins Dr, Iowa City, IA 52242.

Original manuscripts dealing with clinical or scientific aspects of otolaryngology, bronchoesophagology, head and neck medicine and surgery, maxillofacial and plastic surgery, audiology, speech pathology, or related specialties are considered for publication. All materials submitted for publication undergo peer review. Submit 3 complete copies (including figures) and an electronic version with a signed copyright transfer statement (see “Copyright,” below). Include an e-mail address for notification of receipt of manuscript.

All submitted manuscripts *must* be accompanied by a cover letter. This letter should disclose any financial interests the authors have in relation to the

Tables should be on separate sheets, numbered consecutively and headed by a concise title. Put explanatory matter in footnotes. Tables are adjuncts to the text and should not repeat material presented therein. *The cost of preparing tables is billed to the author.*

Illustrations must be submitted in three complete sets, unmounted. Only professional-quality glossy photographs and black-and-white line drawings are acceptable. Multi-part illustrations should be labeled (A, B, etc) on the reverse side, not on the illustration itself. Put legends (detailed explanations) to the photographs on a separate page in the manuscript. Affix a label to the reverse side of each illustration, indicating figure number, first author’s name, and top of the figure. Cite each figure in the text in consecutive order. Written

work, or any financial support provided by companies toward the completion of the work. The letter should also indicate whether the manuscript has been presented before any professional otolaryngological association and the place and year of presentation. *Manuscripts submitted without this letter will not be reviewed and will be returned to the author.*

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

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

permission from identifiable subjects is required. *The cost of preparing illustrations for publication (scanning if necessary, sizing, lettering, etc) is charged to the author without exception.* Color illustrations are accepted; cost estimates for color separations and printing are provided on an individual basis. Illustrations should enhance, not repeat, material presented in the manuscript and should be kept to a minimum.

ELECTRONIC SUBMISSION

Software and format must be Microsoft Word. Do not use complex formatting or desktop publishing software. Do not deliver files that contain hidden text. For example, do not use your word processor's automated features to create footnotes and reference lists. Submit text, tables, and figure legends as a single file. Do not include illustrations in this file.

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

Send files to: annals-ori@uiowa.edu.

REPRINTS

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

COPYRIGHT

The following statements *must* accompany the manuscript, signed by all authors (only *original* signatures are acceptable: 1) "I warrant that my contribution to the work is original and that I have full power to enter into this agreement. The content of this paper, all or in part, has not been published, has not been submitted for publication elsewhere, and is not in press elsewhere." 2) "I verify that I have met all of the following criteria for authorship and am qualified to be listed as an author of this work by my substantive contribution to the conception and design of the project *or* analysis of the data, my drafting *or* critical revision of the content of this manuscript, and my approval of the final version to be

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

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

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

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

published." 3) "In consideration of the *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* taking action in reviewing and editing my (our) submission, I hereby transfer, assign, or otherwise convey all copyright ownership to Annals Publishing Company in the event such work is published in the *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*." After acceptance, no author may be added to or removed from a paper.

SUPPLEMENTS

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

REVIEWS OF SOFTWARE AND COMPUTER APPLICATIONS

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

February 2008

REVISTA *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* -

SUBMISSÃO DO ARTIGO

MS# 08-4152; APPLICATION OF TOPICAL SOLUTION OF MITOMYCIN REDUCES THE CONCENTRATION OF COLLAGEN AROUND FAT GRAFT IN VOCAL FOLD OF RABBITS: HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRIC STUDY

Quarta -feira, 7 de Janeiro de 2009 18:59

De: "Annals of Otolaryngology" annals-otl@uiowa.edu

Adicionar remetente à lista de

contatos Para: jan_socher@yahoo.com.br

Cc: "Smith, Richard J (Oto)" <richard-smith@uiowa.edu>

A mensagem contém anexos

[copyrighttransfer.doc \(29 KB\)](#)

<<copyrighttransfer.doc>>

MS# 08-4152; APPLICATION OF TOPICAL SOLUTION OF MITOMYCIN REDUCES THE CONCENTRATION OF COLLAGEN AROUND FAT GRAFT IN VOCAL FOLD OF RABBITS: HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRIC STUDY

Dear Dr. Socher:

I write to acknowledge that the ANNALS has received the above-referenced manuscript, structured abstract and figures. We still need the original signed copyright form. I am attaching a blank form to this email. Please sign and return via post. In the meantime, your manuscript will be under review.

Also, could you please provide the names and email addresses of two reviewers whom you believe would be suitable for your manuscript? We are expanding our database of suitable reviewers.

Thank you for submitting your materials to the ANNALS.

Sincerely,

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

Notice: This UI Health Care e-mail (including attachments) is covered by the Electronic Communications Privacy Act, 18 U.S.C. 2510-2521, is confidential and may be legally privileged. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any retention, dissemination, distribution, or copying of this communication is strictly prohibited. Please reply to the sender that you have received the message in error, then delete it. Thank you.

**“APPLICATION OF TOPICAL SOLUTION OF MITOMYCIN REDUCES THE
CONCENTRATION OF COLLAGEN AROUND FAT GRAFTS IN VOCAL FOLDS OF
RABBITS: HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRIC STUDY”**

“MITOMYCIN REDUCES THE CONCENTRATION OF COLLAGEN AROUND FAT GRAFTS”

Jan Alessandro Socher¹

Luiz Ubirajara Sennes¹

Rui Imamura¹

Domingos H. Tsuji¹

Luiz Fernando Ferraz da Silva²

From the Department of Otorhinolaryngology¹ and Department of Pathology², University of São Paulo School of Medicine, São Paulo – Brazil.

This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Agency), CNPQ (Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development) and Central Hospital – University of São Paulo School of Medicine.

Send correspondence to Jan Alessandro Socher - Rua Lauro Mueller, 319 - CEP 89010-380 – Blumenau/SC, Brasil. Telephone: +55(47) 3035-4640. Fax number: +55(47) 3326-5129. E-mail: jan_socher@yahoo.com.br

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

ABSTRACT

Introduction: *Since the early 1990s, fat implantation in the vocal fold is described as a method of repairing glottal insufficiency.*

Objective: *The aim of this study was to evaluate the effect of topical application of mitomycin in the healing process with collagen deposition measurement around of autologous fat implants inserted in rabbits vocal folds.*

Methods: *Twenty-eight rabbits were submitted to a fat implant in both vocal folds. The right vocal folds received previously topical application of mitomycin (0,4mg/ml) for five minutes and the left vocal folds were the control group (without mitomycin). Four groups of 6 rabbits each were sacrificed 7 days, 14 days, 30 days and 90 days after the implantation. The vocal folds were processed for histological analysis with the purpose of quantifying the collagen deposition by Picrosirius Red stain under polarization microscopy.*

Results: *The collagen deposition was lower in all groups of experimental vocal folds with topical application of mitomycin than in control groups.*

Conclusion: *In the present study, the topical application of mitomycin before the fat grafts reduced significantly the collagen deposition ($p \leq 0,05$).*

Key Words: autologous transplantation, collagen fibers, picrosirius red, fat implant.

INTRODUCTION

The glottal insufficiency is a failure of adequate glottal closure resulting from vocal fold paralysis, unilateral or bilateral vocal fold paresis, scarring with loss of the normal vocal fold mucosa vibration, atrophy of the lamina propria or thyroarytenoid muscle from aging^(1, 2). These changes can lead to aspiration, cough, hoarseness, loss of vocal control and fatigue⁽³⁾. A number of procedures have been suggested to improve glottal closure in these cases. Although effective, these approaches have limitations and complications. Over the decades, several authors reported the augmentation of a variety of substances for the management of glottic insufficiency: paraffin, teflon (polytetrafluoroethylene), cartilage, bone paste, gelatin (gelfoam), silicone, calcium hydroxylapatite, collagen, fat, fascia and hyaluronic acid^(4, 5, 6, 7). The augmentation of the vocal fold with autologous fat graft has proven to be a safe and effective technique for correcting glottic insufficiency^(8, 9). Efforts to preserve the cellular and amorphous components of the vocal fold lamina propria have influenced phonosurgical refinements⁽¹⁰⁾. However, the wound healing on vocal fold remains a challenge. In general, a scar is regarded as fibrous tissue. It has been believed that an increase of collagen fibers produced by fibroblasts is the basis of fibrosis and that the strength of scar tissue depends on its collagen content⁽¹¹⁾. The reduction of fibroblasts by mitomycin may cause a decrease in the synthesis of various extracellular matrix components that are essential for wound healing and for maintaining the vibratory properties of the vocal folds⁽¹²⁾. Mitomycin is an antibiotic that acts as an antimetabolite, and its preventive effect on scarring has been confirmed, especially in the field of Ophthalmology^(13, 14). The aim of this study was to evaluate the effect of topical mitomycin in the healing process around of autologous fat implants of rabbits vocal folds quantifying the collagen deposition by Picrosirius Red stain under polarization microscopy.

MATERIAL AND METHODS

Animal surgery. Twenty-eight adult male New Zealand rabbits were operated: twenty-four rabbits were used in this study. Two further animals were used in the pilot study, one rabbit died due to cervical abscess on day 7 and one rabbit died because of acute respiratory failure on day 1. The body

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

weights of rabbits ranged from 2,5 to 3,5kg. All animal's surgeries and care procedures were carried out in accordance with institutional policies on care of animals and were approved by the Ethics Committee for the Analysis of Research Projects of the University of São Paulo School of Medicine. In each surgery, the right vocal fold was the experimental side and the left was the control. The rabbits were sedated with Xylazine (5mg/kg) and Ketamine (50mg/kg) IM injections leading in spontaneous ventilation. Under aseptic technique, the vocal folds were accessed by anterior laryngeal fissure. In each rabbit, both vocal folds underwent a 1,0-mm-long incision in the superior border that allowed the dissection of a pocket between the thyroarytenoid muscle and the mucosa under visualization with an operating microscope. All the right vocal folds (experimental) received topical application of mitomycin (0,4mg/ml) with 3,0mmX1,0mm-long sterilized surgical patties (Codman 80-1408, Johnson & Johnson[®] Professional, USA) for five minutes while the left vocal fold was protected with sterilized surgical patties to avoid contamination with mitomycin. The 3,0-mm-long block of fat graft was removed from the adipose tissue of the anterior cervical region and implanted in the pocket of both vocal folds. The fat graft was kept in place solely by the difference in size between the small incision and the pocket to fat block⁽¹⁵⁾. Post-operatively, rabbits received Benzylpenicillin procain 300.000UI and Benzylpenicillin potassium 100.000UI, diluted in 3.0 ml of distilled water and IM injected 0.4ml per dose during 5 days. The rabbits were randomized into four groups of 6 each and were painlessly sacrificed 7 days (group 1 – G1), 14 days (group 2 – G2), 30 days (group 3 – G3) and 90 days (group 4 – G4) after the surgery.

Histology and Morfometry. The larynx was collected and fixed in 10% formalin, dehydrated and processed for histology. The experimental folds and the control folds were sectioned in the coronal plane. After fixation, thick transverse histologic sections were cut at the same level for both vocal folds in 3µm thick sections in the coronal plane. The sections were stained by hematoxylin-eosin and Pricosirius Red methods⁽¹⁶⁾. The histological vocal folds sections (experimental and control) received a codification and were blindly examined by the researcher under a standard and polarization microscopy (model Leica DMR by Leica M-System, Wetzlar, Hessen, Germany). The collagen was stained in shades of yellow, orange and red, while all other substances acquire an approximate color of black. Comparison was made between the experimental side and the control side for (1) relationship of the graft with the adjacents structures; (2)

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

comparison of the concentration of collagen fibers between experimental and control vocal folds groups, and; (3) relationship between the scar and the different groups (G1, G2, G3 and G4) in each experimental and control vocal folds. The morphometric study with the quantification of collagen was done with the aid of image digital analysis system and software Image Pro Plus[®] - version 4.1 (Media Cybernetics S/N 41N41000-26671, USA) for Microsoft Windows[®]. From the establishment of a pattern of collagen colors by the software, set up a gradient allowing the recognition of collagen and thus provide the area (μm^2) occupied by it. With the software the total area (μm^2) of each field was calculated and from these values get the proportional area of collagen (%) for each field analysis. All fields (Picrosirius Red stain under polarization microscopy with magnification X200) that were seen surrounding the fat graft were analyzed both adjacent to muscle and the lamina propria (figure 1). The researcher analyzed one slide for each vocal fold and at least five fields per slide. Data obtained from each vocal fold were tabulated in the software Microsoft Excel[®] separating the four groups of study (G1, G2, G3 and G4) and the origin of each vocal fold (right and left).

Statistical analysis. The statistical analysis was carried out from the arithmetic mean of the values of proportional area of collagen obtained in the fields of each slide. There was normal distribution in all the variables studied in Kolmogorov-Smirnov test. The arithmetic mean and standard deviation were used as measures of central tendency and dispersion, and Student's t-test of the statistical analysis to compare the results between the experimental and control vocal folds in all groups (G1, G2, G3 and G4). The one-way repeated measures Analysis of Variance test (ANOVA) and Tukey test were used to compare the results between the groups G1, G2, G3 and G4 (7, 14, 30 and 90 days, respectively) in each experimental and control vocal folds groups (Software SPSS version 15.0 by Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA). In all tests was considered a statistically relevant difference a significance level of 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTS

Relationship of the graft with the adjacent structures. The fat grafts were identified in all groups up to 90 days post-operatively in both vocal folds. The collagen provides a reticular distribution extending toward the muscle, forming a sort of intertwined network, leaving the fat graft completely surrounded by thick and strongly birefringent collagen fibers (yellow, orange and red colors). The collagen fibers showed similar behavior in the lamina propria with unorganized distribution. This pattern was observed in all groups of study in both vocal folds (figure 2).

Comparison of the concentration of collagen fibers between the different vocal folds. The Student's t test statistical analysis of the proportional area of collagen (%) showed a significant lower concentration ($p \leq 0.05$) of collagen fibers in the experimental vocal folds submitted to the topical application of mitomycin in all groups (G1, G2, G3 and G4) – (table 1) – (figure 3).

Relationship between the scar and the different groups. In the control vocal folds the difference of proportional area of collagen (%) was significant ($p \leq 0.05$) between the group G1 (7days) and the groups G2 (14 days), G3 (30 days) and G4 (90days) – (one-way repeated measures ANOVA and Tukey test). The difference of proportional area of collagen (%) was not significant ($p > 0.05$) between the groups G3 (30 days) and G4 (90 days) in the control vocal folds. In the experimental vocal folds (mitomycin) the difference of proportional area of collagen (%) was not significant ($p > 0.05$) between the group G1 and the groups G2 and G4 (one-way repeated measures ANOVA and Tukey test) - (graphic 1). The difference of proportional area of collagen fibers (%) was not significant ($p > 0.05$) between the groups G3 and G4 in the experimental vocal folds.

DISCUSSION

A wide variety of synthetic implantable materials have been used historically in vocal fold augmentation surgery. Today, the biologic materials are being used in a more popular way, primarily because of the promising results, but also because of persisting problems associated with synthetic materials⁽¹⁷⁾. Autologous fat, in particular, is an easily obtainable material for vocal fold augmentation

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

with the following advantages: (1) less invasive surgery compared to thyroplasty with or without arytenoid adduction; (2) limited inflammatory reaction; (3) less development of granulation tissue and; (4) the favourable viscoelastic properties of fat are close to those of the superficial layer of the lamina propria^(18, 19, 20, 21). In the present study, all the surgeries were performed with the help of a surgical microscope and microsurgical instruments that facilitated the dissection of the pocket between the vocal mucosa and thyroarytenoid muscle, the application of mitomycin and the introduction of fat graft into the pocket in the vocal fold.

We used morphometric methods with the use of specific software to create a gradient of colors with which the computer can recognize the collagen fibers and thus quantify the density of collagen without interference on a count by the researcher. The cuts were made in the vocal folds obeying always the same methodology. Always has been examined one section for each vocal fold and at least 5 fields per slide or until exhausted the fields identified around the graft. All fields followed a series of standard sets and were randomly selected, with all the tissue surrounding the fat graft has been examined (lamina propria and thyroarytenoid muscle). To prevent the identification of fields with application of mitomycin, the sections were blindly analyzed by the researcher. The morphometric quantification with computed analysis through the area stained by "Sirius Red" under polarized light is an established method for literature for assessing the amount of collagen deposition in studies concerning the healing process^(16, 22). The specificity of the picosirius-polarization method is based on the fact that collagen molecules are rich in basic amino acids that strongly react with Sirius Red (an acid dye). This reaction enhances the normal birefringence that is specific for collagen fibers (yellow, green, orange and red colors), which are composed of oriented molecule aggregates. The Picosirius-polarization is a method very specific and sensitive, simple, cheap, and easy to reproduce^(16, 22).

The wound healing is a complex multistep process involving many growth factors. When tissue is injured, one of the most important responses to the injury is the release of cytokines locally. Cytokines, commonly referred to as growth factors, are polypeptides that act locally at the tissue site to regulate tissue remodeling and wound healing. These growth factors are secreted by macrophages, platelets, fibroblasts, and other cellular elements present at the wound site. These factors promote cell migration, angiogenesis, formation of extracellular matrix proteins, and proliferation of epithelial cells and fibroblasts⁽²³⁾. Collagen

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

produced by fibroblasts has been regarded as a major constituent in scar tissue⁽²⁴⁾. When a fat graft is introduced in a healing wound, the inflammatory and proliferative stages are significantly prolonged by the additional cellular “stimulus”. Neutrophils gather around the graft, resulting in some fat graft degeneration. This resulting cell degeneration is believed to release additional chemotactic factors that activate consequently the complement and immune systems⁽²³⁾. Next, macrophages arrive at the fat graft periphery site and release chemotactic mediators, causing fibroblast proliferation, collagen fibers synthesis, and the liberation of collagenases (lytic enzymes). Thus, these collagenases degrade the collagen fibers at the surrounding fat graft site, releasing more collagen fragments and this way it are thought to induce further macrophages and fibroblasts migration to the peripheral fat graft site. This sustained stimulation can lead to fibrosis and a network of connective tissue around the graft. Another chronic response caused by the fat graft may be a foreign body reaction^(23, 24). Our study found that the collagen around the fat grafts have a reticular distribution forming a network intertwined of collagen fibers. It showed similar behavior in the lamina propria with unorganized distribution. To Thibeault et al., the stiffness increase of the vocal folds after an injury is due to a change in the architecture of the collagen scarring, acquiring an abnormal distribution and unorganized⁽³⁾. Normal wound healing is an essential and protective biologic process, however, an excessive response can lead to hypertrophic scar formation⁽¹³⁾. In the case of vocal fold scarring, dense collagen deposits have also been found in the injured lamina propria of the vocal fold animals⁽¹⁷⁾. The scarred arrangement may alter molecular interactions, resulting in increased viscosity and decreased compliance which may correspond to the clinical findings of stiffness and loss of normal mucosal wave. Control of fibroblast behavior instead of reducing these cells may be important for preventing or treating vocal fold scarring. The importance of intervention during the early stages of wound healing to avoid scarring was also noted. The exam of histologic changes during the acute phase of healing of the rabbit vocal fold found massive cellular infiltration as well as increased deposition of collagen fibers⁽²⁴⁾. Fibroblasts seem to become the key cells during the proliferative stage for directing connective tissue formation and wound tensile strength^(23, 24).

Representing the proliferative phase, at the present study, the concentration of collagen fibers increases progressively between the groups sacrificed with 7, 14 and 30 days post-operatively in both vocal folds but it was smaller in experimental vocal folds that received application of mitomycin.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

However, this behavior is not seen in the groups sacrificed with 90 days. Apparently there is a stabilization of the deposit of collagen fibers between the groups G3 (30 days) and G4 (90 days). In both vocal folds of the group G4 until there was a decrease in the proportional area (%) of collagen fibers, more evident in the experimental group G4 with application of mitomycin.

In the control vocal folds the deposition of collagen increases significantly ($p \leq 0.05$) between the group G1 (7 days) and the groups G2 (14 days) and G3 (30 days), representing the proliferative stage. The deposition of collagen fibers between the groups G2 and G3 was not significant ($p > 0.05$). The distribution of collagen was not significant ($p > 0.05$) between the groups G3 (30 days) and G4 (90 days), representing the remodeling phase. The deposition of collagen in the control vocal folds was significant ($p \leq 0.05$) between the groups G1 (7 days) and G4 (90 days), representing the increase of collagen around the fat graft until the day 90 (graphic 1).

In the experimental vocal folds (mitomycin) the deposition of collagen increases not significantly ($p > 0.05$) in the proliferative stage between the groups G1 (7days) and G2 (14 days). The deposition of collagen fibers was significant ($p \leq 0.05$) between the groups G2 and G3 (30 days) and between the groups G1 and G3, representing the proliferative stage. The distribution of collagen was not significant ($p > 0.05$) between the groups G3 (30 days) and G4 (90 days), representing the remodeling phase. The deposition of collagen in the experimental vocal folds increases not significantly also between the groups G1 (7 days) and G4 (90 days), representing the increase of collagen fibers until the day 90 (graphic 1).

All these findings suggested the proliferative stage that starts approximately 3 days after injury is a critical period for wound repair⁽²⁴⁾. In this way, the application of mitomycin in the operative injury was very important to reduce significantly the concentration of collagen fibers and the scarring development around the fat grafts.

At this point, an optimum strategy has not been developed for the prevention of vocal fold scarring. New approaches need to be considered to restore the properties of the scarred vocal fold^(3, 10, 11). Mitomycin is an antibiotic commonly used such as chemotherapy in intravenous or topical applications, which is activated intracellularly and in this way inhibits cell division, protein synthesis and proliferation of fibroblasts, acting on the healing process, making it less intense. All these properties attracted the interest of researchers for the use of mitomycin in surgical procedures in which the intense healing process

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

could interfere in the final result⁽¹²⁻¹⁴⁾. According Tsai et al., the topical application of mitomycin must be through cotton soaked with the solution in concentration which can vary between 0,4mg/ml to 2,0mg/ml for a period of 3 to 10 minutes⁽¹³⁾. In the years that followed, several other studies confirmed the efficiency of mitomycin in the prevention of laryngeal stenosis through its ability to interfere on the healing process^(12, 25). In this study was used the topical application of mitomycin in right vocal folds (experimental) of rabbits before the grafting of fat in order to achieve this inhibitory effect on the healing process around the graft, reducing the proliferation of fibroblasts and thereby decreasing the production of collagen fibers, when compared with the left vocal folds (control). The findings of our study showed a significant reduction of the proportional area of collagen fibers (%) in all experimental groups (mitomycin) when compared with the control vocal folds. The deposition of collagen in the experimental vocal folds was reduced mainly between the group G1 (7 days) and the groups sacrificed 14 days (proliferative stage) and until 90 days (remodeling stage) after the procedure (graphic 1). Avoid contamination of the control vocal folds with mitomycin has been a constant concern during all surgeries because this possibility would invalidate the results of the study.

CONCLUSION

Representing the proliferative phase, the deposition of collagen fiber gradually increases until the day 30 postoperatively. From the day 90 postoperatively apparently the deposition of collagen fibers stabilize representing the remodeling phase in both vocal folds. The topical application of mitomycin (0,4mg/ml) for five minutes reduced the proportional area (%) of collagen fibers around the fat grafts in all the experimental vocal folds (7, 14, 30 and 90 days) when compared with the control vocal folds ($p \leq 0,05$). In this study, the deposition of collagen in the experimental vocal folds (mitomycin) was not significant mainly between the day 7 to the day 14 in the proliferative stage and between the day 7 to the day 90 in the remodeling stage, representing the increase of collagen fibers around the fat grafts.

REFERENCES

1. Courey MS. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope*. 2001; 111: 747-758.
2. Hsiung MW, Woo P, Minasian AMS, Schaefer Mojica, JMS. Fat augmentation for glottic insufficiency. *Laryngoscope*. 2000; 110: 1026-1033.
3. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal folds scarring. *J Voice*. 2002; 16(1): 96-104.
4. Remacle M, Lawson G. Injectable substances for vocal fold augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 9: 393-397.
5. Courey MS. Injection Laryngoplasty. *Otolaryngol Clin North Am*. 2004; 37: 121-138.
6. McCulloch TM, Andrews BT, Hoffman HT, Graham SM, Karnell MP, Courey M. Long-term follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*. 2002; 112: 1235-1238.
7. Sasai H, Watanabe Y, Muta H, Yoshida J, Hayashi I, Ogawa M, Kubo T. Long-term histological outcomes of injected autologous fat into human vocal folds after secondary laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 132: 685-688.
8. Wexler DB, Gray S, Jiang J, Titze I. Phonosurgical studies: fat-graft reconstruction of injured canine vocal cords. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1989; 98: 668-73.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

9. Mikaelian DO; Lowri LD; Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*. 1991; 101: 465-68.
10. Ford CN. Advances and refinements in phonosurgery. *Laryngoscope*. 1999; 109: 1891-1900.
11. Hirano, S. Current treatment of vocal fold scarring. *Current Op Otol Head Neck Surg*. 2005; 13: 143-147.
12. Garret CG, Soto J, Billante CR, Riddick J, Reinish L. Effects of mitomycin-C on vocal folds healing in canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110: 25-30.
13. Tsai CC, Kau HC, Kau SC, Hsu WM, Liu JH. Efficacy of probing the nasolacrimal duct with adjuvant mitomycin-C for epiphora in adults. *Ophthalmology*. 2002; 109: 172-174.
14. Kao CSC, Liao CL, Tse NGJHS, Chen MS, Hou PK. Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin-C. *Ophthalmology*. 1997; 104: 86-91.
15. Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Rosen DC, Heuer RJ. Autologous fat implantation for vocal fold scar: a preliminary report. *J Voice*. 1997; 11: 238-246.
16. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979; 11: 447.
17. Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope*. 1998; 108: 725-731.
18. Woo P; Rahbar R; Wang Z. Fat implantation into Reinke space: A histological and stroboscopic study in the canine. *Ann. Otol. Laryngol*. 1999; 108: 738-744.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

19. Umeno H, Shirozu H, Chitose, SI, Nakashima T. Analysis of voice function following autologous fat injection for vocal fold paralysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132: 103-107.
20. Duprat AC, Costa HO, Lancelotti C, Almeida RR, Caron R. Histologic behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004; 113: 636-640.
21. Kruschewski LS, Mello-Filho FV, Santos AC, Rosen CA. Autologous fat graft absorption in unilateral paralyzed canine vocal folds. *Laryngoscope.* 2007; 117: 96-100.
22. Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina própria of the human vocal fold. *Laryngoscope.* 2003; 113: 2187-2191.
23. Hom, DB. The wound healing response to grafted tissues. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994; 27: 13-24.
24. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, et al. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114: 19-24.
25. Rahbar R, Stanley SM, Healy GB. Mitomycin-C: effects on laryngeal and tracheal stenosis benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110: 1-6.
26. Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shasphay SM. Sinus surgery: does mitomycin-C reduce stenosis? *Laryngoscope.* 1998; 108: 883-886.
27. Ward RF, April MM. Mitomycin-C in the treatment of tracheal cicatrix after tracheal reconstruction. *International Journal of Pediatrics Otorhinolaryngology.* 1998; 44: 275-279.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

28. Yazawa Y, Suzuki M, Kitano H, Kitajima K. Intraoperative mitomycin-C in endolymphatic sac surgery for Ménière's disease: a pilot study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1999; 61: 188-194.

29. Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin-C in miringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 124: 368-373.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

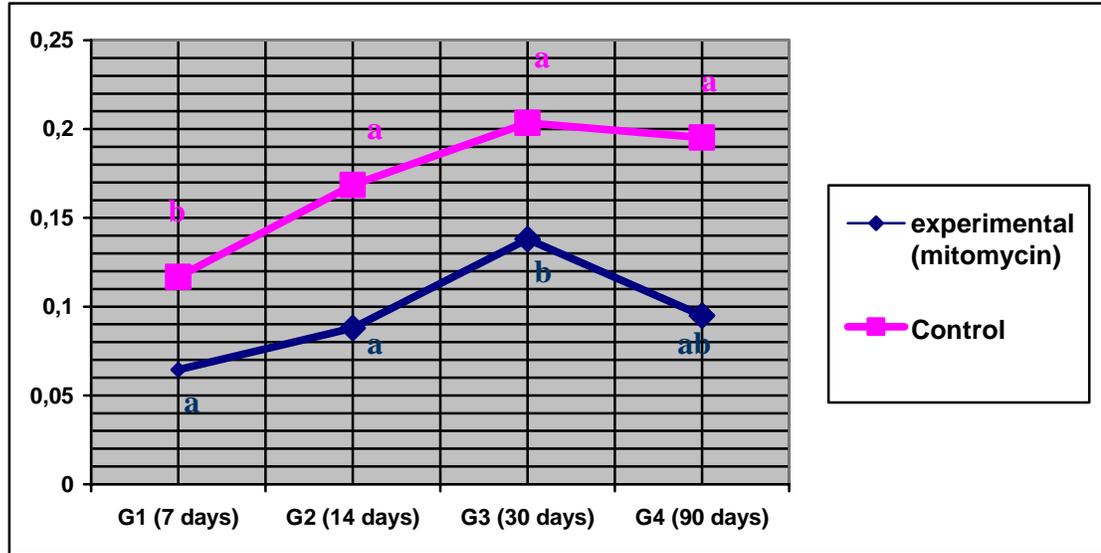
Table 1. Comparison of the proportional area of collagen (%) between the experimental and control vocal folds into the groups (7, 14, 30 and 90 days).

GROUPS		PO			
		7 days (G1)	14 days (G2)	30 days (G3)	90 days (G4)
RVF (experimental)	Mean±sd	0,0645 ± 0,0257	0,0880 ± 0,0360	0,1380 ± 0,0330	0,0949 ± 0,0159
	Median	0,0697	0,0891	0,1410	0,0914
	(n)	6	6	6	6
LVF (control)	Mean±sd	0,1167 ± 0,0170	0,1685 ± 0,0313	0,2034±0,0248	0,1952 ± 0,0349
	Median	0,1196	0,1654	0,2040	0,1831
	(n)	6	6	6	6
Student's	t-test	p = 0,006	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

(PO) = postoperatively; (sd) = standard deviation; (RVF) = right vocal fold (mitomycin) ; (LVF) = left vocal fold (control)

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

Graphic 1. Evaluation of the proportional area of collagen (%) between the groups G1 (7days), G2 (14 days), G3 (30 days) and G4 (90 days) in each experimental and control vocal folds



One-way repeated measures ANOVA:

Experimental vocal folds (mitomycin): $F = 6,82791 / df^* = 23 / p = 0,0024$

Control vocal folds: $F = 11,83562 / df^* = 23 / p = 0,0001$

(*) df = degrees of freedom.

Where: different characters represent significant statistical difference ($p \leq 0,05$) and similar characters represent no significant statistical difference ($p > 0,05$) with the correspondent character.

Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

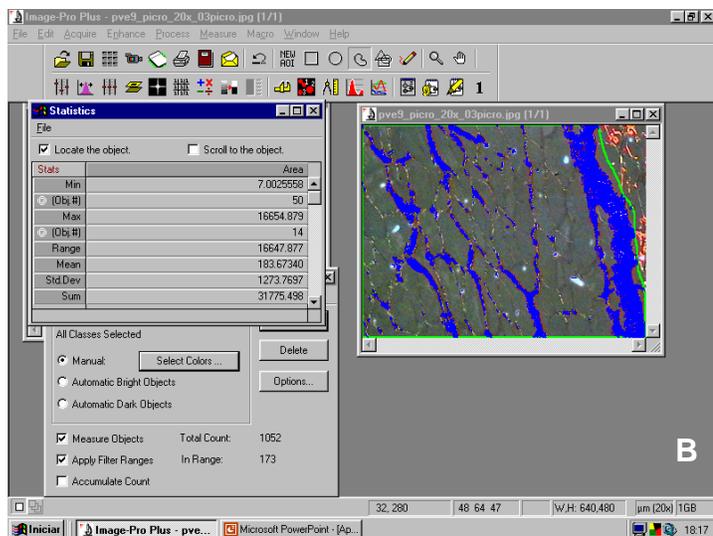
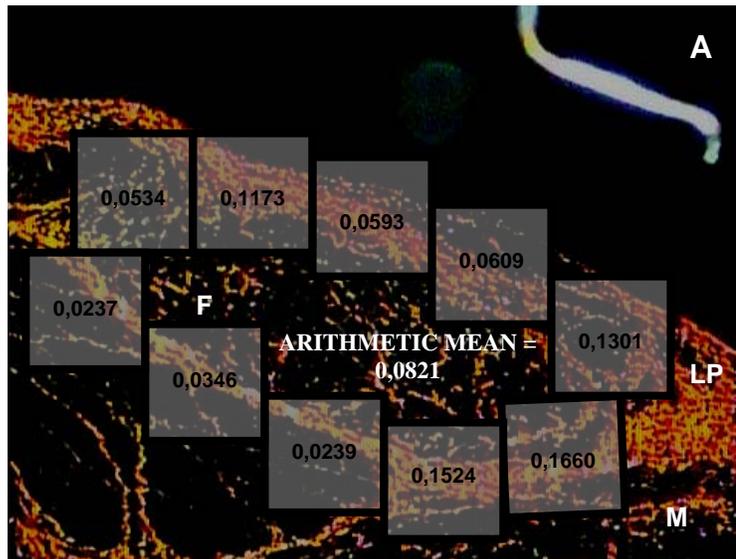
Figure 1. Histological and morphometric study of vocal fold of rabbits: (A) Histological section demonstrating the analysis around the fat graft with the measurement of the proportional area of collagen fibers (%) in each field (magnification X200) and thereby sum it get the arithmetic mean of the proportional area of collagen (%) in the analyzed section. The collagens fibers are stained in yellow, orange or red colors by picrosirius-polarization method. F = fat graft; LP = lamina propria; M = thyroarytenoid muscle (magnification X50) and; (B) The digital analysis system and software set up a gradient of color (blue) allowing the recognition of collagen and thus calculate the concentration area (μm^2) in each field (magnification X200).

Figure 2. Histological section stained by Picrosirius Red method demonstrating a reticular distribution of the collagen extending toward the muscle, forming a sort of intertwined network: (A) Without use of polarization and; (B) Under polarization with strongly birefringent collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle; C = collagen fibers (magnification X200).

Figure 3. Histological section stained by picrosirius-polarization method: (A) Right vocal fold that received topical application of mitomycin (group G2 sacrificed on day 14) demonstrating the reduction of collagen concentration (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200). (B) Left vocal fold without topical application of mitomycin (group G2 sacrificed on day 14) demonstrating the greater concentration of collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200). (C) Right vocal fold that received topical application of mitomycin (group G3 sacrificed on day 30) demonstrating the reduction of collagen concentration (yellow, orange and red colors). F = fat graft; LP = lamina propria (magnification X200). (D) Left vocal fold without topical application of mitomycin (group G3 sacrificed on day 30) demonstrating the greater concentration of collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200).

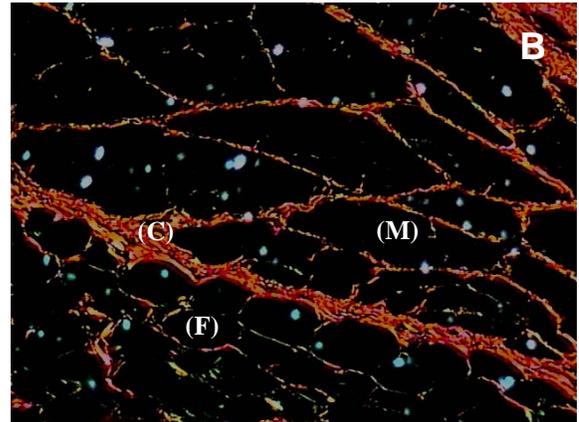
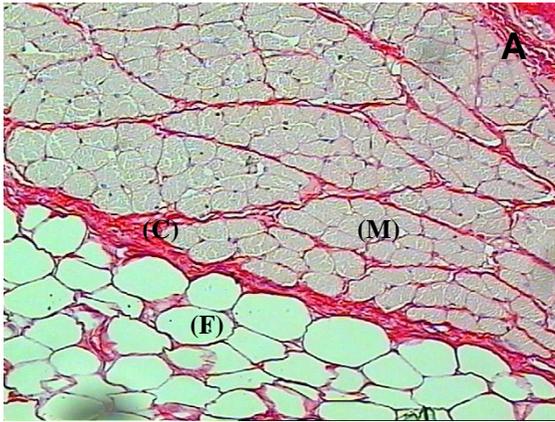
Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

Figure 1. Histological and morphometric study of vocal fold of rabbits: (A) Histological section demonstrating the analysis around the fat graft with the measurement of the proportional area of collagen fibers (%) in each field (magnification X200) and thereby sum it get the arithmetic mean of the proportional area of collagen (%) in the analyzed section. The collagens fibers are stained in yellow, orange or red colors by picrosirius-polarization method. F = fat graft; LP = lamina propria; M = thyroarytenoid muscle (magnification X50) and; (B) The digital analysis system and software set up a gradient of color (blue) allowing the recognition of collagen and thus calculate the concentration area (μm^2) in each field (magnification X200).



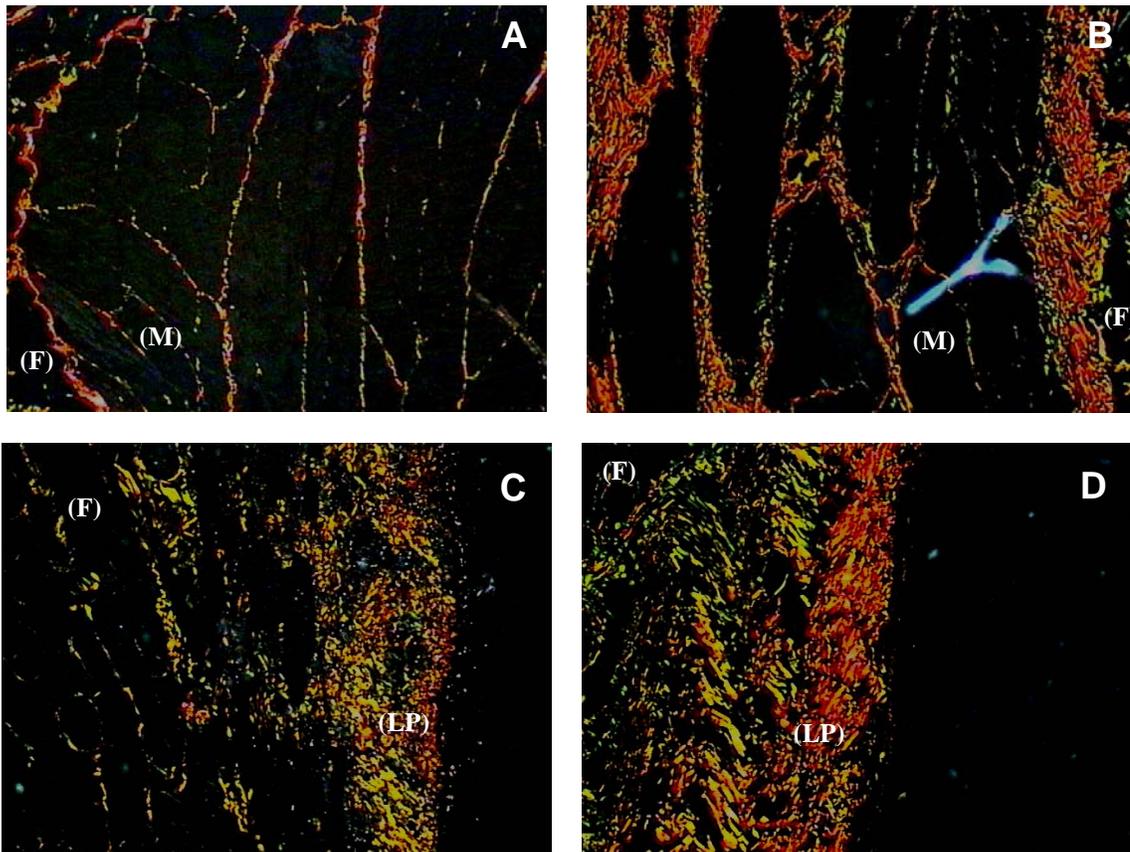
Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

Figure 2. Histological section stained by Picrosirius Red method demonstrating a reticular distribution of the collagen extending toward the muscle, forming a sort of intertwined network: (A) Without use of polarization and; (B) Under polarization with strongly birefringent collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle; C = collagen fibers (magnification X200).



Mitomycin reduces the concentration of collagen around fat grafts

Figure 3. Histological section stained by picosirius-polarization method: (A) Right vocal fold that received topical application of mitomycin (group G2 sacrificed on day 14) demonstrating the reduction of collagen concentration (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200). (B) Left vocal fold without topical application of mitomycin (group G2 sacrificed on day 14) demonstrating the greater concentration of collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200). (C) Right vocal fold that received topical application of mitomycin (group G3 sacrificed on day 30) demonstrating the reduction of collagen concentration (yellow, orange and red colors). F = fat graft; LP = lamina propria (magnification X200). (D) Left vocal fold without topical application of mitomycin (group G3 sacrificed on day 30) demonstrating the greater concentration of collagen fibers (yellow, orange and red colors). F = fat graft; M = thyroarytenoid muscle (magnification X200).



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fonação humana é considerada uma função única que possibilita a exteriorização da linguagem, permitindo uma plena comunicação inter-pessoal e desta forma favorecendo as trocas lingüísticas que ampliam os conceitos e aprimoram o pensamento universal (Pereira, 2006). Interferem na sua produção uma série de fatores (anatômicos, fisiológicos, perceptivos, emocionais e sócio-culturais) que são passíveis de alterações, podendo gerar uma disfonia quando a mensagem transmitida deixa de ser eficaz, comprometendo a comunicação (Ribeiro et al., 2004).

A incompetência glótica é definida como uma perda de coaptação adequada entre as pregas vocais, podendo ser causada por paralisia, paresia, fibrose, atrofia ou mesmo arqueamento das pregas vocais, podendo levar a situações de disfonia, aspiração e tosse pouco efetiva (Küpper, 2006). Dentre todas estas causas, talvez sejam a cicatriz ou a fibrose as que mais se caracterizam por causar um impacto vocal negativo e pela falta de tratamentos efetivos (Thibeault et al., 2002).

Vários procedimentos cirúrgicos com a finalidade de reabilitar as funções aerodinâmica e esfíncteriana da glote passaram a ser desenvolvidos a partir do início do século passado através da inserção de materiais heterólogos (Kupper, 2006; Noordzij et al., 2008). O mais antigo procedimento para corrigir a insuficiência glótica foi descrito por Brunnings que introduziu as técnicas de injeção em 1911 para paralisia unilateral de prega vocal (Brunnings, 1911; Sasai et al., 2005). O primeiro material a ser usado foi a injeção de óleo de parafina que seria abandonada em virtude das reações de corpo estranho chamadas de “parafinoma” (Brunnings, 1911; Brandenburg et al., 1992; McCulloch et al., 2002).

Este procedimento permaneceu ignorado até que Arnold em 1962 re-utilizou esta técnica para injetar outro tipo de material, a pasta de Teflon[®] (Arnold, 1962; Brandenburg et al., 1992). Este material apresentava aparentemente todos os critérios necessários para injeção intracordal e por isso o uso do Teflon[®] se tornou o substrato de injeção nas pregas vocais preferido da década de 60 até a década de 90, principalmente por ser um método de fácil preparação e técnica cirúrgica simples. Apesar dos resultados iniciais terem sido bastante animadores, as reações de corpo estranho, fibrose, risco de estenose, formação de granuloma e a possibilidade de extrusão ou mesmo de disseminação sistêmica levaram à eliminação do uso deste material da prática moderna pelos laringologistas (Sasai et al., 2005; Steffen et al., 2006).

No decorrer dos anos, outros materiais passaram a ser testados, tais como cartilagem, cera óssea, Gelfoam[®], hidroxiapatita de cálcio, colágeno bovino, silicone,

gore-tex[®] e até látex, não obtendo da mesma forma resultados animadores (Remacle et al., 2001; Kupper, 2006). Estudos pilotos mais recentes começam a investigar os efeitos da injeção de células-tronco no músculo tireoaritenóideo com a finalidade de atenuar a atrofia muscular ou mesmo estimular um processo de re-inervação espontânea (Halum et al., 2007).

As características ideais para a injeção de materiais na prega vocal deveria então incluir: 1) facilidade de preparo e injeção; 2) propriedades biomecânicas similares as da prega vocal; 3) mínima reação de corpo estranho; 4) migração e risco de extrusão mínimos e; 5) manutenção do volume por longos períodos de tempo (Noordzij et al., 2008). Assim, apesar de uma série de materiais terem sido testados até o momento para enxertia nas pregas vocais, os implantes biológicos começaram a obter espaço quando os enxertos autólogos, como a gordura e a fásia muscular, demonstraram resultados mais promissores, com boa segurança e riscos mínimos de reações indesejadas (Carneiro, 2005).

Em 1983, Dedo & Rowe levantaram a possibilidade de utilizar enxertos livres de gordura na correção de cicatrizes de prega vocal. Mas somente em 1989, Wexler et al. realizaram o primeiro estudo experimental com laringe de 5 cães, introduzindo enxerto de gordura através de laringofissura. Na época, notaram um incremento das pressões laríngeas, da eficiência glótica e da estabilidade vocal (Shaw et al., 1997). Em seguida, Hill et al. (1991) descreveram estudo experimental com enxertos de gordura em prega vocal de cães. Foi então que no mesmo ano, Mikaelian et al. (1991) foram os pioneiros

a utilizá-la no tratamento de paralisia unilateral em humanos (Laccourreya et al., 2003; Umeno et al., 2005; Steffen et al., 2006). A partir deste momento, a gordura foi amplamente difundida como material autólogo pelas vantagens de apresentar risco mínimo de reações de rejeição, por sua biodisponibilidade e do fato da viscoelasticidade da gordura ser muito similar à da camada superficial da lâmina própria sugerindo que a sua consistência poderia ser próxima da ideal para injeção, qualidades consideradas excelentes para manter as propriedades vibratórias das pregas vocais (Shindo et al., 1996; Chan & Titze, 1998; Steffen et al., 2006; Umeno et al., 2005; Kruschewsky et al., 2007) . Ainda, a gordura é facilmente manipulada, podendo ser injetada ou mesmo inserida em bloco na prega vocal (Mikaelian et al., 1991; Bradenburg et al., 1992; Shindo et al., 1996; Sataloff et al., 1997; Woo et al., 1999; Remacle et al., 2001; Murta, 2005; Carneiro, 2005; Kruschewsky et al., 2007).

Todavia, a longevidade do enxerto gorduroso é variável e os resultados vocais ainda são imprevisíveis (Hsiung et al., 2000; Nishimura et al., 2000; Steffen et al., 2006). Não existe ainda consenso sobre alguns aspectos da utilização da gordura como material para enxerto, mas o ponto mais contraditório até o presente momento diz respeito aos fatores que interferem na sua absorção (Saccogna et al., 1997; Woo et al., 1999; Kruschewski et al., 2007). Sabe-se que a durabilidade da gordura na prega vocal é dependente de alguns fatores como: tamanho e volume do enxerto (Boyce et al., 1994), grau de manipulação do enxerto (Peer, 1959; Wetmore, 1989), fonte de coleta (Illouz, 1990), região anatômica a ser implantada (Boyce et al., 1994) e outros fatores metabólicos associados.

Durante a década passada até o presente momento, diversos estudos tem analisado a utilização da gordura como forma de enxerto na correção da insuficiência glótica com relação a melhora da qualidade vocal em estudos clínicos (Mikaelian et al., 1991; Brandenburg et al., 1992; Shindo et al., 1996; Shaw et al., 1997; Hsiung et al., 2000; Duprat et al., 2001; Hsiung et al., 2002; McCulloch et al., 2002; Hsiung et al., 2003; Lacourreya et al., 2003; Umeno et al., 2005), ao processo inflamatório em torno do enxerto (Hill et al., 1991; Hom, 1994; Bauer et al., 1995; Mikus et al., 1995; Zaretsky et al., 1995; Stein et al., 2000; Murta, 2005; Sasai et al., 2005), as propriedades viscoelásticas do enxerto (Chan & Titze, 1998), a distribuição do enxerto (Imamura et al., 2003), as propriedades aerodinâmicas das pregas vocais (Hartl et al., 2005), as taxas de absorção e viabilidade do enxerto (Wexler et al., 1989; Saccogna et al., 1997; Woo et al., 1999; Kruschewski et al., 2007), bem como ao processo inflamatório e tecido fibrótico gerados após o enxerto destes materiais (Murta, 2005; Carneiro et al., 2005), entre outros trabalhos diversos (Boyce et al., 1994; Sataloff et al., 1997; Remacle et al., 2001).

Após a instalação de algum dano tecidual na prega vocal de coelhos, observa-se uma proliferação celular abundante a partir do terceiro dia e a síntese do colágeno pelos fibroblastos aumenta progressivamente entre o 5º ao 21º dia (Branski et al., 2005), seguido por uma fase de remodelação (Mandelbaum, 2003). Inicialmente, o colágeno tipo III é produzido e depositado, sendo posteriormente substituído pelo colágeno tipo I à medida que ocorre a maturação do tecido cicatricial (Peacock, 1984). Observações

sugerem que o aumento da rigidez das pregas vocais se deve em parte a uma alteração da arquitetura deste colágeno cicatricial, adquirindo uma distribuição anormal e desorganizada (Thibeault et al., 2002). Além disso, a presença de um enxerto pode prolongar as fases da inflamatória e proliferativa da cicatrização normal por causa do estímulo antigênico inflamatório (Hom, 1994).

Na busca de substâncias que reduzissem o processo cicatricial, a mitomicina-C surgiu como alternativa nos procedimentos cirúrgicos nos quais este processo cicatricial intenso poderia prejudicar o resultado final (Simpson et al., 2008). Inicialmente utilizado como quimioterápico, a mitomicina-C é ativada intracelularmente, inibindo a divisão celular, a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, agindo sobre o processo de cicatrização, tornando-o menos intenso. Na Otorrinolaringologia, vários estudos demonstram sua eficácia como tratamento adjuvante nas estenoses laríngeas, dacriocistorrinostomias e nas cirurgias nasossinusais, entre outros (Kao et al., 1997; Ingrams et al., 1998; Ward et al., 1998; Correa et al., 1999; Rahbar et al., 2000a,b; Garret et al., 2001; Sennes et al., 2003).

Enquanto as pesquisas não encontram o material ideal e nem métodos eficientes para combater os efeitos negativos do processo cicatricial sobre a função fonatória, ainda é freqüente o uso de enxertos autólogos como a gordura. Desde o início este material demonstrou resultados promissores, mas foi principalmente a sua segurança e o risco mínimo de reações indesejadas ao enxerto que realmente perpetuaram o seu uso até o presente momento.

2 OBJETIVOS

2 **O**BJETIVOS

Considerando a necessidade de utilizar enxertos na correção dos casos de incompetência glótica, o impacto que o tecido cicatricial gera na vibração das pregas vocais submetidas a enxertia e a capacidade da mitomicina-C interferir sobre o processo de cicatrização, este estudo foi idealizado com os seguintes objetivos:

- **Quantificar e comparar as fibras colágenas nas pregas vocais dos coelhos que foram submetidos a enxerto de gordura após a aplicação tópica de solução de mitomicina-C a 0,4mg/ml durante 5 minutos com a prega vocal contra-lateral que foi submetida a enxertia de gordura sem a aplicação de solução tópica de mitomicina-C.**

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INSUFICIÊNCIA GLÓTICA

A insuficiência glótica pode ser definida como a perda de coaptação adequada entre as pregas vocais. Os sintomas mais comuns são representados pela disfonia e a aspiração de líquidos e sólidos. As principais causas são as alterações de mobilidade (paralisia e paresia), atrofia, cicatriz e até mesmo o arqueamento das pregas vocais. A literatura descreve dois tipos principais de cirurgias para a correção da insuficiência glótica que são as tireoplastias e a implantação de substâncias heterólogas ou autólogas nas pregas vocais. Esta última técnica tem demonstrado ser de fácil execução, com menores custos e taxas de morbidade. Vários tipos de materiais já foram utilizados ao longo do último século, tais como parafina (Brunnings, 1911), Teflon[®] (Arnold, 1962), Gelfoam[®] (Schramm, 1978), Gore-tex[®] (Hoffman & McCulloch, 1996), partículas de hidroxiapatita de cálcio (Remacle et al., 2001; Rondini-Gilli et al., 2003; Belafsky et al., 2004; Rosen et al., 2004), silicone (Rubin, 1966), látex (Kupper, 2006), colágeno heterólogo (Ford, 1986; Ford et al., 1986^{a,b}; Ford et al., 1992) e autólogo (Ford et al.,

1995; Remacle et al., 1999; Courey et al., 2001), cartilagem (Arnold, 1955; Noordzij et al., 2008), gordura (Wexler et al., 1989), fáscia muscular (Bruns, 1959) e ácido hialurônico (Hallen et al., 1999; Hertegard et al, 2002). No entanto, dificuldades foram encontradas com todas essas substâncias, ora havendo reabsorção, ora ocorrendo formação de reações de corpo estranho (Kupper, 2006).

Foi Zeitels (2000a) quem estabeleceu os fundamentos principais da fonomicrocirurgia, onde ressaltou a importância de evitar a retração bimanual de tecidos e incisões externas; promover uma dissecação subepitelial e realização de técnicas de *microflaps*; utilizar um campo operatório imóvel e estável; utilizar métodos de magnificação adequada de imagens e; afastar os tecidos supraglóticos que possam obscurecer a visualização do campo operatório. Esta metodologia tem como vantagens ainda um maior controle da avulsão, melhor processo de cicatrização e reepitelização secundária, além de maior precisão (Pereira, 2006).

As características ideais do material a ser injetado na prega vocal deveriam então incluir: 1) facilidade de preparo e injeção; 2) propriedades biomecânicas similares as da prega vocal; 3) mínima reação de corpo estranho; 4) migração e risco de extrusão mínimos e; 5) manutenção do volume por longos períodos de tempo (Noordzij et al., 2008). Enquanto as pesquisas ainda buscam encontrar o material ideal, é freqüente o uso de enxertos autólogos, como a gordura, que desde o princípio demonstraram resultados promissores, mas foi principalmente a segurança, a biodisponibilidade e o risco mínimo

de reações indesejadas ao enxerto que realmente perpetuaram o uso destes materiais até o presente momento (Murta, 2005; Carneiro, 2005).

3.2 USO DE ANIMAIS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Atualmente, as técnicas de fonomicrocirurgia fundamentam-se nos progressos recentes da compreensão dos mecanismos fisiológicos da prega vocal (Pereira, 2006). A partir dos estudos histológicos (Hirano, 1974) e dos padrões vibratórios (Isshiki et al., 1989) iniciou-se uma melhor compreensão da fisiologia laríngea e fonatória. Desta forma, os laringologistas passaram a buscar desenvolver e utilizar técnicas cirúrgicas mais conservadoras visando melhores resultados funcionais (Courey, 1996).

A fim de determinar qual o modelo animal mais apropriado para estudos experimentais em pregas vocais, Garret et al. (2000) compararam a histologia e os padrões vibratórios estroboscópicos da prega vocal de porco, cachorro e macaco. Os autores encontraram diferenças entre a distribuição de colágeno e elastina entre os grupos e apesar de nenhum dos animais apresentar anatomia laríngea idêntica à humana, o cachorro foi o animal que mais se aproximava do ideal pelo fato de apresentar uma vibração das pregas vocais mais similar a dos seres humanos.

Em outro estudo, Kurita et al. (1995) demonstraram que a histologia da prega vocal do porco, assim como as dimensões da laringe, são as que mais se aproximam da

humana. Isso, no entanto, segundo os autores não indicaria que tal animal seja necessariamente o melhor modelo para estudos da fonação.

Segundo Thibeault et al. (2002), a prega vocal de coelhos é relativamente similar a ultra-estrutura vocal humana, demonstrando camadas diferenciadas de lâmina própria e músculo tiroaritenóideo. Ainda, o coelho é um animal bastante utilizado em estudos imunológicos, que demonstrou apresentar como vantagens ser bastante dócil, de fácil manejo anestésico e que se acomoda facilmente em gaiolas comuns de biotério (Harlow & Lane, 1988). Finalmente, o coelho é um modelo que tem sido muito utilizado em estudos experimentais visando analisar a reação inflamatória e o processo cicatricial na laringe, inclusive em nosso meio (Wetmore, 1989; Thibetalt et al., 2002; Hertegard et al., 2003; Duprat et al., 2004; Dahlqvist et al., 2004; Hertegard et al., 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005; Branski et al., 2005).

3.3 A CASCATA DE EVENTOS DO PROCESSO CICATRICAL

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e organizada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição dos tecidos (Ortonne et al., 1994). Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (Mandelbaum, 2003).

A cicatriz de prega vocal ocorre na lâmina própria da prega vocal, resultando uma perda da flexibilidade desta lâmina. A lâmina própria (predominantemente a camada superficial) funciona desta forma como um cordão elástico entre o epitélio da prega vocal e as camadas mais profundas das pregas vocais - o músculo tireoaritenóide (Hirano, 1993).

Segundo Benninger (1996), a cicatriz da prega vocal é uma das mais desafiantes em razão da alteração ocasionada pela patologia instalada na mucosa e submucosa e pela dificuldade na reabilitação da disfonia. O pesquisador comparou as técnicas ditas “frias” com a técnica utilizando laser de CO₂, na ressecção de nódulos, pólipos e cistos nos bordos livres das cordas vocais, e concluiu que não há diferença clínica nos pós-operatórios obtidos, utilizando-se uma ou outra técnica. Deste modo, quando ocorre regeneração tecidual, forma-se cicatriz pela proliferação do tecido conjuntivo, pois quando ocorre a exérese de certas lesões, normalmente não se preserva a camada superficial da lâmina própria ocasionando processo de cicatrização exagerado.

Rosen (2000) afirma que com a perda deste cordão elástico a vibração da prega vocal é rigidamente prejudicada e resulta em uma incompetência do fechamento glótico que se torna incompleto. E esse processo conseqüentemente ocasionaria a perda de ar durante a fonação.

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo bastante dinâmico e com fases distintas tão interdependentes como ocorre

na cicatrização. Basicamente, as fases do processo cicatricial podem ser divididas em quatro: **hemostasia**, **inflamação**, **proliferação** e **remodelação** (Peacock, 1984; Robbins, 1991; Adzick, 1997; Glat et al. 1997; Mélega, 2002). Alguns autores, incluem ainda a **retração da ferida** como uma fase adicional (Mandelbaum, 2003).

A **fase de hemostasia** inicia-se imediatamente após o trauma e o surgimento da ferida, com eventos vasculares de vasoconstrição seguida por uma vasodilatação com duração de minutos. Essa fase depende diretamente da atividade das plaquetas e da cascata de eventos que se sucedem na coagulação. A partir deste momento, ocorre uma complexa liberação de produtos e substâncias com ação vasoativa com proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases sendo liberados e regulando o início das outras fases. A formação do coágulo serve não apenas para aproximar as bordas das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, para que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (Grinnel et al., 1981; Clark et al., 1982; Clark, 1985).

A **fase inflamatória**, é ligada intimamente à fase anterior e depende, além de inúmeros mediadores químicos, também de uma série de células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. No momento da injúria tissular chegam os leucócitos polimorfonucleares que permanecem por períodos que variam de três a cinco dias. A partir de então, os macrófagos tornam-se a célula inflamatória mais importante desta fase, permanecendo do terceiro ao décimo dia. São os macrófagos que promovem a fagocitose de bactérias, realizam o debridamento de corpos estranhos e

passam a direcionar o desenvolvimento do tecido de granulação. Esta alta atividade fagocitária dos macrófagos é observada após trauma. Os linfócitos passam a surgir na ferida aproximadamente após uma semana. Todavia, seu papel ainda não está bem esclarecido, porém sabe-se que suas linfocinas tem ação importante sobre os macrófagos. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fibronectina que é sintetizada por uma série de células (fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais) desempenha um importante papel na fase inflamatória. É a fibronectina que se adere simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando desta maneira como uma espécie de “cola natural” a fim de consolidar todos os elementos do coágulo de fibrina, das células e dos componentes da matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, a fibronectina tem propriedades quimiotáticas e também promove a psonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias (Diegelmann et al., 1981; Mosher & Furcht, 1981; Peacock, 1990; Petrova, 1992; Clark, 1998).

É na **fase proliferativa** que ocorre a formação do tecido de granulação e sua principal característica é a presença de fibroblastos a partir do segundo ou terceiro dia após a injúria tissular. É na fase proliferativa que se forma a matriz propriamente dita, que é fundamental na formação do tecido de granulação (agrupamento de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação deste tecido de granulação irá depender principalmente dos fibroblastos, células fundamentais na formação da matriz. Muito além de ser apenas um produtor de colágeno, o fibroblasto

produz uma série de outros elementos, tais como a elastina, a fibronectina, a glicosaminoglicana e as proteases, sendo que estas últimas são responsáveis pelos processos de debridamento e remodelamento fisiológico. Assim, o fibrogênio que se encontra presente no exsudato inflamatório se converte em fibrina, que forma uma espécie de “rede” em cujas malhas passam a se depositar os fibroblastos. Como todo este conjunto de eventos é sempre acompanhado de proliferação vascular, as células endoteliais passam a produzir um fator ativante do plasminogênio que produz uma redução da quantidade de fibrina, permitindo assim a deposição dos fibroblastos, que passam a se multiplicar e a secretar os componentes protéicos que irão constituir o tecido cicatricial. Então, é nesta fase também que ocorre o processo de angiogênese essencial para manter o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente, as células endoteliais passam a migrar para a área ferida e na seqüência ocorre uma proliferação destas células endoteliais permitindo assim o acesso das outras células responsáveis pelas fases subseqüentes. Na fase proliferativa, até um período de duas semanas após a injúria tissular, os fibroblastos são considerados fundamentais. Os fatores de crescimento angiogênicos por sua vez deflagram o processo de neovascularização, epitelização e formação de tecido de granulação (Winter, 1962; Hinman & Maibach, 1967; Van Winkle, 1967; Christopher, 1972; Gentilhomme et al., 1999). Em estudo experimental com 25 ratos, Nishimura et al. (2000) identificaram que fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial, iniciam a revascularização do enxerto de gordura em torno do 7º dia e estas estruturas vasculares se mantêm por longo prazo. Em virtude da necrose que ocorre nos primeiros dias, leva a

uma degradação de uma série de elementos no ambiente de enxertia que pode levar desta maneira a uma redução do volume do enxerto de gordura a longo prazo.

A **fase de contração da ferida** corresponderia ao movimento centrípeto das bordas da ferida (Stegman et al., 1982; Lawrence et al., 1986). Esta fase não é incluída por alguns autores em todas as classificações.

A última fase, de **remodelação** é uma fase mais longa (durando alguns meses) que ocorre no colágeno e na matriz e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. A redistribuição do colágeno, a melhoria nos componentes das fibras colágenas e a reabsorção de água são eventos que permitem um aumento da força da cicatriz e diminuir a sua espessura. A neovascularização por sua vez passa a diminuir, e tardiamente a cicatriz torna-se avascular (Doillon et al., 1985).

Muitas variáveis tanto de natureza sistêmica como de natureza local influenciam esse processo longo e complexo. Dos fatores sistêmicos, pode-se citar a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base (tais como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose e disfunção renal), quadros infecciosos e uso de drogas sistêmicas. Dos fatores locais, interferem a técnica cirúrgica utilizada, a eventual formação de hematomas, infecção localizada, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas (como por exemplo, a mitomicina-C), entre outros (Mandelbaum, 2003; Tenius et al., 2008).

Segundo Hom (1994), a presença de um enxerto prolongaria significativamente as fases inflamatória e proliferativa por causa do estímulo antigênico contínuo promovido pelo enxerto sobre o local de enxertia. De acordo com o mesmo autor, o enxerto promoveria uma estimulação do processo inflamatório, levando a fibrose e a um depósito maior de tecido conectivo em torno do enxerto. Os neutrófilos ao promover a degradação do enxerto, liberam uma série de produtos que ativam os sistemas imune e do complemento. Esta reação de degradação promovida pela resposta inflamatória irá depender proporcionalmente ao quanto o enxerto é quimicamente e fisicamente reativos ao tecido receptor. A persistência do processo inflamatório crônico em resposta ao enxerto pode levar a sua destruição ou mesmo rejeição. Então, os histiócitos passam a se aproximar da periferia do enxerto, liberando substâncias quimiotáxicas que induzem a proliferação de fibroblastos e a maior síntese de colágeno e colagenases que degradam as fibras colágenas do tecido ao redor do enxerto.

3.4 A ESTRUTURA DAS FIBRAS COLÁGENAS

O tecido conjuntivo se caracteriza por apresentar uma série de células separadas por uma quantidade abundante de matriz extracelular, sendo que algumas destas células são próprias e outras provenientes do tecido sangüíneo. As células próprias do tecido conjuntivo são os fibroblastos, os macrófagos, os mastócitos e os plasmócitos. Por outro lado, vários tipos de leucócitos, penetram no tecido conjuntivo para exercerem determinadas funções específicas (Orgill & Demling, 1988).

O fibroblasto em sua forma ativa apresenta um núcleo grande e o citoplasma com grande quantidade de retículo endoplasmático de Golgi desenvolvido. Os fibroblastos são responsáveis pela produção e a manutenção da matriz extracelular, que por sua vez separa os elementos celulares do tecido conjuntivo, e é formada por fibras e substância intercelulares amorfas. É também a partir dos fibroblastos que é produzido o colágeno (Orgill & Demling, 1988).

Existem três tipos principais de fibras no tecido conjuntivo: fibras colágenas, fibras reticulares e fibras elásticas. A estrutura das fibras colágenas é formada por um conjunto de fibrilas de colágeno com um padrão de estrias típico. O colágeno constitui uma família de proteínas separadas em diferentes tipos (Junqueira, 1995; Montes & Junqueira, 1982; Montes, 1996), dentre os quais se destaca:

- Colágeno tipo I – Aquele que forma fibras e feixes resistentes, encontrados nos tendões, ligamentos, cápsulas, derme e distribuído em duas camadas na lâmina própria das pregas vocais (Melo et al., 2003); este constitui o colágeno mais importante do ponto de vista estrutural.

- Colágeno tipo II – É aquele encontrado nas cartilagens hialinas e elásticas; suas fibras são muito finas, sendo vistas com dificuldade ao microscópio óptico, porém podem ser observadas com facilidade no microscópio eletrônico.

- Colágeno tipo III - Forma as fibras reticulares, aparecendo com muita frequência vinculado à musculatura lisa e é fundamentalmente encontrado nas vísceras e

também está presente na pele, em volta dos nervos e vasos sanguíneos; na lâmina própria das pregas vocais distribui-se em uma camada entre as faixas de colágeno tipo I (Melo et al., 2003).

- Colágeno tipo IV – É o tipo de colágeno encontrado nas lâminas basais, ou seja, naquelas estruturas que separam geralmente os epitélios dos tecidos conjuntivos.

- Colágeno tipo V – É um tipo de colágeno que faz parte especificamente da membrana basal da placenta; sua citação é somente para demonstrar como esta proteína se adapta a distintas funções biológicas que vão aparecendo com a evolução das espécies.

3.5 CICATRIZAÇÃO NA PREGA VOCAL DE COELHOS

Alguns autores recentemente têm descrito as características do processo cicatricial e correlacionar suas conseqüências sobre o funcionamento das pregas vocais utilizando modelos experimentais com coelhos. A cicatrização das pregas vocais é caracterizada pelo aumento da densidade de colágeno, bem como uma redução da organização deste colágeno, levando a uma condição negativa em relação às alterações biomecânicas da fisiologia fonatória (Murta, 2005; Carneiro, 2005; Branski et al., 2005).

Em estudo experimental, usando métodos reológicos, histológicos e imuno-histoquímicos, Kriesel et al. (2002) injetaram matriz de colágeno homólogo nas pregas vocais de 20 coelhos após produzir cicatriz bilateral previamente. Após 10 semanas, os

autores observaram que a matriz de colágeno homólogo ao ser injetado promove uma pequena reação inflamatória, sugerindo que o colágeno injetado pode ser usado como material relativamente estável para a medialização das pregas vocais na correção da insuficiência glótica, porém não apresentando melhora das propriedades viscoelásticas da lâmina própria das pregas vocais.

Em outro estudo histológico, nas pregas vocais de 11 coelhos submetidas a cicatriz provocada, Thibeault et al. (2002) analisaram a lâmina própria após 60 dias observando uma diminuição significativa das fibras de elastina, além de uma desorganização tecidual. A síntese de colágeno aumentou rapidamente nos primeiros 5 dias após a injúria e permaneceu por 2 a 4 semanas. Após este período, a síntese de colágeno diminui e é balanceada pelo aumento de colagenases, denotando a fase de remodelação do processo. No mesmo estudo avaliaram as propriedades reológicas e encontraram aumento na rigidez das pregas vocais que segundo os autores se deve a uma alteração da arquitetura do colágeno cicatricial, adquirindo uma distribuição anormal e desorganizada.

Destes estudos, talvez o que melhor descreva histologicamente as alterações cicatriciais na prega vocal foi o trabalho realizado por Branski et al (2005). Neste estudo, os autores observaram **qualitativamente** a formação de tecido cicatricial nas pregas vocais de coelhos nos primeiros 21 dias após a incisão cirúrgica. Estes autores observaram uma proliferação celular abundante no sítio cicatricial no 3^o dia de pós-operatório. Este infiltrado caracterizou-se por uma combinação de células inflamatórias

e fibroblastos depositando material na matriz extracelular. Para os autores, este período pode ser crítico para o processo cicatricial na prega vocal. No 5º dia de pós-operatório um depósito de colágeno é iniciado. Este colágeno parece ser mais denso que o colágeno normal. Adicionalmente, novos canais vasculares são formados na lâmina própria. No 7º dia de pós-operatório, mais colágeno é depositado na matriz extracelular. A partir do 10º dia de pós-operatório, os autores observaram o depósito de mais colágeno denso e desorganizado com uma completa cobertura epitelial. Entre o 10º e 14º dias de pós-operatório os autores observaram mínimas alterações, mantendo a deposição de colágeno denso e desorganizado. Os autores concluíram que entre o 5º e 21º dias de pós-operatório houve um aumento do depósito de colágeno. Apesar dos autores não utilizarem métodos quantitativos, a densidade do colágeno na lâmina própria pareceu estar aumentada na prega vocal operada em comparação com a prega vocal de controle. Adicionalmente, a prega vocal operada apresentou-se com a matriz extracelular laminada.

3.6 ENXERTO DE GORDURA AUTÓLOGA NAS PREGAS VOCAIS

O uso de enxerto de gordura é objeto de estudo em várias áreas da medicina, incluindo a laringologia, sendo que foi utilizada pela primeira vez na cirurgia reparadora em 1893 por Neuber, para correção da órbita após osteíte tuberculosa (figura 1). Lexer (1919) foi o primeiro autor a descrever o sucesso da gordura na correção de defeitos em cirurgia de cabeça e pescoço. E em 1923, Neuhof apresentou um estudo

histológico revelando a presença de histiócitos que substituíam as células adiposas em enxertos de gordura (Boyce et al., 1994).



Figura 1. Foto de Gustav Neuber (1850-1932). Fonte: Sankt Elisabeth Krankenhaus Kiel, Alemanha

Mas foi Peer, em 1959 quem definiu a teoria da “célula sobrevivente”, a partir de suas observações de que pequenos volumes de enxertos livres de gordura poderiam ser viáveis com a obtenção osmótica de nutrientes a partir de suprimento vascular (Shaw et al., 1997). Propôs que as anastomoses dos capilares era o aspecto fundamental para a manutenção do enxerto. Peer também identificou que as células gordurosas implantadas não eram substituídas por tecido cicatricial, observando que uma cápsula de tecido conectivo se formava em torno do enxerto (Boyce et al., 1994).

De acordo com as observações de Arnold em 1962, a gordura já aparecia como o material ideal para a injeção em pregas vocais paralizadas, já que segundo o mesmo autor, a gordura é um tecido obtido a partir próprio paciente, muito bem tolerado pelo organismo, que pode ser facilmente injetado e que não parece se tornar rígido (Remacle & Lawson, 2001) . Em 1983, Dedo & Rowe levantaram a possibilidade de utilizar enxertos livres de gordura na correção de cicatrizes de prega vocal. Em 1989, Wexler et al. realizaram estudo experimental com laringe de 5 cães, introduzindo enxerto de gordura através de laringofissura. Na seqüência, Hill et al. (1991) descreveram estudo

experimental com enxertos de gordura em prega vocal de cães. Baseados nestes trabalhos, Mikaelian et al. (1991) foram os pioneiros a utilizar injeção de gordura no músculo vocal de 3 pacientes com paralisia unilateral de prega vocal apresentando resultados bastante encorajadores na época (Shaw et al., 1997; Laccourreya et al., 2003; Umeno et al., 2005; Steffen et al., 2006).

A gordura pode ser usada na correção da insuficiência glótica, obtida após aspiração seguida de injeção com o uso de seringas ou transplantada em bloco (Mikaelian et al., 1991; Bradenburg et al., 1992; Shindo et al., 1996; Sataloff et al., 1997; Woo et al., 1999; Remacle et al., 2001; Murta, 2005; Carneiro, 2005; Kruschewsky et al., 2007). A escolha da técnica depende de alguns fatores como a etiologia da incompetência glótica, as características da vibração das pregas vocais além de preferências pessoais. As alterações de mobilidade da prega vocal compõem as principais indicações da lipoinjeção que deve ser realizada preferencialmente com agulhas de maior calibre. Para a correção de fibroses ou cicatrizes das pregas vocais seria necessário o uso de agulhas de menor calibre, o que inviabilizaria o uso da gordura, pois sua viscosidade é elevada para tal procedimento. Além disso, haveria destruição das propriedades moleculares do bloco gorduroso que prejudicaria a longevidade do enxerto. O local de injeção da gordura influencia de maneira direta no resultado final. O espaço paraglótico (lateralmente ao músculo vocal) e a margem vibratória da prega vocal são os locais de potencial abordagem pelo cirurgião (Remacle & Lawson, 2001). Para alguns autores a decisão do local de injeção depende somente da natureza do material a ser enxertado ou mesmo da indicação do procedimento cirúrgico (Mau et al., 2008).

Segundo Imamura et al. (2003), a gordura injetada no músculo tireoaritenóideo tende a ocupar um espaço cilíndrico ao longo do maior eixo da prega vocal promovendo assim o fechamento da glote tanto posterior quanto anterior.

A opção por utilizar a gordura como enxerto na laringologia ainda é motivo de resultados imprevisíveis, devido à possibilidade de absorção e conseqüente perda do volume (Hsiung et al., 2000; Nishimura et al., 2000; Steffen et al., 2006). Segundo a literatura, as taxas de absorção são bastante variáveis sugerindo que a manutenção do enxerto de gordura depende de vários fatores, podendo-se citar o tamanho e volume do enxerto (Boyce et al., 1994), grau de manipulação do enxerto (Wetmore, 1989), fonte de coleta (Illouz, 1990), região anatômica a ser implantada (Boyce et al., 1994) e outros fatores metabólicos associados (Boyce et al., 1994; Kruschewski et al., 2007; Tenius, 2007).

Acredita-se que existem dois tipos distintos de gordura subcutânea: uma mais superficial, embriologicamente de origem ectodérmica e intimamente relacionada com a pele e; outra mais profunda, determinada geneticamente e com influência discreta da dieta. Analisando propriedades bioquímicas, metabólicas, histológicas, embriológicas e anatômicas destes dois tipos de gordura, Illouz et al. (1990) demonstraram que o segundo tipo é mais resistente a lipólise e, teoricamente, mais indicado para enxertia.

Outra variável que parece interferir na longevidade do enxerto é a forma com a qual é feito o manuseio previamente a injeção ou a inserção em bloco. Desde 1959, Peer

já havia descrito que enxertos submetidos a trauma prévio apresentavam resultados mais pobres que aqueles sem manipulação (Boyce et al., 1994). Conforme Wetmore et al. (1989) demonstraram em estudo experimental através de enxerto de gordura no subcutâneo de coelhos, a manipulação excessiva da gordura gerava maior processo inflamatório devido à ruptura da estrutura celular e liberação de ácidos graxos.

Apesar de controverso, o tamanho ou volume do enxerto gorduroso também pode influenciar no rendimento. Os estudos sugerem que os enxertos de gordura são efetivos numa larga variedade de tamanhos. O que se observa é que um enxerto de gordura único em bloco parece ter resultados melhores que múltiplos pequenos enxertos (Boyce et al., 1994). Porém, considerando-se que o uso em laringologia (reconstrução do espaço de Reinke ou injetado no espaço paraglótico) é restrito a pequenos espaços, esse fator poderia não ser significativamente relevante.

Finalmente, outros fatores metabólicos podem interferir sobre a absorção do enxerto de gordura. Investigações sugerem que a lipólise pode ser retardada *in vitro* quando a insulina é adicionada (Boyce et al., 1994). Todavia, quando a insulina é aplicada nos enxertos de gordura em pregas vocais estes mesmos resultados não são observados (Kruschewski et al., 2007). Os corticoesteróides tem sido utilizados como um método para reduzir o processo inflamatório que acompanha o enxerto, no entanto faltam ainda estudos controlados (Boyce et al., 2004). Acredita-se que os corticoesteróides prejudiquem a cicatrização, causando decréscimo da proliferação celular, da neovascularização e da produção de matriz. Observou-se os efeitos que

aplicação de dexametasona (0,1mg/kg/dia) durante 30 dias sobre a cicatrização, identificando uma diminuição da resistência da cicatriz, baixa densidade de colágeno, sendo que no início do processo identifica-se uma menor densidade de colágeno tipo III e subsequentemente do colágeno tipo I, bem como uma redução das células inflamatórias (Tenius, 2007). Aparentemente, crianças parecem ser melhores candidatas para enxertos de gordura que os adultos. Assim como pacientes obesos parecem apresentar maiores taxas de reabsorção do enxerto (Boyce et al, 1994).

3.7 ESTUDOS COM ENXERTO DE GORDURA NAS PREGAS VOCAIS

Em 1989, Wexler et al. realizaram um estudo experimental com laringe de 5 cães, introduzindo enxerto de gordura através de laringofissura e após 8 semanas da cirurgia inicial os autores conseguiram identificar a gordura em 4 cães. Na época, os autores também observaram uma aparente melhora das pressões laríngeas, da eficiência glótica e da estabilidade vocal.

Mais tarde em 1991, Hill et al. realizaram trabalho experimental com laringe de cães submetidas à injeção de gordura autóloga para medialização das pregas vocais. Todos os 5 animais utilizados no trabalho foram submetidos previamente à secção do nervo laríngeo recorrente, sendo o primeiro grupo com 3 animais sacrificados após 48 horas e o segundo grupo com 2 animais sacrificados 3 semanas após o procedimento. As laringes foram então removidas para serem submetidas a estudo histológico com microscopia de luz. No primeiro grupo, foi identificado processo inflamatório agudo e

poucas áreas de necrose focal. No segundo grupo, a gordura manteve sua estrutura e volume, com a presença de evidências de revascularização, com mínima reação de corpo estranho e ausência de necrose o que caracterizava assim a viabilidade do enxerto.

No mesmo ano, Mikaelian et al. (1991) foram os pioneiros utilizando injeção de gordura no músculo vocal de 3 pacientes com paralisia unilateral de prega vocal. Após 12 meses de acompanhamento destes pacientes os resultados foram considerados bastante encorajadores na época já que a injeção de gordura era um procedimento cirúrgico bem menos invasivo que os outros métodos (como por exemplo, as tireoplastias), apresentando processo inflamatório discreto, com pouca formação de tecido de granulação e uma performance fisiológica próxima da ideal devido as suas propriedades viscoelásticas similares as da lâmina própria humana (Umeno et al, 2005).

Subseqüentemente, Brandenburg et al. (1992) descreveram a sua experiência na medialização das pregas vocais com uma técnica ainda considerada “inérita” de injeção intracordal de gordura autóloga em 11 pacientes com paralisia unilateral de cordas vocais. A fonte de coleta da gordura foi através de sucção da parede abdominal. A eficiência do tratamento foi avaliada através de métodos subjetivos de características vocais e vídeo-laringostroboscopia por um período de 5 a 42 meses. Os autores observaram uma redução da coluna aérea e um incremento da intensidade vocal. A correção da insuficiência glótica foi considerada duradoura, indicando que a gordura poderia ser uma substância viável como enxerto. As qualidades da gordura autóloga

pareceram ser uma excelente alternativa ao Teflon[®] e ao colágeno, principalmente por sua biodisponibilidade, facilidade de coleta e simples injeção.

Em estudo posterior, Mikus et al. (1995) compararam o procedimento de injeção de gordura na prega vocal de cães por meio de duas técnicas diferentes (lipossucção exclusiva e lipossucção seguida de purificação com homogeneização do tecido, centrifugação e solução tampão). Os autores, procuraram determinar o volume de gordura viável injetada após ser colhida e processada através destes dois métodos. O processo inflamatório gerado após 12 semanas pela enxertia não apresentou diferença significativa entre os grupos e foi considerado relativamente pequeno, presente nos tecidos em torno da gordura injetada. No entanto, surpreendentemente notaram que a técnica de lipossucção promoveu menores taxas de absorção ao compararem o rendimento do tecido enxertado.

No mesmo ano, Zaretsky et al. (1995) realizaram estudo experimental para medialização de pregas vocais paralisadas de 8 cães submetidos a procedimento de injeção no músculo tireoaritenóideo de gordura retirada da região supra-clavicular. Todos os animais foram previamente submetidos à secção do nervo laríngeo recorrente. As laringes foram divididas em 3 grupos, seccionadas coronalmente e submetidas a análise histológica com microscopia de luz após um, três e seis meses. Somente uma mínima resposta inflamatória foi observada no grupo sacrificado após 30 dias. A preservação de gordura viável foi confirmada no sítio de injeção em todos os animais, mas em quantidade menor no grupo de seis meses.

Através de relato de caso, Bauer et al. (1995) descreveram o uso de injeção de gordura em um paciente com paralisia de prega vocal, apresentando resultado animador após documentação de enxerto persistente 5 meses após a intervenção cirúrgica.

Shindo et al. (1996) conduziram um estudo com injeção de gordura autóloga em 21 pacientes com paralisia unilateral de pregas vocais. O trabalho revelou uma boa qualidade vocal em metade dos pacientes após 12 meses do tratamento demonstrando que a gordura era um método simples e seguro para realizar a medialização temporária das pregas vocais.

Em outro estudo experimental, Saccogna et al. (1997) utilizaram 6 gatos domésticos para avaliar a viabilidade do enxerto de gordura autóloga em pregas vocais paralisadas após procedimento de secção do nervo laríngeo recorrente. O sítio de coleta da gordura foi a região infra-umbilical. A gordura foi irrigada com solução salina e na seqüência injetada na região do músculo vocal sempre na prega vocal esquerda. Os animais foram divididos em cinco grupos e sacrificados em períodos variáveis de 6 semanas até 12 meses após o procedimento de injeção respectivamente. No grupo de seis meses foram analisados dois animais, sendo que para cada outro grupo foi sacrificado uma amostra de animal somente. O gato sacrificado com seis semanas apresentou formação de granuloma e pouca quantidade de evidências de gordura viável. No animal sacrificado aos quatro meses, a análise histológica mostrou volume significativo de gordura viável, apresentando células gigantes de corpo estranho ao redor

do enxerto. No grupo sacrificado aos seis meses, em um dos gatos, foi identificado processo inflamatório ao redor da gordura enquanto o outro gato do grupo não apresentava gordura viável. No gato do grupo sacrificado aos oito meses, a gordura foi identificada e associada a células gigantes de corpo estranho ao redor. O animal sacrificado após 12 meses não mostrou na análise histológica evidências de gordura viável. Enfim, os resultados identificaram persistência e viabilidade histológica do tecido gorduroso até 8 meses após o seu procedimento de injeção, mas somente uma mínima quantidade de gordura restou no grupo sacrificado após 12 meses. Com este estudo, os autores consideraram a gordura ser um método efetivo para correções temporárias de paralisias unilaterais das pregas vocais.

Em estudo clínico, Sataloff et al. (1997) descreveram o caso de quatro pacientes com cicatriz de prega vocal provocada por manipulação cirúrgica prévia e que foram tratados com implante de gordura através da criação de uma bolsa no espaço de Reinke seguida por preenchimento de gordura injetada com seringa de Bruning e agulha grossa para evitar trauma e destruição do bloco. Apesar da subjetividade da análise com estroboscopia, os autores observaram melhora nos padrões vibratórios com preservação da onda mucosa e da qualidade vocal.

Também no mesmo ano, Shaw et al. (1997) utilizaram injeção de gordura autóloga para corrigir insuficiência glótica de várias etiologias (paralisia, deficiência de volume e fibrose de prega vocal) em 22 pacientes. Após a divisão dos pacientes em 2 grupos, foram realizadas análise acústica, eletrogloteografia e vídeo-

laringostroboscopia por um período mínimo de 12 meses até 18 meses após a intervenção. As principais vantagens observadas pelos autores foram os mínimos riscos de reação de corpo estranho, hipersensibilidade, formação de granuloma ou rejeição do enxerto além de não exigir a realização de incisões externas. Para estes autores, a gordura também se apresentou como uma opção duradoura e viável para enxertia a partir de observações objetivas e subjetivas até 18 meses após a sua injeção nas pregas vocais.

Segundo Chan & Titze (1998), ao compararem a viscosidade de uma série de materiais utilizados como enxerto (Teflon[®], colágeno, Gelfoam[®] e gordura), observaram que a gordura apresenta viscosidade similar à camada superficial da lâmina própria, e desta forma, sugerindo que a mesma apresenta a consistência mais próxima da ideal para enxertia na prega vocal.

Em estudo experimental com laringe de 6 cães, Woo et al. (1999) realizaram implante endoscópico de gordura autóloga e sacrifício dos animais após 6 semanas. A gordura foi implantada em um “bolsão” submucoso e utilizado sutura do retalho mucoso. Histologicamente, os autores identificaram em cortes coronais das pregas vocais, células adiposas viáveis após este período e/ou tecido fibroso no sítio de implante, além de evidenciar um aumento no espaço de Reinke em comparação com a prega vocal contra-lateral. No entanto, o pouco tempo transcorrido entre a implantação e o sacrifício do animal poderia supervalorizar o efeito benéfico da gordura implantada apresentado pelos autores. Ainda, a ausência de uma análise histológica sem utilizar parâmetros morfométricos do rendimento dos enxertos, poderia surgir como um viés no

referido estudo. As propriedades vibratórias das pregas vocais foram analisadas através de vídeo-laringostroboscopia. O sítio de implantação do enxerto continuou a demonstrar uma boa função vibratória.

Em outro estudo experimental com modelo animal, Stein et al. (2000) compararam, a histologia da reação tecidual local e a migração após a injeção de quatro tipos diferentes de enxertos na prega vocal paralisada canina após secção do nervo laríngeo recorrente: Teflon[®], silicone, hidroxiapatita e gordura. Os autores observaram que após 6 meses a hidroxiapatita de cálcio e a gordura foram os materiais que causaram a menor reação inflamatória tecidual e migração para linfonodos regionais. A injeção de Teflon[®] apesar de identificar uma migração regional para linfonodos, também apresentou uma mínima reação inflamatória. A suspensão de silicone, por outro lado, causou uma reação de células gigantes sem migração para linfonodos regionais. A gordura autóloga demonstrou resultados bastante favoráveis como material destinado a enxertia na medialização de pregas vocais. No período de 6 meses analisado os enxertos de gordura autóloga demonstraram persistência no sítio de implantação. No entanto, o estudo não comenta sobre o rendimento dos diferentes tipos de enxertos, bem como apresenta uma análise apenas qualitativa dos parâmetros analisados.

Ainda em 2000, Hsiung et al. publicaram análise retrospectiva de 33 pacientes comparando a eficiência da injeção de gordura no tratamento da insuficiência glótica por etiologias variadas (paralisia de prega vocal, fibrose e atrofia). Realizaram vídeo-laringostroboscopia e análise acústica (tempo de fonação, qualidade vocal, intensidade,

ruídos, entre outros) de todos os pacientes no acompanhamento pós-operatório por um período mínimo de 6 meses. Concluíram que a injeção de gordura é um bom material autólogo para enxertia e pode ser considerado como uma opção no manejo destes tipos de caso. Os autores também levantaram neste estudo a questão da reabsorção do enxerto de gordura como um problema, mas por outro lado lembraram que o procedimento pode ser repetido.

Em 2001, Remacle et al. fizeram extenso levantamento bibliográfico sobre os vários materiais utilizados como enxerto para medialização ou restauração de volume das pregas vocais, tais como Teflon[®], silicone, Gelfoam[®], colágeno, fásia muscular, gordura autóloga e ácido hialurônico. Os autores observaram que os resultados obtidos com o uso da fásia muscular foram similares aos encontrados com a gordura. A injeção de materiais ofereceu resultados melhores que a medialização já que consiste em um procedimento simples de realizar, pouco invasivo e fácil de reproduzir. Quando se realiza a injeção de gordura os autores preferem a camada profunda da lâmina própria já que a reabsorção seria muito mais devagar no espaço de Reinke do que no músculo tireoaritenóideo. Segundo os autores, apesar da gordura e do ácido hialurônico apresentarem propriedades biomecânicas mais próximas da prega vocal humana do que o colágeno, esta diferença não parece apresentar efeitos clínicos sobre a vibração da prega vocal e da fonação.

Em estudo clínico, Duprat et al. (2001) publicaram a experiência com o uso do enxerto de gordura no tratamento de 11 pacientes com incompetência glótica por

etiologias variadas (sulco, cisto aberto e cicatriz pós-operatória). Os autores descreveram melhora dos padrões vocais e dos parâmetros na vídeo-larinoestroboscopia, além de uma satisfação maior dos pacientes. A técnica utilizada foi semelhante à usada por Sataloff et al. (1997), diferindo somente na forma de implantação da gordura. Enquanto estes autores utilizaram a seringa para injetar a gordura, Duprat et al. (2001). realizaram transporte em bloco com o uso de instrumental convencional. Ambos não relatam o uso de suturas ou colas biológicas para melhor fixação do enxerto.

Em 2002, Hsiung et al. realizaram estudo retrospectivo para analisar a eficiência da injeção de gordura após cirurgia em 23 pacientes com nódulos vocais. Foi realizada a análise de percepção acústica, função fonatória e vídeo-larinoestroboscopia antes e depois de todas as cirurgias. Os resultados foram considerados excelentes na maioria dos pacientes nos parâmetros analisados por no mínimo 6 meses.

No mesmo ano, McCulloch (2002) publicaram outro estudo retrospectivo com 50 pacientes tratados com injeção de gordura autóloga em casos de paralisia unilateral de pregas vocais. Os autores consideraram a reabilitação vocal satisfatória por períodos curtos de tempo. Os resultados da utilização da injeção da gordura foram considerados limitados, já que o seu uso não permite uma restauração vocal por longos períodos de tempo.

Lacourreya et al. (2003), a partir de estudo retrospectivo, analisaram 80 pacientes com paralisia unilateral de prega vocal submetidos a tratamento com injeção de gordura

autóloga no músculo tireoaritenóideo. Por um período mínimo de 12 meses todos os pacientes foram submetidos a análise fonatória e a vídeo-laringostroboscopia, bem como acompanhados quanto a possibilidade de complicações. Os autores concluíram que a injeção intracordal de gordura é um método seguro e útil no tratamento de pacientes com paralisia unilateral de pregas vocais. A partir de auto-avaliação dos pacientes, a melhora da qualidade vocal imediata após a injeção de gordura foi experimentada em todos os casos. No entanto, os autores ressaltam a imprevisibilidade da indicação exata das taxas de reabsorção do enxerto, bem como a duração dos resultados fonatórios.

Já em 2005, Hartl et al. compararam as características aerodinâmicas de 1 paciente com paralisia unilateral de prega vocal após lesão nervosa iatrogênica em cirúrgica torácica em 4 situações diferentes: antes da instalação da paralisia vocal, depois da paralisia unilateral de prega vocal esquerda e após dois tipos de cirurgia para medialização da prega vocal paralisada. O paciente foi submetido a injeção intracordal de gordura autóloga 10 dias depois da instalação da paralisia unilateral da prega vocal esquerda. O paciente foi avaliado através de vídeo-laringoscopia e medição fonatória aerodinâmica 3 dias após a injeção de gordura. Como a qualidade vocal se deteriorou nos meses seguintes, o paciente foi submetido a procedimento de tireoplastia para medializar a prega vocal esquerda 10 meses depois da injeção de gordura. A laringe foi novamente examinada através de vídeo-laringoscopia e análise fonatória aerodinâmica 2 meses depois. O tempo de fonação máxima reduziu bastante após a instalação da paralisia vocal e foi restaurado após os dois tipos de tratamento. A eficiência vocal foi

dramaticamente prejudicada após a instalação da paralisia vocal, mas apresentou também melhora após as duas formas de tratamento. Apesar do método utilizado para realizar a análise fonatória aerodinâmica não ser considerado ideal pelos autores, não foi observado nenhuma vantagem significativa entre uma técnica ou material. A injeção de gordura, ao contrário da tireoplastia, sofre os efeitos da reabsorção imprevisível.

Também em 2005, Umeno et al. realizaram análise vocal de 41 pacientes com paralisia unilateral de pregas vocais por lesão do nervo laríngeo recorrente e que foram tratados com injeção intracordal de gordura autóloga obtida através de lipossucção abdominal. A função fonatória foi analisada através de uma série de parâmetros, tais como tempo máximo de fonação, frequência fundamental, nível de pressão sonora, entre outros. A qualidade vocal foi considerada pelos autores drasticamente melhor após a injeção de gordura, e mantendo-se efetiva mesmo após 2 anos de avaliação pós-operatória.

Ainda, Murta (2005) realizou estudo experimental com procedimento de enxertia de gordura e fáscia muscular em 24 coelhos sacrificados 90 e 180 dias depois. Comparando os grupos, o autor observou que a inserção de gordura resultou em uma reação inflamatória celular maior que a inserção da fáscia muscular aos três meses, entretanto não foi significativa aos 6 meses.

Em 2005, Sasai et al. estudaram histologicamente os efeitos da injeção de gordura autóloga em 2 pacientes submetidos a laringectomia e acompanhados por 12

meses o primeiro, e o outro caso durante 41 meses. A preservação do enxerto de gordura viável foi confirmado pela resposta inflamatória mínima em todos os dois pacientes. Também, foi observado discreta formação de tecido fibrótico e ausência de sinais que pudessem sugerir necrose da gordura enxertada. Segundo os autores, a injeção de enxerto autólogo de gordura não altera a qualidade vocal até que a gordura sofra processo de absorção.

Em outro estudo experimental mais recente, Carneiro et al. (2005) avaliaram a distribuição de fibras colágenas após enxerto microcirúrgico de gordura e fâscia lata na prega vocal de coelhos através de estudo histomorfométrico utilizando técnica de microscopia óptica e coloração através do método da Picrossirius-polarização. Os autores quantificaram e compararam as fibras colágenas no músculo vocal das laringes dos coelhos que foram submetidos a enxerto unilateral de gordura ou fâscia muscular com a prega vocal contra-lateral, que foi submetida ao mesmo procedimento, com exceção da enxertia. Do total de 24 coelhos, divididos em dois grupos conforme a natureza do enxerto (gordura ou fâscia muscular), metade de cada grupo foram sacrificados após 90 e 180 dias respectivamente. Com o estudo, observaram que a fâscia lata foi envolvida como uma peça única com colágeno distribuído em fuso, contornando-a; enquanto que na gordura o colágeno a envolveu em vários blocos distintos, como se fossem unidades independentes. O grupo controle não apresentou alteração no padrão de distribuição do colágeno na lâmina própria e no tecido muscular. Os autores identificaram que a enxertia de gordura e fâscia lata na prega vocal de coelho promove maior deposição de colágeno do que no grupo controle e foi mais exuberante no enxerto

de gordura. Também observaram que não houve diferença significativa da concentração de fibras colágenas entre os períodos de 90 e 180 dias em ambos os grupos.

Em 2007, Kruschewski et al. publicaram trabalho experimental utilizando métodos de enxertia de gordura autóloga na prega vocal esquerda paralisada de 40 cães a fim de determinar as taxas de absorção 12 semanas após a enxertia. Em todos os animais houve ressecção do nervos laríngeo recorrente e vago esquerdo. Os animais foram divididos em 3 grupos de estudo que foram sacrificados 12 semanas após a intervenção, onde no primeiro grupo as pregas vocais foram submetidas a injeção de gordura autóloga; no segundo grupo, foi realizado injeção de gordura autóloga associada a insulina e; no terceiro grupo, todos os animais foram submetidos a medialização das pregas vocais com enxerto de gordura autóloga. Outros dois grupos foram considerados como controle, onde um grupo foi submetido a injeção de gordura autóloga e outro grupo em que se realizou medialização de pregas vocais com enxerto de gordura autóloga, sendo todos sacrificados imediatamente após os procedimentos. As laringes eram então removidas para análise do volume dos enxertos através de ressonância nuclear magnética. Apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas, os autores identificaram maiores taxas de absorção nos animais do grupo de injeção de gordura (82%) contra os dados encontrados nos animais dos grupos de medialização das pregas vocais com enxerto de gordura (71%) e de injeção de gordura associada a insulina (68%).

3.8 A MITOMICINA-C E SUAS APLICAÇÕES

A mitomicina-C é um antibiótico isolado do *Streptomyces caespitosus* por Wakaki et al. em 1958 que apresenta atividade antitumoral. Apresenta-se sob a forma de cristais azul-violeta, tem peso molecular de 334,3 e é solúvel em água e solventes orgânicos. Sua molécula possui três grupos reconhecidamente carcinostáticos: um anel de aziridina, o grupo quinona e o grupo octano; representada pela fórmula molecular $C_5H_{18}N_4O_5$ (figura 2). É comumente usada como quimioterápico, em aplicações endovenosas, para tratamento de corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma e tumores epiteliais, além de tumores da cavidade bucal, pulmões, intestino, pâncreas e estômago. Também, em alguns casos, é usada em tratamento anti-neoplásico por contato, principalmente em tumores da bexiga (Fonseca, 2004).

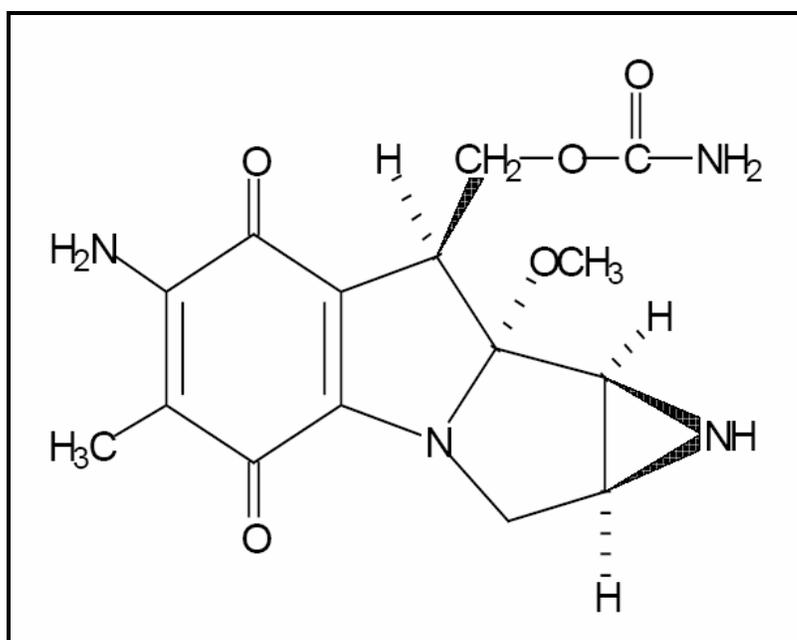


Figura 2. Esquema demonstrando estrutura molecular da mitomicina-C com seu anel deaziridina, o grupo quinona e o grupo octano.

A mitomicina-C é ativada intracelularmente através da ação de redutases que formam um agente alquilante bifuncional ou trifuncional, que estabelece ligação cruzada com o DNA, inibindo sua síntese e, em menor grau, a síntese do RNA celular. Desta maneira, a mitomicina-C inibe a divisão celular, a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, agindo sobre o processo de cicatrização, tornando-o menos intenso. Sua ação é fase inespecífica sobre o ciclo celular, sendo porém, mais ativa nas fases pós-mitótica e S da divisão celular (Korolkovas, 1997). Estas propriedades despertaram o interesse dos pesquisadores para o seu uso em procedimentos cirúrgicos nos quais o processo cicatricial intenso poderia prejudicar o resultado final.

Kunimoto e Mori (1963) descreveram pela primeira vez o uso da mitomicina-C em cirurgias oftalmológicas para o tratamento de *pterygium*, como modulador do processo de cicatrização.

Chen (1983) descreveu o seu uso para prevenir re-estenoses em cirurgias de glaucoma, sendo este uso consagrado por vários outros autores e amplamente utilizado pelos oftalmologistas nos dias de hoje na concentração de 0,4 mg/ml.

Khaw et al. (1993) estudaram o comportamento de uma cultura de fibroblastos expostos à mitomicina-C e ao 5-fluoracil. Estes autores observaram que o efeito antiproliferativo da mitomicina-C é prolongado e persiste por até 30 dias após o seu uso, período muito maior que o do 5-fluoracil. Este tempo maior de duração é desejável no

tratamento da estenose laríngea por se tratar de uma região de difícil acesso que impossibilita a aplicação repetida de drogas.

Yamamoto et al. (1990) observaram que em concentrações maiores de 0,08 mg/ml a mitomicina-C inibe 90% da proliferação *in vitro* de fibroblastos e, acima de 0,01 mg/ml possui efeito permanente.

Na Otorrinolaringologia, a mitomicina-C tem sido utilizada como droga coadjuvante no tratamento de estenoses laríngeas (Ingrams et al., 1998; Ward et al., 1998; Correa et al., 1999; Rahbar et al., 2000a,b; Sennes et al., 2003; Eliashar et al., 2004; Perepelitsyn et al., 2004; Unal, 2004; Türkyılmaz et al., 2005), nas dacriocistorrinostomias (Kao et al., 1997) e em cirurgias nasosinusais (Ingrams et al., 1998). Ainda, alguns raros trabalhos na área otorrinolaringológica foram feitos apenas experimentalmente em animais para observar cicatrizações de traumas laríngeos induzidos (Spector et al., 1999; Garret et al., 2001; Ribeiro et al., 2004; Pereira, 2006; Camargo et al., 2006), assim como para retardar a cicatrização de paracenteses da membrana timpânica, o que poderia ser usado como alternativa para a cirurgia de colocação de tubos de ventilação (Estrem et al., 1999; Estrem et al., 2000; Jassir et al., 2001; O'Reilly et al., 2001). Um trabalho ainda apresenta a possibilidade do uso tópico da mitomicina-C no saco endolinfático para tratamento da doença de Ménière (Yazawa et al., 1999).

Kao et al. (1997) utilizaram a mitomicina-C na concentração de 0,2 mg/ml após dacriocistorrinostomia e encontraram melhor resultado cirúrgico em comparação com o grupo controle.

Ingrams et al. (1998) estudaram em modelo animal o uso da mitomicina-C em cirurgias nasosinusais e constataram que a aplicação da droga em concentrações superiores a 0,4 mg/ml diminui a velocidade de fechamento de antrostomias, sem provocar lesão permanente de células ciliadas. Deste modo, a mitomicina-C poderia também ser utilizada em cirurgias endoscópicas funcionais de seios paranasais.

Ward et al. (1998) obtiveram sucesso em 5 pacientes pediátricos que apresentavam re-estenoses após reconstrução laríngea. Eram casos de difícil tratamento que haviam sido submetidos a várias intervenções cirúrgicas endoscópicas com recidiva após alguns meses. Após o tratamento endoscópico com aplicação de mitomicina-C na concentração de 0,1mg/ml, todos foram descanulados.

Correa et al. (1999) descreveram um modelo animal para o uso da mitomicina-C no tratamento de estenoses subglóticas, mostrando melhor resultado pós-operatório com o uso desta droga quando comparado com o grupo controle.

Rahbar et al. (2000a) utilizaram a mitomicina-C na concentração de 0,4 mg/ml no tratamento de 15 pacientes com estenose laríngea de diversas etiologias (pós-entubação, trauma, granulomatose de Wegener, congênita e idiopática). Em sua amostra

havia pacientes com estenoses glóticas, supraglóticas e subglóticas e com graus variados de severidade. Esses autores obtiveram alto índice de sucesso (93%), como melhora da permeabilidade da via aérea e resolução dos sintomas pré-operatórios, em todos os tipos de estenose e graus de severidade, mesmo nos casos considerados como de mau prognóstico.

Garret et al. (2001) realizaram estudo experimental em cães dos efeitos da mitomicina-C sobre o processo cicatricial da prega vocal após excisão cirúrgica da mucosa. Os autores observaram nas pregas vocais tratadas com mitomicina-C um menor número de fibroblastos e fibras colágenas na camada superficial da lâmina própria do que nas pregas vocais contra-laterais.

Sennes et al. (2003) aplicando mitomicina-C na concentração de 0,4 mg/ml após cirurgia endoscópica com laser de CO₂ no tratamento de 2 casos de estenose laríngea supraglótica obteve redução da tendência a re-estenose. Segundo os autores, a mitomicina-C mostrou-se uma droga promissora como tratamento complementar ao cirúrgico nos casos de estenose laríngea, podendo aumentar o índice de sucesso.

Pereira (2006) realizou estudo experimental com o objetivo de estudar o efeito da aplicação tópica de mitomicina-C em diferentes concentrações sobre os depósitos de colágeno total na submucosa de pregas vocais íntegras de suínos. Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle era composto por animais submetidos à aplicação de solução fisiológica 0,9% tópica; o grupo experimento I era composto por

animais submetidos à aplicação de mitomicina-C tópica na concentração de 4 mg/ml e o grupo experimento II por animais submetidos à aplicação de mitomicina-C tópica na concentração de 8 mg/ml. Após 30 dias do experimento, os animais foram sacrificados, coletado amostras das pregas vocais, coradas e analisadas histologicamente pelo método de picrossírius-polarização para a quantificação computadorizada da deposição do colágeno. Ao comparar as médias de área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais dos três grupos observaram que a mitomicina-C aplicada topicamente em pregas vocais íntegras não altera significativamente a deposição de colágeno na submucosa.

Finalmente, Camargo et al. (2006) realizaram estudo experimental para avaliar os efeitos da mitomicina-C no processo de cicatrização de pregas vocais suínas. Os animais foram divididos em dois grupos de 6 suínos cada, sendo avaliados após exérese de fragmento de mucosa de prega vocal a laser de CO₂ (um grupo com uso de mitomicina-C tópica e o outro grupo considerado controle). Após 30 dias os animais foram sacrificados, sendo coletadas amostras das pregas vocais para análise histológica, a fim de quantificar a deposição de colágeno através do método de picrossírius-polarização. Os autores observaram que a mitomicina-C usada topicamente após a exérese de fragmento de mucosa da prega vocal a laser de CO₂ em suínos, diminuiu, significativamente, a deposição do colágeno total.

Apesar da maioria dos estudos não enfocarem sobre as complicações e reações adversas após o uso da mitomicina-C tópica, como efeitos colaterais graves notou-se

aplasias medulares em doses endovenosas acima de 50mg e necroses teciduais locais quando ocorre extravasamento da droga no subcutâneo (Bradner, 2001).

Apesar das fortes evidências de que seja uma droga promissora no tratamento das estenoses laríngeas, ainda é necessário que sejam realizados estudos prospectivos com amostras maiores, com grupo controle e com maior tempo de seguimento para conclusões definitivas. Vários trabalhos na literatura demonstram sua eficácia como inibidor do crescimento tumoral, pela sua ação direta sobre o DNA (Bradner, 2001). Além disso, ainda não foram definidos a concentração e o tempo de aplicação ideal da mitomicina-C em estenoses laríngeas. Estabelecer a menor dose efetiva e com o menor risco de efeitos colaterais é importante para aumentar a eficiência e segurança do tratamento.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO PELO MÉTODO DA PICROSSÍRIUS-POLARIZAÇÃO

Em 1964, Sweat et al. com o objetivo de buscar uma substância que corasse definitivamente o colágeno, utilizaram o corante Vermelho Sírio (*Sirius Red F3BA*), associado ao ácido pícrico, denominando a solução de *picrosirius-red* e este método é utilizado desde então por diversos pesquisadores para o estudo do colágeno.

O colágeno, por ser uma proteína de natureza básica, interage provavelmente com os grupos sulfônicos do corante Vermelho Sírio a 0,1% que tem pH baixo, e também com os grupos amino da lisina e da hidroxilisina e os grupos guanidina da arginina.

O novo método foi estudado por Constantine & Mowri (1968) que levantaram dúvidas quanto a sua especificidade ao colágeno, pois algumas outras estruturas coradas não eram de colágeno. Observaram também que a solução de *picrosirius-red*, aumentava significativamente a birrefringência normal das fibras do colágeno em cortes de tecido.

Foi então que Junqueira et al. (1978) notaram que o corante *picrosirius-red* aumentava a birrefringência das fibras colágenas, quando estudadas com microscópio de polarização. Assim que se começou a associar o método de *picrosirius-red* juntamente com a microscopia de polarização, passou-se a demonstrar com maior nitidez as fibras colágenas (Santos et al., 2003). O método da *picrosirius*-polarização passou então a ser utilizado em outros estudos para identificar e quantificar o colágeno em tecidos normais (Montes et al., 1985; Lemos et al., 1997) e também em condições patológicas (Mauad et al., 1996).

É um método considerado simples e barato, bastante confiável por ser sensível, específico e de fácil reprodução (Montes & Junqueira, 1991).

O papel atribuído ao ácido pícrico na coloração do colágeno é ainda desconhecido, no entanto, quando omitido da solução corante, todos os seus componentes teciduais

ficam numa coloração vermelha, parecendo desta forma, prevenir a coloração indiscriminada das estruturas não colagenosas pelo *Sirius Red*. De acordo com Junqueira et al. (1979a,b), quando o ácido pícrico não é usado, constata-se que todas as estruturas mostram intensificação da birrefringência.

É importante assinalar que o uso da solução de *picrosirius-red*, associado à microscopia polarizada apresenta importante sensibilidade e especificidade como método simples para localizar as fibras colágenas. Toda esta especificidade se deve à reação das moléculas do colágeno ricas em aminoácidos básicos com o corante *Sirius Red* que é um corante ácido. Esta reação adiciona uma grande quantidade de moléculas do corante paralelamente às moléculas de colágeno, obtendo-se, desta forma, um aumento da birrefringência especificamente das estruturas que contêm colágeno, quando se observa o corte de tecido sob luz polarizada. Apesar do corante *Sirius Red* não se ligar especificamente aos componentes de caráter catiônico dos tecidos, o fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno (Melo et al., 2003). Desta forma, segundo Junqueira et al. (1979a,b) o método da coloração com picrosírius-polarização é bastante específico para a detecção de estruturas compostas de colágeno orientadas.

Ainda, Rabau & Dayan (1994) sugerem que as diferentes birrefringências observadas sob microscopia de polarização após o uso da solução de *picrosirius-red*, permitem uma avaliação da fase do processo cicatricial baseados na observação de que os diferentes tipos de colágeno apresentam diferentes cores e intensidades, e assim o

colágeno encontra-se esverdeado ou amarelo esverdeado em fase de cicatrização e altamente birrefringentes de cor amarelada ou avermelhada em processo fibrótico inativo.

A observação de que os colágenos dos Tipos I, II e III mostram diferentes cores e intensidades de birrefringência num mesmo corte histológico (Junqueira et al., 1978) pode ser explicada pelo fato amplamente conhecido de que estes diferentes colágenos intersticiais apresentam padrões distintos de agregação física. Esta é a razão pela qual nunca foi alegado que ocorre uma interação química diferencial entre o *picrosírius-red* e os diferentes tipos de colágeno. Assim, o colágeno tipo I que é composto por fibrilas espessas e densamente agrupadas, apresenta uma birrefringência intensa com coloração amarela, laranja ou mesmo avermelhada, e encontra-se disposto em duas camadas distintas na lâmina própria da prega vocal humana (uma camada mais superficial imediatamente abaixo do epitélio e outra mais profunda e densamente agrupada em íntimo contato com a camada muscular). Por outro lado, o colágeno tipo III é composto principalmente por fibrilas muito finas, frouxamente dispostas, que demonstram uma birrefringência fraca de coloração esverdeada ou mesmo amarelo-esverdeada e encontram-se dispostas em uma camada na lâmina própria entre as duas faixas de colágeno tipo I na prega vocal humana. Adicionalmente, estes tipos de colágeno dispostos em camadas na lâmina própria parecem formar uma entrelaçada rede de fibras. Já o colágeno tipo II não forma fibras e suas fibrilas finas estão dispostas em uma rede frouxa que interage fortemente com as glicosaminoglicanas e desta forma esse tipo de interação física resulta em uma birrefringência fraca com coloração variável, ambas

dependendo da interação das moléculas de colágeno com as glicosaminoglicanas (Hirshberg et al., 1996; Hirshberg et al., 1999; Melo, 2003).

3.10 ANÁLISE COMPUTADORIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

Uma imagem é uma representação visual de um objeto ou de um grupo de objetos. O processamento digital e a manipulação destas informações podem facilitar a análise de imagens. O processamento digital de imagens é um método específico de processamento de imagens realizado por um computador e por programa especializado. Para realizar o processamento digital de imagens com um computador, inicialmente a imagem deve ser convertida em uma forma numérica através de um processo conhecido por digitalização da imagem (Media Cybernetics, 1999).

O processo de digitalização divide uma imagem dentro de uma grade horizontal, em pequenos espaços conhecidos como “*pixels*”. Em informática, a imagem é representada por esta grade digital, também conhecida como “*bitmap*”. Cada *pixel* presente no *bitmap* é identificado por sua posição nesta grade, referenciada por sua linha (x) e coluna (y). Por convenção, os *pixels* são referenciados a partir da posição superior esquerda do *bitmap* que é considerada a posição 0,0 (linha 0, coluna 0) - (Media Cybernetics, 1999).

Quando se captura uma imagem, como uma fotomicrografia, ela é digitalizada e examinada nesta grade. A partir de então, cada *pixel* da imagem é individualizado e seu

brilho é mensurado e quantificado. Esta mensuração resulta em um valor para o *pixel* que representa o brilho da imagem naquele ponto específico. Este valor é armazenado no *pixel* correspondente da imagem digitalizada em *bitmap*. Ainda, quando esta mesma imagem é digitalizada, a largura e a altura são identificadas e fixadas. Estes dados de altura e largura são conhecidos como resolução espacial (Media Cybernetics, 1999).

Dependendo da capacidade de mensuração do sistema de captura de imagens ou da complexidade da própria imagem, pode-se estabelecer um valor de 1 a 32 *bits* para ser usado em cada *pixel*. O número de *bits* utilizado em cada *pixel* como valor representa a “profundidade do *pixel*” ou também referenciado como “*bits-por-pixel*” (BPP). O número de *bits-por-pixel* utilizado em cada valor de *pixel* determina a classe da imagem. Enquanto a profundidade do *pixel* informa a quantidade de cores que a imagem pode possuir, a classe da imagem informa a interpretação destas cores na imagem determinada pela profundidade do *pixel* (Media Cybernetics, 1999).

A classe de imagem RGB (*Red, Green, Blue*) é um método de representar a coloração de imagens bastante utilizado. O modelo de cor RGB é especialmente importante no processamento digital de imagens porque é utilizado na maioria dos dispositivos digitais de imagem atuais (por exemplo, monitores e câmeras coloridas). E foi a partir do desenvolvimento da fotografia e da televisão coloridas que se identificou que qualquer cor pode ser representada a partir de uma mistura de níveis diferentes de cores vermelha, verde e azul. No modelo RGB, uma cor é expressada em termos que definem a quantidade de luz vermelha, verde e azul contida em um *pixel*. Na classe de

imagem RGB24 cada pixel contém um valor de 24 *bits-por-pixel* e é conhecida como uma imagem “*true color*”. Cada segmento de cor possui três modelos de cores de 8 *bits*. Cada modelo representa o nível de brilho de cada canal de cor (vermelho, verde e azul). Estes valores de brilho representam níveis que podem variar dentro de uma escala de 256 níveis. Assim, uma imagem colorida de 24 *bits-por-pixel*, a cor vermelha pura pode ser representada como 255/000/000, aonde 255 representa o nível mais alto de luz vermelha possível, sem as luzes verde (000) ou azul (000). As diversas combinações de luz vermelha, verde e azul permitem definir uma série de valores de 2^{24} de cores (mais de 16 milhões de cores). A partir da popularização dos sistemas de captura digital, o programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1, passou a suportar imagens que contém coloração de 36 *bits* e 48 *bits* (Media Cybernetics, 1999). Um modelo de cor é simplesmente um modelo padrão de representar as cores através de um modelo matemático. A maioria dos modelos de cor usam um sistema de coordenadas tridimensional. No modelo de cor RGB, por exemplo, observa-se um cubo onde a cor vermelha representa a coordenada X, o azul é a coordenada Y e a cor verde é a coordenada Z. Assim, qualquer uma das 16,8 milhões de cores podem ser determinadas para um único ponto deste cubo (Media Cybernetics, 1999).

Após a captura de uma imagem pela câmera, o programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 realiza operações de mensuração a partir da posição dos *pixels* na imagem. O programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 pode utilizar uma escala de medida de *pixels* para qualquer sistema de mensuração. Pode-se calibrar a escala de medidas de modo que um *pixel* corresponde a um centímetro ou que cinco *pixels* correspondem a um centímetro

(ou polegadas, ou milhas, ou micrômetros). Valores fracionados também são permitidos (Media Cybernetics, 1999). No presente estudo, a calibração utilizada pelo sistema de captura de imagens e pelo programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 foi padronizada pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde 1,0 μm corresponde a 0,5975052301 *pixel* (figura 3).

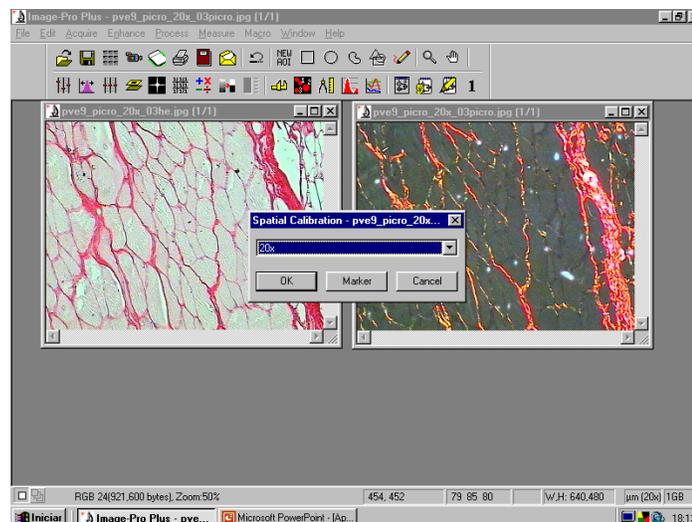


Figura 3. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando calibração do programa de análise de imagens para campo de lâmina a ser analisado sob objetiva de 20X; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

Uma das capacidades mais poderosas do programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 é a habilidade de realizar a mensuração espacial a partir de uma imagem. Pode-se realizar esta medida a partir de linhas ou polígonos definidos pelo pesquisador ou a partir da definição de um padrão de cores (macro), criando uma máscara de gradientes que irá identificar o objeto a ser estudado a partir das suas características específicas de intensidade ou cor. O programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 tem a capacidade de mensurar uma quantidade de 250.000 objetos diferentes numa mesma contagem. A

partir dos critérios estabelecidos pelo pesquisador, o programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 irá mensurar os objetos (por exemplo, colágeno) da imagem (Media Cybernetics, 1999) – (figura 4).

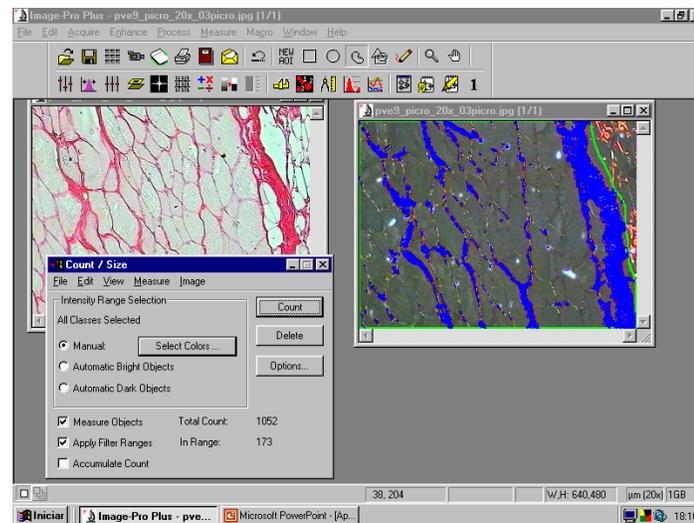


Figura 4. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando a mensuração espacial de um campo de lâmina a ser analisado a partir da criação de uma máscara de gradientes de cor azul pelo programa de análise de imagens; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

É importante ressaltar que a quantificação computadorizada, através da análise da área corada pelo *picrossirius-red* sob microscopia polarizada é um método bem estabelecido pela literatura para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam o estudo da cicatrização (Fonseca, 2003; Santos et al., 2003; Ribeiro & Borges, 2004; Varela & Grellet, 2005; Carneiro, 2005; Camargo et al., 2006).

3.11 BIOESTATÍSTICA E SUAS APLICAÇÕES

Estatística é a ciência que tem por objetivo orientar a coleta, o resumo, a apresentação, a análise e a interpretação de dados. Podem ser identificadas duas grandes áreas de atuação desta ciência: a **estatística descritiva**, envolvida com o resumo e a apresentação dos dados, e a **estatística inferencial**, que ajuda a concluir sobre conjuntos maiores de dados (populações) quando apenas partes desses conjuntos (as amostras) foram estudadas. Na verdade, mais do que uma seqüência de métodos, a estatística é uma forma de pensar ou de ver a realidade variável, já que seu conhecimento não apenas fornece um conjunto de técnicas de análise de dados, mas condiciona toda uma postura crítica sobre sua interpretação e a elaboração de conclusões sobre os dados (Callegari-Jacques, 2003).

Considera-se a **bioestatística** a aplicação dos métodos estatísticos à solução de problemas biológicos. A bioestatística, longe de ser mais uma complicação matemática, tem se mostrado um instrumento extremamente útil e poderoso na organização e na interpretação de dados. Além disso, esta ciência propicia uma avaliação adequada da variabilidade observada nos processos biológicos. É sabido que existem diferenças entre os indivíduos e que eles reagem diferentemente a estímulos idênticos; por outro lado, o mesmo indivíduo apresenta variações de um momento para outro. Em vista disso, o pesquisador deseja saber qual o grau de confiabilidade de seus resultados. A questão gira em torno da possibilidade dos resultados terem sido obtidos por acaso, ou se o novo tratamento proposto é realmente mais eficiente, ou se a associação observada entre as

variáveis é real, ou se o método de seleção dos indivíduos é adequado, ou mesmo se a análise dos dados emprega métodos adequados às variáveis estudadas. Todas essas questões podem ser respondidas com o auxílio de métodos estatísticos (Callegari-Jacques, 2003).

O papel da estatística na investigação científica vai além de indicar a seqüência de cálculos a serem realizados com os dados obtidos. No planejamento, ela auxilia na escolha das situações experimentais e na determinação da quantidade de indivíduos a serem examinados. Na análise dos dados, indica técnicas para resumir e apresentar as informações, bem como para comparar as situações experimentais. Na elaboração das conclusões, os vários métodos estatísticos permitem generalizar a partir dos resultados obtidos. De um modo geral, não existe certeza sobre a correção das conclusões científicas; no entanto, os métodos estatísticos permitem determinar a margem de erro associada às conclusões, com base no conhecimento da variabilidade observada nos resultados (Callegari-Jacques, 2003).

3.12 MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL

As medidas de tendência central são valores calculados com o objetivo de representar os dados de uma forma ainda mais condensada do que se usando uma tabela. Quando o desejo é representar por meio de um valor único, determinado conjunto de informações que variam, parece razoável escolher um valor central, mesmo que esse

valor represente uma abstração. Há várias medidas de tendência central, destacando-se a média aritmética, a mediana e a moda (Callegari-Jacques, 2003).

A **média aritmética** é a medida de tendência central mais utilizada, porque, além de ser de fácil cálculo, tem uma interpretação familiar e propriedades estatísticas que a tornam muito útil nas comparações entre populações e outras situações que envolvam inferências. Operacionalmente, a média é representada pelo quociente entre a soma de todos os valores (Σx) pelo número total dos dados (n). O resultado da média depende de cada valor da série e qualquer alteração de um deles interfere na sua medida, sendo que valores extremos influenciam no seu valor final (Callegari-Jacques, 2003; Magalhães & Lima, 2005).

A **mediana** é o valor de x , em uma série ordenada de dados, que divide a série em dois subgrupos de igual tamanho. Em outras palavras, é um valor tal que tenha igual quantidade de valores menores e maiores do que ele. É um método menos sensível a valores extremos do que a média e é difícil de determinar para grandes quantidades de dados (Callegari-Jacques, 2003; Magalhães & Lima, 2005).

A **moda** é o valor mais freqüente de uma série de valores. Quando os dados estão apresentados em intervalos de classe, costuma-se indicar o **intervalo modal**. Porém, se o pesquisador deseja estimar um valor único para a moda, pode-se usar o ponto médio do intervalo modal (Callegari-Jacques, 2003).

3.13 MEDIDAS DE DISPERSÃO OU DE VARIABILIDADE

As medidas de tendência central são insuficientes para representar adequadamente um conjunto de dados, pois nada revelam sobre sua variabilidade (Callegari-Jacques, 2003).

A medida mais simples de dispersão é a **amplitude de variação** que é a diferença entre os valores extremos. No entanto, a amplitude tem dois defeitos como medida de variação: (1) só utiliza os valores extremos, nada informando sobre os intermediários e; (2) quando avaliada em amostras, freqüentemente fornece uma subestimativa da amplitude populacional, já que dificilmente a amostra vai apresentar tanto o valor mais baixo como o mais alto da população que geralmente são os mais raros (Callegari-Jacques, 2003; Doria Filho, 1999).

Para levar em conta todos os valores observados na série, foi sugerido o uso dos desvios de cada valor em relação à média, reunindo-se tais informações em uma quantidade denominada **variância**. Quanto maior a variância de uma série, maior a dispersão dos valores que a compõem (Callegari-Jacques, 2003; Larson & Farber, 2004).

Uma dificuldade com a variância, como medida descritiva da dispersão, é o fato de não poder ser apresentada com a mesma unidade com que a variável foi medida. A solução é extrair a raiz quadrada positiva da variância, já que, com isso se volta à unidade original da variável. Essa nova medida de variabilidade é denominada **desvio-**

padrão (Callegari-Jacques, 2003). Em termos gerais, o desvio-padrão consiste em identificar a média quadrática entre os desvios em relação à média, ou seja, é o modo de representar a dispersão dos dados ao redor da média (Doria Filho, 1999). É a medida de dispersão mais utilizada nos trabalhos experimentais ou de pesquisa, buscando indicar o grau de variabilidade dos valores em torno de um valor pré-determinado (Magalhães & Lima, 2005). É interessante observar que o desvio-padrão de uma série de dados pode ter um valor numérico maior que o da média aritmética. Isso geralmente é uma indicação de que a distribuição é assimétrica (Callegari-Jacques, 2003).

Quando se analisa a mesma variável em duas amostras, pode-se comparar os desvios-padrão observados e verificar onde a variação é maior. Para comparar variabilidades, deve-se usar o **coeficiente de variação**, que é uma medida de dispersão independente da unidade de mensuração da variável (Callegari-Jacques, 2003).

Quartis são valores de x que dividem uma série ordenada de dados em quatro grupos, cada um reunindo 25% das observações. O primeiro quartil (Q1) é o valor abaixo do qual estão os 25% valores menores; o segundo quartil (Q2) é a mediana e o terceiro quartil (Q3) é o valor de x abaixo do qual estão 75% dos valores da série. A amplitude ou o desvio entre quartis é a diferença entre o terceiro e o primeiro quartis ($Q3 - Q1$). Deve-se notar que entre Q1 e Q3 estão os 50% valores mais centrais da distribuição (Callegari-Jacques, 2003; Doria Filho, 1999). Quando se descreve um conjunto de dados de distribuição assimétrica, a distância entre quartis representa melhor

a variação do que a amplitude ou o desvio-padrão, porque não é afetada pelos valores extremos (Callegari-Jacques, 2003).

3.14 TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (K-S)

As distribuições de frequências podem apresentar formas variadas. Muitas variáveis biológicas apresentam uma distribuição equilibrada, em que os valores centrais são mais freqüentes e os extremos, mais raros, sendo os valores muito baixos tão pouco freqüentes quanto os muito altos (Callegari-Jacques, 2003).

Em estatística, o **teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S)** pode ser aplicado para avaliar se o objeto estudado da amostra é oriundo de uma população com distribuição normal. O teste K-S clássico compara a distribuição real dos dados (amostra) com uma distribuição normal gerada por uma média e um desvio-padrão supostamente conhecidos (populacionais) – (Arango, 2001). É um teste de execução simples quando comparado a outros métodos, tais como o qui-quadrado, e baseado na maior diferença absoluta entre a freqüência acumulada observada e a estimada pela distribuição normal (Arango, 2001; Levine et al., 2000; Magalhães & Lima, 2005). O teste K-S também pode ser efetuado sob a suposição de que os parâmetros da normalidade são desconhecidos. Esse processo é conhecido como *probabilidades de Lillefors*. Nesse caso, os parâmetros da normalidade são estimados a partir dos dados (Arango, 2001).

3.15 TESTE “*t*” DE STUDENT

As dificuldades do emprego do desvio padrão amostral como uma estimativa de desvio-padrão no cálculo do erro padrão foram estudadas por *William Sealy Gosset* (1876-1937), pesquisador da empresa *Guinness*, famosa cervejaria de Dublin, na Irlanda. O interesse de *Gosset* nesse problema estatístico tinha fortes motivos práticos, uma vez que os métodos empregados na época eram adequados a amostras grandes, muito diferentes das pequenas com as quais tinha de trabalhar (Callegari-Jacques, 2003).

Após estudar com *Karl Pearson* no Laboratório de Biometria da Universidade de Londres, *Gosset* publicou a solução para o problema em 1908, no clássico artigo denominado “*The Probable Error of a Mean*”, para o qual adotou o pseudônimo de *Student*. Nesse artigo, propôs que, quando o desvio-padrão fosse desconhecido, que se substituísse o valor crítico obtido na curva normal pelo valor crítico de uma nova distribuição, a qual foi chamada de **distribuição *t*** e posteriormente aperfeiçoada por *R.A. Fisher*, em 1926 (Callegari-Jacques, 2003).

O teste *t de Student* é provavelmente o método mais utilizado para comparar as diferenças entre as médias de dois grupos (Arango, 2001; Doria Filho, 1999). O teste *t* pode ser usado mesmo que as amostras sejam pequenas desde que seja admitido que as populações que deram origem às amostras tenham distribuição normal e variabilidades não significativamente diferentes (Arango, 2001). Para conduzir o teste *t*, além das amostras terem uma distribuição normal, devem ser selecionadas ao acaso (Larson &

Farber, 2004). Duas amostras são independentes se a amostra selecionada em uma população não estiver relacionada com a amostra selecionada em uma segunda população. As duas amostras são dependentes ou pareadas se cada membro de uma amostra corresponder a um membro da outra (Larson & Farber, 2004). Uma amostra pareada corresponde ao levantamento de dados da mesma amostra em duas situações nas quais tenha interferido algum fator cujo efeito quer-se avaliar (Arango, 2001). O teste t usa a diferença entre as médias dos dois grupos e o erro padrão das diferenças das médias entre os dois grupos (Doria Filho, 1999).

3.16 TESTES DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

Quando dados de vários grupos estão sendo combinados, a variância tem dois componentes. Se os grupos têm médias diferentes, alguma variação provém das diferenças entre as médias dos grupos, e o restante da variação provém das diferenças no interior de cada grupo. O problema está em reconhecer se algum, ou alguns, desses grupos são significativamente diferentes uns dos outros. Poderiam os grupos ser comparados, dois a dois, somente por meio de testes t separados, o que poderiam revelar uma diferença significativa. Como se estariam fazendo múltiplas análises, poder-se-ia estar incorrendo num erro tipo I (rejeitar hipótese nula verdadeira) ao aceitar 5% de erro em cada uma das análises separadas, havendo uma chance maior de se encontrar, por mero acaso, uma diferença estatisticamente significativa (Doria Filho, 1999).

Os testes de análise de variância (*ANOVA – ANalysis Of VAriance*) são uma poderosa técnica estatística desenvolvida por *Ronald A. Fisher* em 1918 e publicada em 1925 no livro “*Statistical Methods for Research Workers*” (Callegari-Jacques, 2003). O uso dos testes *ANOVA* indicará a probabilidade de que a hipótese nula seja verdadeira, ou seja, a probabilidade de que nenhuma diferença existe entre quaisquer dos grupos. Os testes *ANOVA* se apóiam na hipótese de que os grupos são semelhantes, a variância em cada um (dentro) dos grupos é similar àquela entre os grupos. O testes *ANOVA* comparam a variabilidade das médias de todas as amostras com a variabilidade dentro das amostras (Doria Filho, 1999). Como os testes *ANOVA* servem para comparação de três ou mais médias populacionais, podem ser considerados uma extensão do teste *t*, para o caso de mais de dois grupos ou classificações (Arango, 2001).

Para que os resultados dos testes *ANOVA* sejam válidos, é necessário que as variâncias amostrais sejam semelhantes nas diferentes amostras. Além disso, os valores encontrados devem ter uma distribuição normal (Callegari-Jacques, 2003). Para cumprir essa análise, os testes *ANOVA* precisam determinar a variabilidade dentro de cada amostra, bem como a variabilidade que existe entre as médias das amostras (Doria Filho, 1999). Quando isso é feito, é gerada uma estatística chamada **F – Snedecor**. Quanto maior for a estatística *F* (razão *F*), maior será a variação entre os grupos em relação à variação dentro dos grupos e, conseqüentemente, maior a probabilidade de rejeitar a hipótese nula e aceitar a hipótese experimental (Doria Filho, 1999; Larson & Farber, 2004). Usando-se o valor obtido para a estatística *F* e o número de graus de liberdade apropriado, obtém-se o correspondente valor de *p* por meio das tabelas de *F*, as quais são

construídas uma para cada valor de p e fornecem um valor de F em função dos graus de liberdade (Doria Filho, 1999). O cálculo dos graus de liberdade, neste caso, é mais complexo pois ele precisa combinar o número de graus de liberdade entre os grupos (numerador) com aquele intra-grupos (denominador) - (Arango, 2001; Doria Filho, 1999; Larson & Farber, 2004).

Felizmente, os testes *ANOVA* são procedimentos estatísticos robustos e que fornecem resultados confiáveis, desde que os tamanhos amostrais sejam iguais ou aproximadamente iguais. Também são razoavelmente robustos ainda que a variável em estudo tenha uma distribuição bastante desviada da normal, especialmente se os n são grandes. Se, no entanto, os dados se afastam excessivamente das pressuposições já indicadas, a solução é usar uma transformação nos dados ou um teste não-paramétrico (Callegari-Jacques, 2003).

Freqüentemente, os testes para análise de variância são referidos como *one-way* ou *two-way* e com ou sem repetição (*repeated measures*) - (Doria Filho, 1999).

O teste *one-way ANOVA* testa a hipótese nula de que todas as populações tem médias idênticas contra a hipótese alternativa de que uma ou mais das médias das populações difere das demais (Doria Filho, 1999; Larson & Farber, 2004). O termo *one-way* significa que os elementos foram categorizados de um único modo (Doria Filho, 1999).

Quando for necessário testar o efeito de duas variáveis independentes ou fatores, sobre uma variável dependente, pode-se usar um teste *two-way ANOVA* (Larson & Farber, 2004). O termo *two-way* indica que os elementos foram categorizados de dois modos (Doria Filho, 1999). Um teste *two-way ANOVA* possui três hipóteses nulas – duas para cada efeito principal e uma para o efeito de interação. Um efeito principal é aquele de uma variável independente sobre a variável dependente e o efeito de interação é o efeito de ambas as variáveis independentes sobre a variável dependente (Larson & Farber, 2004).

A diferença entre *ANOVA* e *ANOVA com repetição* é a mesma que existe entre teste *t* e teste *t* com emparelhamento. Deve-se usar *ANOVA* com repetição em três circunstâncias: (1) as medidas são feitas repetidamente no mesmo elemento, como por exemplo: antes, durante e após tratamento; (2) as medições são feitas em grupos emparelhados, e; (3) as medidas são feitas em um experimento de laboratório repetido em diferentes ocasiões (Doria Filho, 1999).

O testes *ANOVA* informam somente se há ou não uma diferença estatisticamente significativa entre dois ou mais grupos, mas não informa quais os grupos envolvidos. Para identificar os grupos, deve-se realizar uma comparação entre pares – *pair wise comparison test* – que irá comparar cada grupo com cada um dos outros. Há pelo menos sete testes diferentes capazes de realizar essa análise e que diferem entre si pela capacidade de reduzir tanto o erro tipo I quanto o erro tipo II. O estatísticos divergem quanto à escolha do teste mais apropriado em cada situação: testes de *Tukey* (HSD), de

Fisher – pair wise, de *Duncan*, de *Scheffé*, de *Bonferroni*, de *Newmann-Keuls* e de *Dunn* (Arango, 2001; Doria Filho, 1999; Larson & Farber, 2004).

3.17 TESTE DE TUKEY (HSD)

O teste de *Tukey* ou **HSD** (*Honestly Significant Difference*) foi proposto pelo estatístico *John Tukey*, sendo empregado para se determinarem as diferenças significantes entre as médias de todos os grupos analisados no teste *ANOVA*, tomadas duas a duas (Arango, 2001). O teste de *Tukey* é um complemento ao teste *ANOVA* e visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si. O método de *Tukey* protege os testes de um aumento no nível de significância devido ao grande número de comparações efetuadas (Callegari-Jacques, 2003).

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

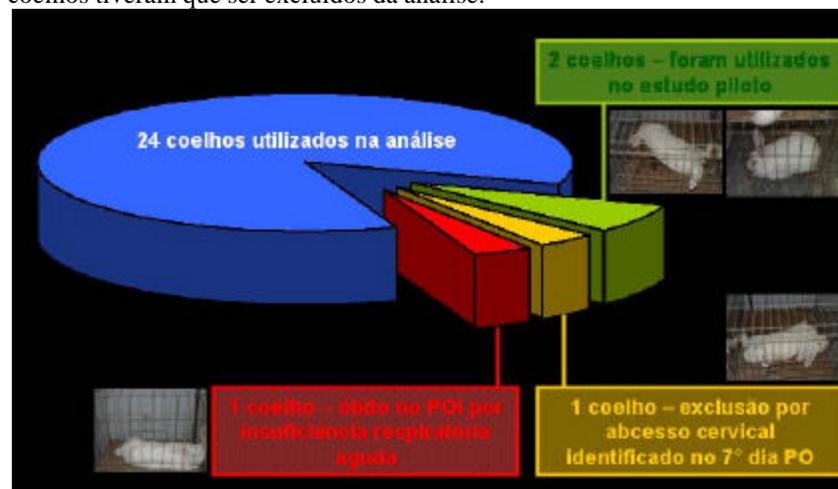
Após a análise e aprovação da pesquisa pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa 469/05) – (**anexo A**) -, foram estudados 28 coelhos albinos da raça *New Zealand*, todos saudáveis e do sexo masculino, com massa corporal entre 2500g e 3500g (média de 2900g), submetidos a micro-cirurgia para enxertia de gordura autóloga em ambas pregas vocais com e sem aplicação de mitomicina-C previamente. Os animais estavam numerados utilizando marcas nas orelhas e alojados cada animal em uma gaiola comum de biotério apropriada.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Do total da amostragem operada, restaram 24 animais que foram utilizados no estudo: dois coelhos foram utilizados para o estudo piloto, um coelho sofreu óbito no

pós-operatório imediato por insuficiência respiratória aguda e um coelho foi excluído do estudo por ter sido identificado formação de abscesso cervical no sétimo dia de pós-operatório (gráfico 1). Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos de estudo, cada um deles com 6 coelhos. Em cada grupo (G1, G2, G3 e G4), os coelhos foram submetidos à implante de gordura autóloga após a aplicação tópica de solução de mitomicina-C a 0,4mg/ml na prega vocal direita. Nos quatro grupos citados, a prega vocal esquerda foi considerada como “controle”, pois foi submetida ao mesmo procedimento com colocação do enxerto de gordura sem a aplicação tópica de solução de mitomicina-C.

Gráfico 1. Gráfico esquemático demonstrando a distribuição dos 28 coelhos operados: 24 coelhos foram utilizados no presente estudo enquanto outros 4 coelhos tiveram que ser excluídos da análise.



Todos os procedimentos cirúrgicos e os cuidados pós-operatórios imediatos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Otorrinolaringologia (LIM-32) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) entre o período de 06 de agosto de 2005 até 14 de abril de 2006. Após a intervenção cirúrgica,

os animais foram encaminhados para o biotério da Granja RG, localizado na cidade de Suzano/SP, com supervisão de zootecnistas e veterinários, onde permaneceram com cuidados diários de alimentação e submetidos a temperatura ambiente controlada (figura 5) até serem sacrificados com injeção endovenosa de 2,0ml de cloreto de potássio (KCl) a 20% conforme a distribuição dos grupos.



Figura 5. Imagem que demonstra o ambiente e instalações de cuidados pós-operatórios sob a supervisão de zootecnistas e veterinários na granja RG em Suzano/SP

Os coelhos do grupo **G1** foram sacrificados com **7 dias** após o procedimento; os coelhos do grupo **G2** foram sacrificados após **14 dias**; os coelhos do grupo **G3** foram sacrificados após **30 dias**; e os coelhos do grupo **G4** foram sacrificados após **90 dias** do procedimento cirúrgico. Após o sacrifício dos animais de cada grupo (G1, G2, G3 e G4), as pregas vocais de cada coelho foram distribuídas em dois sub-grupos (PVD e PVE), sendo que as pregas vocais direitas foram separadas no sub-grupo **PVD(n)** e as pregas vocais esquerdas separadas no sub-grupo **PVE(n)**, onde “**n**” representava o número do animal conforme a seqüência de sacrifício (tabela 1).

Tabela 1. Formação de grupos e sub-grupos de estudo.

GRUPOS	COELHOS (n)	SUB-GRUPOS	SACRIFÍCIO
G1	6	PVD PVE	7 dias
G2	6	PVD PVE	14 dias
G3	6	PVD PVE	30 dias
G4	6	PVD PVE	90 dias

4.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Todos os coelhos foram alojados em gaiolas comuns com piso ripado para coleta de dejetos, dotada de bebedouro e comedouro manual com ração padrão sem privação antes e após o procedimento.

4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE MITOMICINA-C

A solução de mitomicina-C utilizada foi a da marca Mitomicin® (produzida pelo laboratório *Bristol-Myers-Squibb*®, Brasil/EUA) em embalagem contendo 5mg de mitomicina-C em cada ampola sob a apresentação de pó liofilizado para solução injetável e preparada numa concentração de 0,4mg/ml momentos antes da sua aplicação tópica (figura 6). Esta concentração de mitomicina-C foi escolhida baseada na literatura a fim de evitar complicações no campo cirúrgico, como por exemplo, necrose (Chen, 1983; Brujin et al., 1992; Garret et al., 2001; Rahbar et al., 2000a,b; Jassir et al., 2001; Bradner, 2001).



Figura 6. Imagem que demonstra o frasco de solução injetável de mitomicina-C (5mg) utilizada para aplicação tópica (0,4mg/ml) na prega vocal dos coelhos

4.5 TÉCNICA CIRÚRGICA

4.5.1 Anestesia dos coelhos

Todos os animais foram anestesiados pelo pesquisador com solução de Xilazina (laboratório *Vetbrands*[®], Brasil) – dose 5mg/kg – associada a solução de Quetamina (laboratório *Vetbrands*[®], Brasil) – dose 50mg/kg – por via intramuscular. Foram mantidos em ventilação espontânea, sem necessidade de cânula traqueal.

4.5.2 Posicionamento dos coelhos

Após a anestesia os animais foram posicionados em decúbito dorsal, fixos à mesa cirúrgica pelas quatro patas, sendo que as patas dianteiras foram mantidas ao longo do corpo e isolados por campo cirúrgico estéril. .

4.5.3 Abordagem da laringe

Em todos os coelhos realizou-se tricotomia na região cervical anterior, estendendo-se desde a mandíbula até a fúrcula esternal, seguida por antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 10% (PVPI-tintura). Todos os coelhos receberam uma incisão na linha média, a partir da margem superior da cartilagem tireóidea até a borda inferior da cartilagem cricóidea, com bisturi lâmina 15, na pele e subcutâneo, para expor as cartilagens tireóidea e cricóidea (figura 7).



Figura 7. Imagem que demonstra a incisão na pele e subcutâneo do coelho com identificação dos planos musculares

4.5.4 Preparo e obtenção do enxerto de gordura

Subseqüentemente, em todos os coelhos foi exposta a gordura subcutânea e removido um fragmento de aproximadamente 1,0 X 1,0cm da mesma. Este fragmento de

gordura foi mantido em solução fisiológica a 0,9% numa cúpula sob temperatura ambiente até o momento de sua utilização como enxerto.

4.5.5 Aplicação da solução de mitomicina-C e inserção do enxerto de gordura

Todos os coelhos foram submetidos a intervenção cirúrgica pelo pesquisador utilizando auxílio de microscópio cirúrgico (marca *Storz* modelo MC-M92, lente de 200mm, binocular angulada, ocular de 12,5X, Alemanha; com iluminação por fibra óptica e fonte de luz halógena de 15V e 150W) e com material microcirúrgico apropriado (marca *Factory*[®], Brasil). A cartilagem tireóidea foi incisada anteriormente na linha média com bisturi lâmina nº 15 (marca *Solidor*[®], Brasil) permitindo a exposição das pregas vocais e a membrana cricotireóidea foi aberta também na linha média, permitindo desta forma a visualização da subglote (figura 8).

A prega vocal direita foi submetida à incisão longitudinal de 1,0mm de extensão a 0,5mm da borda livre. Realizou-se descolamento cuidadoso da mucosa ao longo da margem medial se estendendo também em direção inferior à sub-glote com esculpador de Holleback 3s (marca *Factory*[®], Brasil) que é um instrumento comumente empregado na Odontologia. Dessa forma, foi confeccionado um bolsão na direção do eixo longitudinal da prega vocal, utilizando-se o músculo tireoaritenóideo como principal referência (Sataloff et al., 1997; Duprat et al., 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005). Foi tomado todas as precauções com movimentos delicados e minuciosos no

sentido de evitar a penetração do músculo tireoaritenóideo e a ruptura da mucosa. Na incisão e bolsão realizados na prega vocal direita foi aplicado topicamente fragmento de cotonóide estéril (modelo *Codman* 80-1408, marca *Johnson & Johnson*® *Professional*, EUA) medindo aproximadamente 3,0 X 1,0mm embebido em solução de mitomicina-C na concentração de 0,4 mg/ml durante 5 minutos (figura 9). A prega vocal esquerda foi protegida com fragmento de cotonóide estéril durante este momento para se evitar a contaminação da mesma com solução de mitomicina-C.



Figura 8. Imagem que demonstra o uso de microscópio para manipulação cirúrgica da laringe dos coelhos

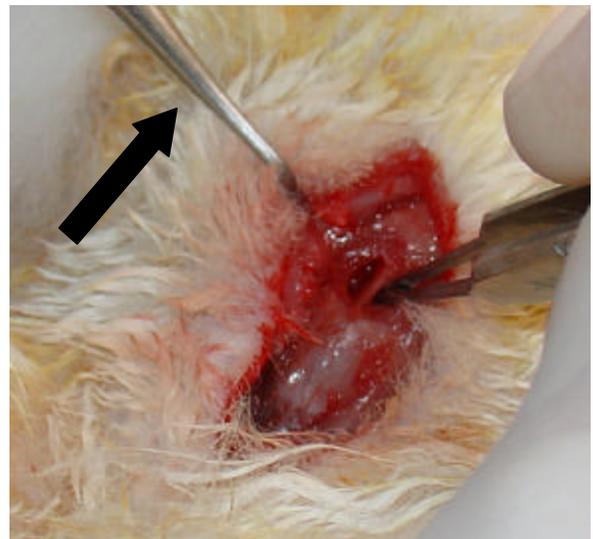


Figura 9. Manipulação microscópica da laringe que permite acessar a prega vocal direita através do descolamento de bolsão com esculpador de Hollemback (seta) para permitir a aplicação de solução tópica de mitomicina-C e a introdução do enxerto de gordura

Em seguida, após a contagem com cronômetro (marca *Supermedy*®, Brasil) de exatos 5 minutos de aplicação tópica de solução de mitomicina-C, o enxerto de gordura, medindo aproximadamente 3,0mm de diâmetro e 1,0mm de espessura (confeccionado com paquímetro da marca *Factory*®, Brasil) foi posicionado no bolsão dissecado entre o

músculo tireoaritenóideo e a mucosa. A prega vocal direita foi então limpa com fragmento de cotonóide embebido com solução fisiológica a 0,9% para evitar que a prega vocal esquerda fosse exposta ao contato com mitomicina-C residual.

Após a retirada do cotonóide, foi realizado o mesmo procedimento na prega vocal esquerda mas sem a aplicação tópica de solução de mitomicina-C previamente (figuras 10 e 11). As incisões das pregas vocais direita e esquerda não foram suturadas. O fechamento da cartilagem tireóidea e da membrana cricotireóidea foi com sutura de fio categute 4-0 (marca *Polysuture*[®], Brasil) com pontos separados; enquanto que o tecido subcutâneo foi suturado com fio categute 2-0 (marca *Polysuture*[®], Brasil) e a pele com fio mononylon 5-0 (marca *Shalon*[®], Brasil), também com pontos separados.

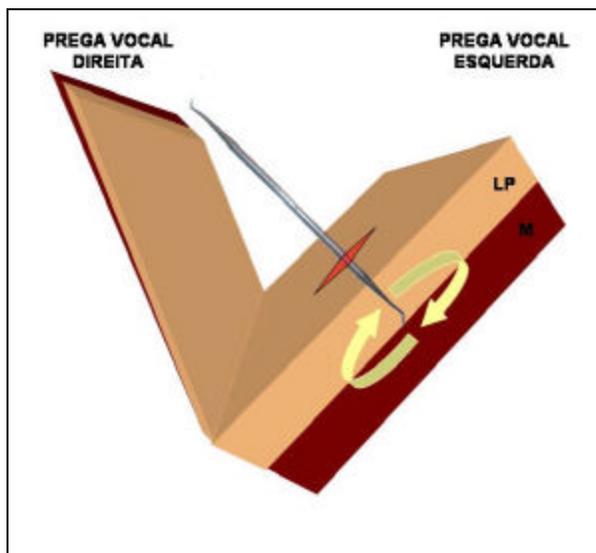


Figura 10. Demonstração do descolamento de bolsão com escultidor de Holleback entre a lâmina própria (LP) e o músculo tireoaritenóideo (M) em desenho esquemático da prega vocal esquerda

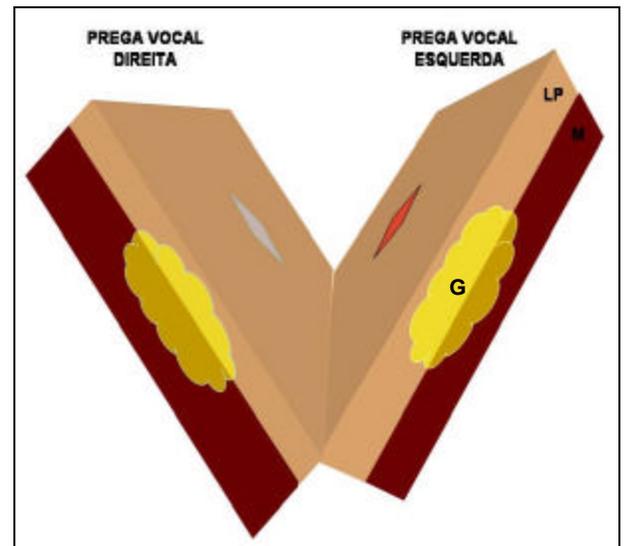


Figura 11. Demonstração esquemática onde se observa o enxerto de gordura (G) introduzido entre a lâmina própria (LP) e o músculo tireoaritenóideo (M) na prega vocal direita (com mitomicina-C) e na prega vocal esquerda (sem mitomicina-C)

4.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Todos os animais operados foram mantidos vivos em gaiolas comuns sob temperatura ambiente controlada, com cuidados diários e controle da ferida cirúrgica sob a supervisão de veterinários e zootecnistas, bem como do pesquisador. Os coelhos receberam antibioticoterapia com Benzilpenicilina procaína 300.000UI e Benzilpenicilina potássica 100.000UI (laboratório *Bristol-Myers-Squibb*[®], Brasil/EUA), diluídas em 3,0ml de água destilada e aplicados 0,4ml por via intramuscular por dose. A primeira dose foi aplicada durante o procedimento cirúrgico, e as outras doses a cada 24 horas, totalizando 5 dias de antibioticoterapia.

4.7 ISOLAMENTO DA PREGA VOCAL

Após anestesia com Xilazina (laboratório *Vetbrands*[®], Brasil) – dose 50mg/kg –, todos os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de KCL conforme a distribuição dos grupos (G1 = 7 dias, G2 = 14 dias, G3 = 30 dias e G4 = 90 dias de pós-operatório). O pesquisador realizou uma incisão cervical anterior e retirou a laringe em um bloco único que se estendia desde a base da língua até o quinto ou sexto anel traqueal. As peças foram dissecadas, removendo-se as partes moles e desta forma isolando todo o tecido da laringe. A seguir, a laringe foi aberta, com incisão longitudinal posterior, entre as cartilagens aritenóideas. A cartilagem tireóidea, prega vocal e aritenóide de uma hemilaringe foram ressecadas em bloco, entre o ventrículo

laríngeo e a sub-glote. Por fim, foram isoladas as pregas vocais, direita e esquerda, entre a comissura anterior e o processo vocal da cartilagem aritenóidea.

4.8 PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS

Todas as peças medindo cerca de 0,5 X 0,5cm foram fixadas em formalina a 10% por um período de 24 horas e na seqüência colocadas em cassetes próprios após identificação com o número do animal e a origem anatômica da amostra [prega vocal direita – PVD(n) e prega vocal esquerda – PVE(n)] – (figura 12).

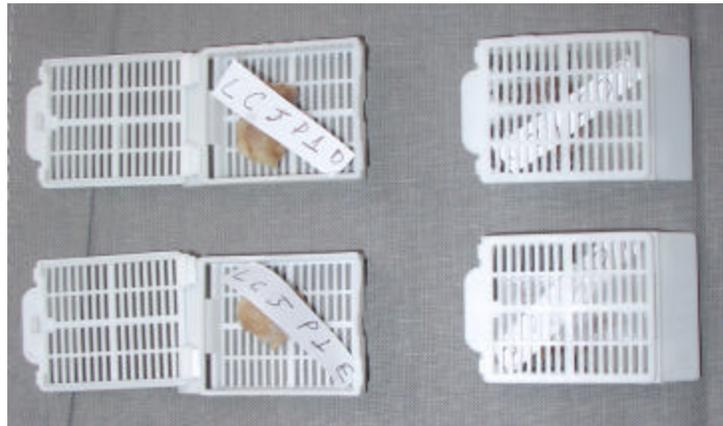


Figura 12. Imagem que demonstra os cassetes com as peças fixadas em formalina após a identificação dos coelhos e a origem anatômica da amostra (prega vocal direita ou esquerda)

As peças foram então encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para o devido processamento. Neste laboratório foram desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas com xilol, impregnadas com parafina fundida em estufa a 60°C e incluídas. Após realizada a inclusão em parafina quente, os blocos foram cortadas com auxílio de

micrótomo em lâminas com espessura de 3 μ m. Todos os cortes iniciais foram sempre na porção média da porção membranosa de cada prega vocal. Em ambas pregas vocais, os cortes seriados foram realizados em direção a comissura anterior e ao processo vocal. Os cortes de tecido foram corados com técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e *Sirius Red* (figura 13).

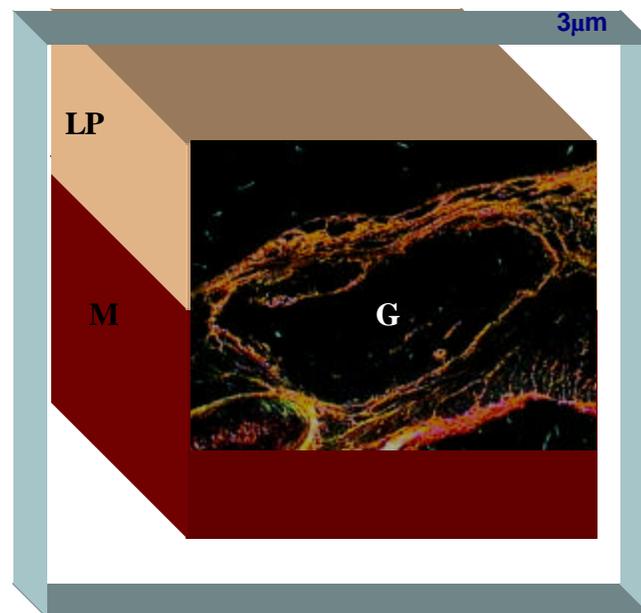


Figura 13. Esquema demonstrando a confecção do bloco de parafina a partir do qual eram cortadas lâminas com espessura de 3 μ m e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e *Sirius Red*; (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tireoartenóideo; (G) = enxerto de gordura; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 50X

O número total de lâminas para cada animal foi bastante variável. Tanto a prega vocal direita quanto a prega vocal esquerda foram preparadas de acordo com a identificação pelo pesquisador do enxerto presente nos cortes. As lâminas foram identificadas apenas com uma codificação conforme a sua origem [prega vocal direita –

PVD(n) e prega vocal esquerda – PVE(n)] – onde (n) representa o número do coelho sacrificado.

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05) entre junho de 2006 até maio de 2007. O método da picrossírius-polarização foi utilizado para a visualização e análise das fibras colágenas. Este método consiste na coloração pela técnica com corante *Sirius Red* dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado e a análise das lâminas foi realizada sob microscopia de luz com polarização óptica (marca *Leica*[®], Alemanha). Após a identificação do enxerto de gordura na área corada pelo *picrossirius-red* foi realizada a polarização. O colágeno foi corado em tons de amarelo, laranja e vermelho, enquanto que todas as outras substância adquirem uma coloração aproximada do preto (figura 14).

A partir das imagens encontradas foi realizada uma análise descritiva pelo pesquisador dos quatro grupos quanto a identificação do enxerto de gordura, a distribuição do colágeno em torno do enxerto e sua relação com a lâmina própria e a estrutura muscular adjacente.

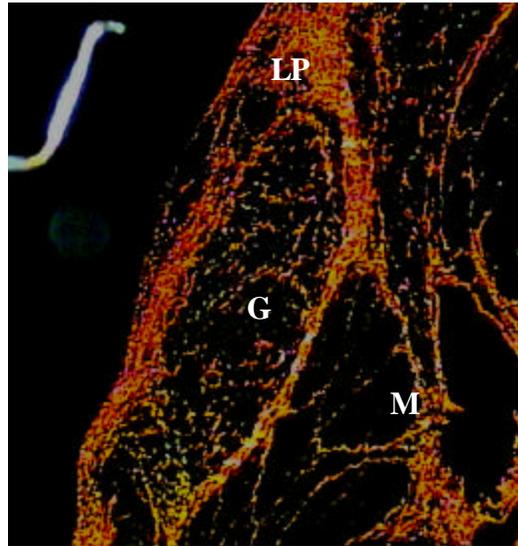


Figura 14. Fotomicrografia demonstrando corte da prega vocal esquerda com enxerto de gordura visualizada sob luz polarizada onde as fibras colágenas adquirem coloração amarela, laranja e vermelha; (LP) = lâmina própria; (G) = enxerto de gordura; (M) = músculo tireoaritenóideo; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 50X; grupo G2 (sacrifício com 14 dias)

4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O pesquisador realizou um estudo morfométrico com a quantificação das fibras colágenas (tipos I e III) com o auxílio de sistema digital de análise de imagens e o programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.1 (para *Windows*[®], Media Cybernetics S/N 41N41000-26671, EUA), e desta forma foi determinada a concentração do colágeno por unidade de área medida. Foram analisadas sempre amostras de ambas pregas vocais direita e esquerda de cada coelho para obtenção dos valores da concentração de colágeno e comparadas entre si.

As medidas da concentração de fibras colágenas foram realizadas no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05) entre junho 2006 até outubro de 2007. O sistema digital de análise de imagens é composto por uma câmera digital (modelo TK-C1380, marca JVC[®], Japão), acoplada a um microscópio (modelo *Leica[®] DMR*, marca *Leica[®] M-System, Wetzlar, Hessen, Alemanha*) que envia as imagens para um monitor (modelo Triniton, marca *Sony[®]*, Japão) – (figura 15).

Após a captura de uma imagem pela câmera, o programa *Image-Pro Plus[®]* versão 4.1 realiza operações de mensuração a partir da posição dos *pixels* na imagem. Pode-se calibrar a escala de medidas do programa *Image-Pro Plus[®]* versão 4.1 de modo que um *pixel* corresponde a um centímetro ou que cinco *pixels* correspondem a um centímetro (ou polegadas, ou milhas, ou micrômetros) de acordo com a necessidade do estudo.



Figura 15. Imagem demonstrando microscópio acoplado a câmera digital e sistema de análise do Laboratório de Imagens e Morfometria (LIM-05)

No presente estudo, a calibração utilizada pelo sistema digital de análise de imagens e pelo programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 foi padronizada pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde $1,0\ \mu\text{m}$ corresponde a $0,5975052301\ \text{pixel}$ (figura 16).

$$1,0\ \mu\text{m} = 0,5975052301\ \text{pixel}$$

Figura 16. Calibração do sistema digital de análise de imagens e do programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1

As cores que representam as fibras colágenas foram selecionadas através do programa *Image-Pro Plus*® versão 4.1 (figura 17) para quantificação e somatória da área selecionada (μm^2).

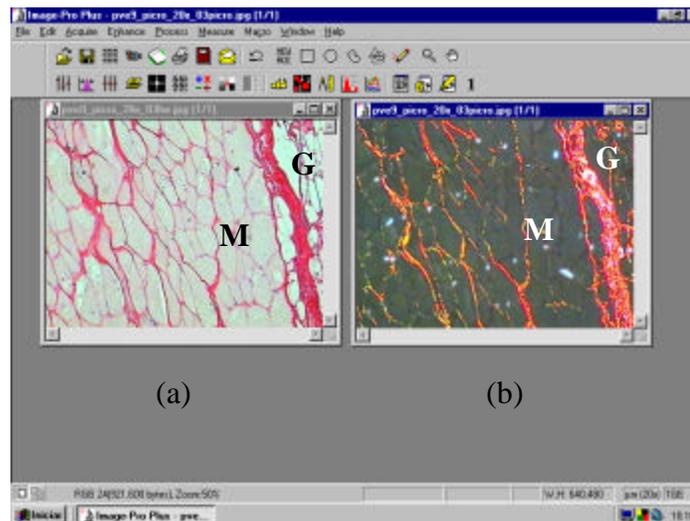


Figura 17. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando campo de lâmina a ser analisado: (a) o campo da esquerda pelo método de *picrosirius-red* sem polarização; e (b) o campo da direita pelo método de *picrossírius-polarização* com as fibras colágenas coradas em amarelo, laranja e vermelho; (G) = enxerto de gordura; (M) = músculo tireoaritenóideo; aumento de 200X

Assim, este programa permitiu, por meio do estabelecimento de um padrão de cores (macro), criar uma máscara de gradiente, a partir do qual o computador reconheceu o substrato do estudo (fibras colágenas do tipo I e III) e desta forma forneceu a **área total ocupada pelo colágeno (μm^2)** para o respectivo campo analisado (figura 18).

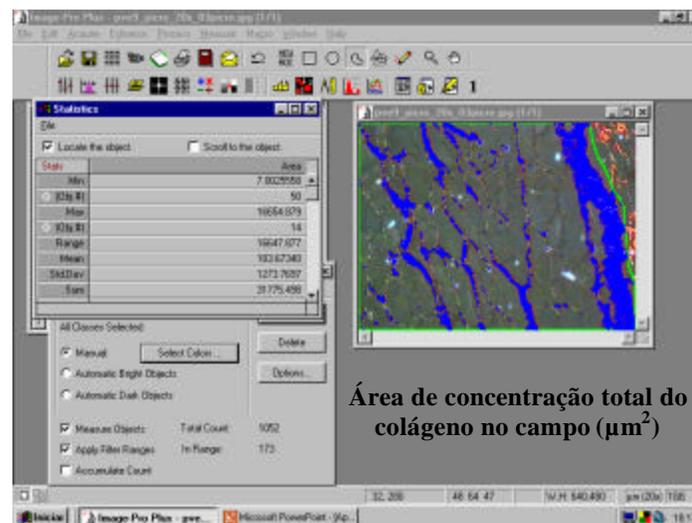
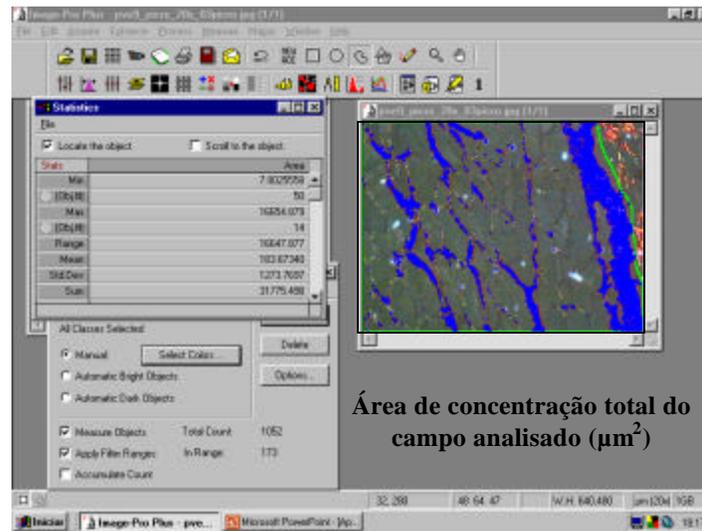


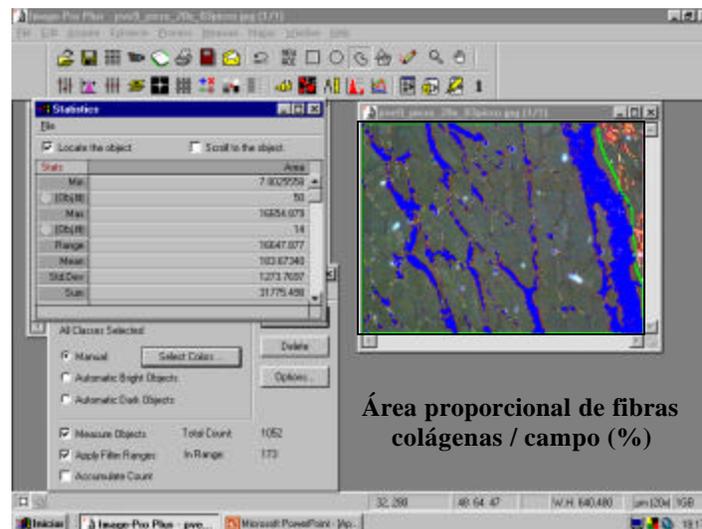
Figura 18. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando campo de lâmina a ser analisado utilizando máscara (cor azul) estabelecida para identificar as fibras colágenas e calcular a área ocupada pelas mesmas (μm^2); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

A partir do mesmo programa, foi criada uma nova máscara de gradiente de cores (azul) e calculado a **área total de cada campo (μm^2)** - (figura 19) - e a partir destes valores obter a **área fracional ou proporcional de fibras colágenas (%)** para cada campo analisado (figura 20).



Área de concentração total do campo analisado (μm^2)

Figura 19. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando utilização de máscara (cor azul) estabelecida para calcular a área total do campo analisado (μm^2); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X



Área proporcional de fibras colágenas / campo (%)

Figura 20. Imagem capturada do monitor do sistema de análise digital demonstrando o cálculo da área fracional ou proporcional de fibras colágenas / campo analisado (%); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

Todas as lâminas receberam uma codificação e foram analisadas de maneira cega pelo pesquisador. Foram também estabelecidas padronizações de intensidade de luz do

microscópio, da abertura do diafragma e da altura do condensador a fim de evitar qualquer tipo de viés durante a análise das lâminas.

Tanto na prega vocal direita quanto na prega vocal esquerda, todos os campos (sob método da picrossírius-polarização em aumento de 200X) que eram visualizados circundando o enxerto de gordura foram analisados tanto adjacente ao músculo quanto a lâmina própria (figura 21). Foram analisados e medidos no mínimo cinco campos por lâmina ou até se esgotarem os campos em que se identificava a presença do enxerto pelo pesquisador.

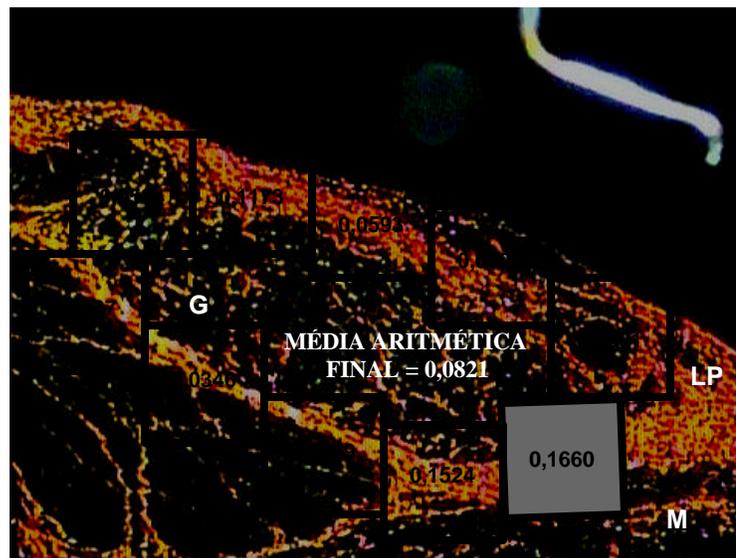


Figura 21. Fotomicrografia sob método de coloração por picrossírius-polarização (aumento de 50X) demonstrando a análise dos campos (aumento de 200X) em torno do enxerto com a medida da área proporcional de fibras colágenas por campo (%), através do qual se obtém a média aritmética final da concentração proporcional de colágeno para o enxerto (%); onde: (LP) = lâmina própria; (G) = gordura e; (M) = músculo tireoaritenóideo

Os dados morfométricos obtidos de cada prega vocal analisada foram tabulados no programa *Microsoft Excel*[®] (EUA) separando-se os quatro grupos de estudos (G1, G2, G3 e G4), bem como conforme a origem de cada prega vocal (PVD e PVE).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foram formados 4 grupos, compostos de 6 coelhos em cada grupo e totalizando uma série de 12 pregas vocais por grupo. Em todos os grupos, os coelhos foram submetidos a microcirurgia para enxerto de gordura nas pregas vocais direita e esquerda. A prega vocal direita sempre recebeu aplicação tópica de solução de mitomicina-C a 0,4mg/ml enquanto a prega vocal esquerda sempre foi considerada como “controle” sem a aplicação de mitomicina-C. Os coelhos do primeiro grupo foram sacrificados com 7 dias, os do segundo grupo com 14 dias, enquanto que os coelhos do terceiro grupo com 30 dias e os do quarto grupo com 90 dias. A análise estatística foi realizada entre outubro de 2007 até fevereiro de 2008, e submetida a nova revisão em outubro de 2008 sempre sob supervisão de profissional especializado em Matemática e Bioestatística.

A partir dos dados das médias aritméticas dos valores de área proporcional de fibras colágenas (%) obtidos nos campos de cada lâmina foi realizado o **teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov**. Em estatística, este teste pode ser aplicado para avaliar se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal. É um teste de execução simples quando comparado a outros

métodos, tais como o qui-quadrado, e baseado na maior diferença absoluta entre a frequência acumulada observada e a estimada pela distribuição normal (Levine et al., 2000; Magalhães & Lima, 2005).

Foram utilizados a **média** e a **mediana** como medidas de tendência central e o **desvio-padrão** como medida de dispersão. A média é um elemento representativo de série mais usado, procurando uniformizar os dados em torno do valor médio. Operacionalmente, a média é o quociente entre a soma de todos os valores ($\sum x$) pelo número total dos dados (n). A média depende de cada valor da série e qualquer alteração de um deles interfere na sua medida, sendo que valores excepcionais influenciam no seu valor final. A mediana é uma medida de tendência central que divide a série ordenada (crescente ou decrescente) exatamente ao meio, ou seja, em duas partes iguais, onde 50% antecedem e 50% da distribuição sucedem seu valor. É um método menos sensível a valores extremos do que a média e é difícil de determinar para grandes quantidades de dados. A mediana é uma medida mais adequada para distribuições muito assimétricas. O desvio-padrão consiste em identificar a média quadrática entre os desvios em relação à média. É a medida de dispersão mais utilizada nos trabalhos experimentais ou de pesquisa, buscando indicar o grau de variabilidade dos valores em torno de um valor pré-determinado (Magalhães & Lima, 2005).

Para comparar os resultados obtidos a partir das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre as pregas vocais direita e esquerda foi empregado o **teste *t de Student*** na análise estatística. A significância estatística serve

para medir o grau de crença de que a diferença obtida seja espúria. Um resultado não-significativo estatisticamente indica que é provável que a diferença seja casual, determinada pelo efeito da amostragem. Por outro lado, um resultado estatisticamente significativo indica que a diferença é bastante confiável e que é pequena a probabilidade de o resultado ser espúrio (Arango, 2001; Doria Filho, 1999; Callegari-Jacques, 2003; Larson & Farber, 2004).

Foi aplicado complementarmente o **teste de análise de variância de um fator com repetição** (*one-way repeated measures ANOVA*) associado ao **teste de Tukey** na análise estatística, comparando as médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos (7, 14, 30 e 90 dias) a fim de avaliar o comportamento do depósito de fibras colágenas para cada sub-grupo de pregas vocais direitas (com aplicação de mitomicina-C) e esquerdas (sem aplicação de mitomicina-C) separadamente. A análise da variância é uma poderosa técnica estatística que decompõe, em vários componentes identificáveis, a variação total entre os valores obtidos no experimento. Este método compara todas as médias em um único teste e visa identificar a existência de ao menos uma diferença entre os grupos, se alguma existir. Caso o resultado seja estatisticamente significativo, aplica-se posteriormente uma das várias técnicas existentes de comparações múltiplas entre as médias (Arango, 2001; Doria Filho, 1999; Callegari-Jacques, 2003; Larson & Farber, 2004). No presente estudo, o teste de *Tukey* foi utilizado complementarmente aos testes de análise de variância (*ANOVA*) e visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si. O método de *Tukey* protege os testes de um aumento no nível de significância devido

ao grande número de comparações efetuadas (Callegari-Jacques, 2003; Larson & Farber, 2004).

Em todos os testes aplicados, foi considerado uma diferença estatisticamente relevante um nível de significância de 5% ($p = 0,05$).

5 RESULTADOS



5 **R**ESULTADOS

5.1 **C**ARACTERÍSTICAS DOS COELHOS

Todos os animais utilizados no presente estudo eram coelhos albinos da raça *New Zealand*, do sexo masculino e a massa corpórea compreendida entre 2500g a 3500g (a massa média de aproximadamente 2900g). Do total da amostragem operada (28 coelhos), restaram 24 coelhos onde não foi observado nenhum tipo de intercorrências trans-operatórias ou mesmo durante todo o acompanhamento pós-operatório (anexo B). Foram excluídos quatro coelhos da análise final já que dois coelhos foram utilizados para o estudo piloto, um animal sofreu óbito no pós-operatório imediato por insuficiência respiratória aguda e em outro coelho foi identificado formação de abscesso cervical no 7º dia de pós-operatório.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO ENXERTO DE GORDURA

Em todos os coelhos de todos os quatro grupos (G1, G2, G3 e G4) foram identificados os enxertos de gordura nas pregas vocais direitas e esquerdas (figura 22).

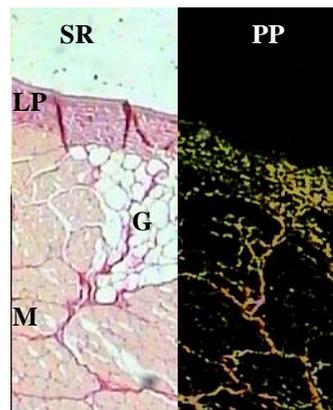


Figura 22. Fotomontagem de corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho do grupo G4 (sacrifício com 90 dias), corada com *picrosirius-red* sem polarização (SR) e com polarização (PP); onde (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tireoaritenóideo; (G) = gordura; aumento de 50X

5.3 RELAÇÃO DO ENXERTO DE GORDURA COM AS ESTRUTURAS ADJACENTES

As fibras colágenas apresentaram um aspecto de distribuição reticular, formando uma espécie de rede, deixando o enxerto de gordura completamente envolvido por fibras colágenas espessas (birrefringência amarela, laranja ou avermelhada) que se estendiam em direção ao músculo tireoaritenóideo (figuras 23 e 24).

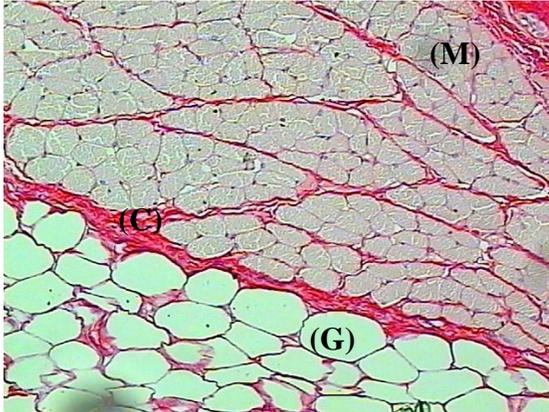


Figura 23. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho (porção intermembranosa) submetida a enxerto de gordura (G); onde (M) = músculo tireoaritenóideo e (C) = fibras colágenas; coloração picrossírius-red sem polarização; aumento de 200X

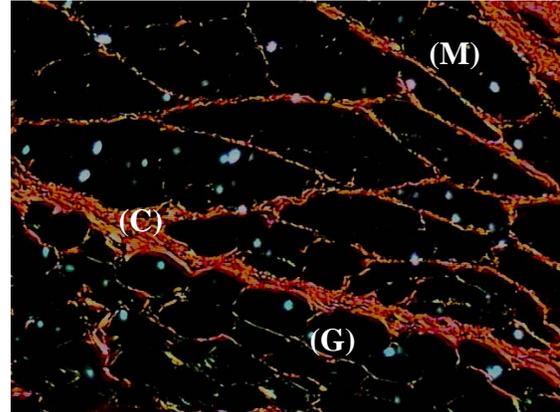


Figura 24. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita de coelho (porção intermembranosa) submetida a enxerto de gordura (G) demonstrando a disposição das fibras colágenas (C) em rede (birrefringência amarela, laranja e vermelha) a partir do bloco gorduroso em direção ao músculo tireoaritenóideo (M); método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

Na lâmina própria, as fibras colágenas apresentaram comportamento semelhante, envolvendo o enxerto de gordura com uma distribuição mais desorganizada (figura 25).

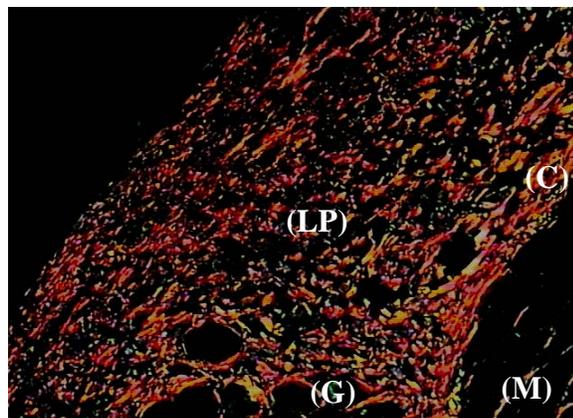


Figura 25. Fotomicrografia do corte histológico transversal da prega vocal direita (porção intermembranosa) do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) submetida a enxerto de gordura (G) demonstrando a disposição das fibras colágenas (C) com birrefringência amarela, laranja e vermelha com desorganização da lâmina própria (LP); onde (M) = músculo tireoaritenóideo; método de coloração por picrossírius-polarização; aumento de 200X

Este padrão foi observado em todos os grupos estudados (G1, G2, G3 e G4) tanto nas pregas vocais direitas (com mitomicina-C) quanto esquerdas (sem mitomicina-C).

5.4 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE AS PREGAS VOCAIS

Os dados relativos às medidas de área proporcional de fibras colágenas para cada uma das pregas vocais de todos os coelhos estudados estão apresentados no **Anexo C** para o grupo de 7 dias, no **Anexo D** para o grupo de 14 dias, no **Anexo E** para o grupo de 30 dias e no **Anexo F** para o grupo de 90 dias.

A **Tabela 2** apresenta os valores das médias aritméticas da área proporcional de colágeno e o desvio padrão em todos os grupos estudados em ambas pregas vocais, bem como o teste “t” de *Student* comparando os resultados das médias de área proporcional de colágeno (%), representando a concentração de fibras colágenas por área total, entre as pregas vocais direitas (com mitomicina-C) e esquerdas (controle).

A análise estatística de cada grupo, através do teste “t” de *Student*, das médias de área proporcional de colágeno (%) demonstrou uma menor concentração das fibras colágenas em todas as pregas vocais submetidas a aplicação de solução tópica de mitomicina-C quando comparadas com as pregas vocais que não receberam aplicação tópica de mitomicina-C ($p \leq 0,05$) – (tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre as médias e medianas de área proporcional de colágeno (%) entre as pregas vocais direitas e esquerdas entre os diferentes grupos de coelhos estudados através do teste “t” de *Student*

		GRUPOS			
		G1 (7 dias)	G2 (14 dias)	G3 (30 dias)	G4 (90 dias)
	média±dp	0,0645 ± 0,0257	0,0880 ± 0,0360	0,1380 ± 0,0330	0,0949 ± 0,0159
PVD	Mediana	0,0697	0,0891	0,1410	0,0914
(mitomicina)	(n)	6	6	6	6
	média±dp	0,1167 ± 0,0170	0,1685 ± 0,0313	0,2034±0,0248	0,1952 ± 0,0349
PVE	Mediana	0,1196	0,1654	0,2040	0,1831
(controle)	(n)	6	6	6	6
Teste “t”	(p)	p = 0,006	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Onde: PVD = prega vocal direita com aplicação de mitomicina-C (experimental); PVE = prega vocal esquerda sem aplicação de mitomicina-C (controle); G1 = grupo de coelhos sacrificados com 7 dias; G2 = grupo de coelhos sacrificados com 14 dias; G3 = grupo de coelhos sacrificados com 30 dias; G4 = grupo de coelhos sacrificados com 90 dias; dp = desvio padrão; (n) = número de amostras de coelhos; p = significância estatística.

Foi possível observar uma redução da concentração de fibras colágenas nas pregas vocais que receberam aplicação de solução tópica de mitomicina-C mais importante nos grupos de coelhos sacrificados com 14, 30 e 90 dias ($p < 0,001$) quando comparadas com os grupos sacrificados com 7 dias ($p = 0,006$). Mesmo assim, em todos os grupos estudados (7, 14, 30 e 90 dias) a redução da concentração de fibras colágenas nas pregas vocais que receberam aplicação de solução tópica de mitomicina-C foi significativa ($p \leq 0,05$) na análise estatística a partir do teste “t” de *Student*.

No **Anexo G** se encontram os dados relativos à análise estatística do teste “t” de *Student* comparando as pregas vocais direitas e esquerdas para os diferentes grupos de estudo (7, 14, 30 e 90 dias).

5.5 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS E AS PREGAS VOCAIS

Analisando-se **quantitativamente** as médias de área proporcional da concentração de colágeno (%) observa-se que a deposição de fibras colágenas aumenta progressivamente entre os grupos sacrificados com 7, 14 e 30 dias de pós-operatório (gráfico 2).

No entanto, este comportamento não se mantém quando se compara os grupos sacrificados com 30 e 90 dias. Aparentemente ocorre uma redução do depósito de fibras colágenas a partir do 30º dia pós-operatório, sendo que em ambas pregas vocais do grupo G4 (com e sem aplicação de mitomicina-C) houve até um decréscimo na área proporcional de colágeno (%), mais evidente nas pregas vocais com aplicação de mitomicina-C (gráfico 2).

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS NAS PREGAS VOCAIS DE CONTROLE

Aplicando-se o teste de análise de variância de um fator com repetição (*one-way repeated measures ANOVA*) comparando as médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos nas pregas vocais que não receberam aplicação de

mitomicina-C previamente a enxertia de gordura (**anexo H**), os achados foram estatisticamente significativos ($p= 0,0001$).

Ao analisar o **teste de Tukey**, verifica-se que as diferenças das áreas proporcionais de fibras colágenas foram significantes ($p\leq 0,05$) principalmente entre o grupo G1 (7 dias) e os grupos G2 (14 dias), G3 (30 dias) e G4 (90 dias). A diferença das áreas proporcionais de colágeno (%) não foram significantes ($p> 0,05$) entre o grupo G2 (14 dias) e os grupos G3 (30 dias) e G4 (90 dias). Esta diferença também não foi significativa ($p> 0,05$) entre os grupos G3 (30 dias) e G4 (90 dias) nas pregas vocais de controle – (gráfico 2).

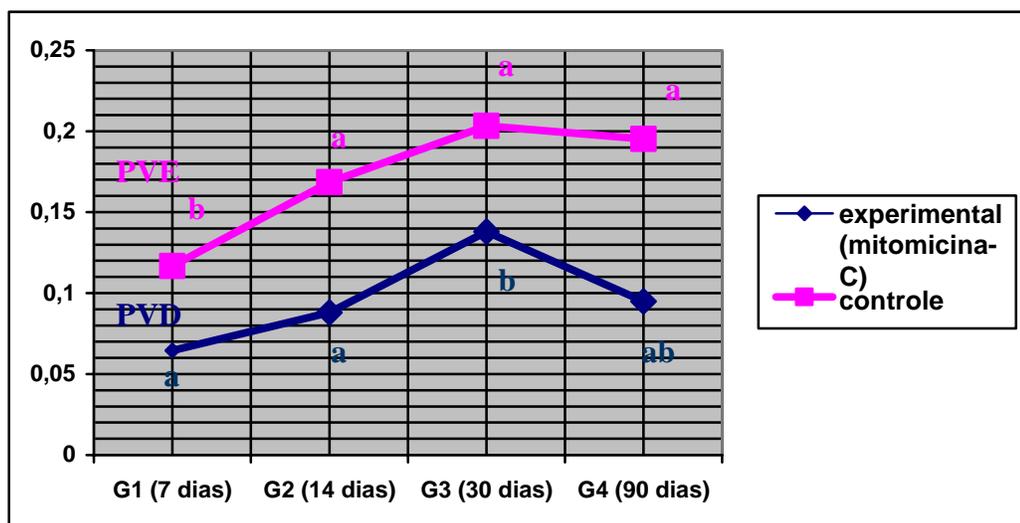
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS NAS PREGAS VOCAIS COM MITOMICINA-C

Ao aplicar o teste de análise de variância de um fator com repetição (**one-way repeated measures ANOVA**) comparando as médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos nas pregas vocais que receberam aplicação de mitomicina-C previamente a enxertia de gordura (**anexo I**), os achados foram estatisticamente significativos ($p= 0,0024$).

Ao utilizar o **teste de Tukey**, identifica-se que as diferenças foram significantes ($p\leq 0,05$) somente entre os grupos G1 (7 dias) e G3 (30 dias) e os grupos G2 (14 dias) e G3 (30 dias). A diferença das áreas proporcionais de colágeno (%) não foi significativa

($p > 0,05$) entre o grupo G1 (7 dias) e os grupos G2 (14 dias) e G4 (90 dias). Entre o grupos G2 (14 dias) e G4 (90 dias) e os grupos G3 (30 dias) e G4 (90 dias) as diferenças não foram significantes ($p > 0,05$) – (gráfico 2).

Gráfico 2. Comparação das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre os grupos G1, G2, G3 e G4 para as pregas vocais com e sem a aplicação de mitomicina-C prévia ao enxerto de gordura



One-way repeated measures ANOVA:

Experimental (mitomicina-C): $F = 6,82791 / gl = 23 / p = 0,0024$

Controle: $F = 11,83562 / gl = 23 / p = 0,0001$

G1 = grupo de coelhos sacrificados com 7 dias; G2 = grupo de coelhos sacrificados com 14 dias; G3 = grupo de coelhos sacrificados com 30 dias; G4 = grupo de coelhos sacrificados com 90 dias; PVD = prega vocal direita com aplicação de solução tópica de mitomicina-C (experimental); PVE = prega vocal esquerda (controle); F = razão F – *Snedocor*; gl = grau de liberdade; p = significância estatística.

Onde: caracteres diferentes (a) e (b) representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre si e caracteres iguais (p.ex.: ab) correspondem a ausência de diferença estatisticamente significativa com seus correspondentes (p.ex.: a, b).

6 DISCUSSÃO



6 **D**ISSCUSSÃO

6.1 A UTILIZAÇÃO DE COELHOS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Na Laringologia já se utilizaram vários modelos de animais em estudos experimentais, sendo que a escolha do melhor modelo ainda é motivo de muitas controvérsias entre os autores (Wexler et al., 1989; Hill et al., 1991; Kurita et al., 1995; Mikus et al., 1995; Zaretsky et al., 1995; Saccogna et al., 1997; Woo et al., 1999; Garret et al., 2000; Stein et al., 2000; Thibeault et al., 2002; Murta, 2005; Carneiro et al., 2005; Camargo et al., 2006; Pereira, 2006; Rispoli, 2006; Kruschewski et al., 2007; Simpson et al., 2008).

Levantando-se na literatura, encontra-se o trabalho realizado por Kurita et al. (1995), onde observaram que as dimensões da laringe, bem como a histologia da prega vocal do porco são as que mais se aproximariam da humana. No entanto, de acordo com o próprio autor, isso não indica que tal animal seja necessariamente o melhor modelo para estudos da fonação.

Em um estudo subsequente, Garret et al. (2000) compararam modelos de experimentação animal para cirurgia laríngea, onde foram estudadas as pregas vocais de cão, porco e macaco, analisando a quantidade da deposição de fibras colágenas, de fibras de elastina e de tecido amorfo. Observaram que as pregas vocais do porco e do cão apresentam quantidades equivalentes de fibras elásticas e colágenas nas camadas profundas da lâmina própria quando comparadas com as do ser humano, apesar de em menor concentração. As pregas vocais destes animais também apresentam um plano de dissecção similar ao do homem enquanto que no macaco, este plano de dissecção está localizado mais profundamente na lâmina própria, próximo ao ligamento vocal. Concluíram com este estudo comparativo que o cão seria o melhor modelo animal para a análise da função das pregas vocais, pois apresenta características estroboscópicas da onda mucosa que não são visualizadas no porco.

O uso do coelho como modelo animal em estudos experimentais tem sido utilizado por vários autores, inclusive em nosso meio (Kurita et al., 1995; Duprat et al., 2004; Thibeault et al., 2002; Murta, 2005; Carneiro, 2005). Segundo vários autores, o coelho apresenta as vantagens de ser um animal bastante dócil, de fácil manejo anestésico, que se acomoda em gaiolas comuns de biotério e muito utilizado em modelos para estudos de resposta imunológica (Harlow & Lane, 1988; Murta, 2005; Carneiro, 2005). Também, segundo Thibeault et al. (2002) a prega vocal normal de coelhos é relativamente similar a ultra-estrutura vocal humana, demonstrando camadas diferenciadas de epitélio, lâmina própria e músculo tireoaritenóideo, além da presença de

colágeno e células da matriz extracelular (figura 22). Ainda, segundo Carneiro (2005) em estudos histológicos, com o objetivo de observar a incorporação do enxerto e a concentração de fibras colágenas em torno do enxerto, o uso deste modelo e metodologia não apresentam nenhum inconveniente ou mesmo prejuízo para a análise.

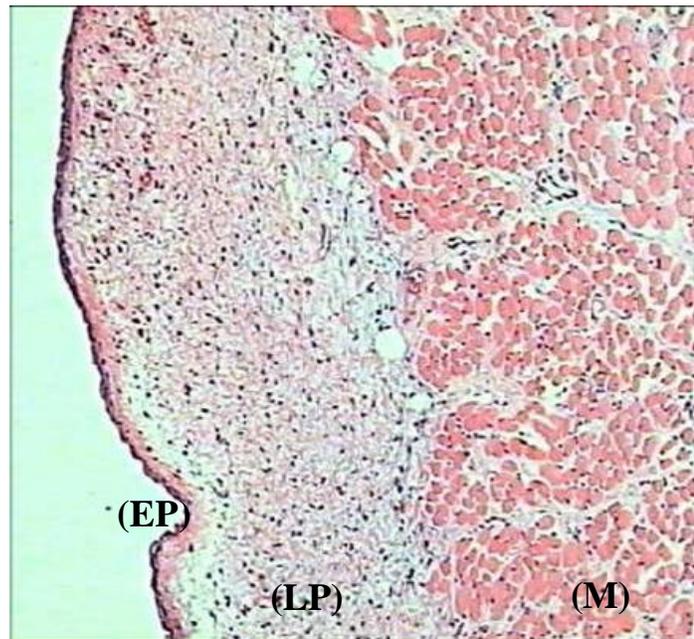


Figura 26. Fotomicrografia do corte histológico transversal de prega vocal de coelho demonstrando a evidente estruturação em camadas: epitélio (EP), lâmina própria (LP) e músculo (M); coloração HE; aumento de 50X. Fonte: Murta, 2005

Ao utilizar o coelho neste trabalho, o pesquisador se beneficiou de todas estas vantagens relacionadas, além da experiência acumulada com este tipo de modelo animal em outros estudos histológicos experimentais desta natureza em nosso meio. Murta (2005) realizou estudo experimental com enxertos de gordura e fáscia muscular em coelhos sacrificados com 90 e 180 dias a fim de observar e comparar a reação inflamatória celular produzida pelos enxertos. Também Carneiro (2005) realizou estudo

experimental para avaliar a distribuição de fibras colágenas após enxerto microcirúrgico de gordura e fásia muscular na prega vocal de coelhos através de estudo histomorfométrico utilizando técnica de microscopia óptica e coloração através de método da picrossírius-polarização.

A escolha do pesquisador por anestésiar os coelhos com solução de Xilazina (5mg/kg) associada a solução de Quetamina (50mg/kg) por via intramuscular e sob ventilação espontânea demonstrou ser um método simples, seguro e de fácil acesso à laringe através de laringofissura, permitindo desta forma uma manipulação bastante delicada e precisa das pregas vocais e dos enxertos, bem como a aplicação de solução tópica de mitomicina-C sem que houvesse dano indesejado a qualquer estrutura ou mesmo contaminação da prega vocal controle com mitomicina-C durante a intervenção.

As intervenções cirúrgicas foram realizadas pelo pesquisador sempre com auxílio de microscópio cirúrgico, principalmente no que diz respeito a dissecação da lâmina própria e do músculo tireoaritenóideo. A amplificação de imagem promovida pelo microscópio cirúrgico, o uso de material microcirúrgico apropriado pelo pesquisador, bem como a estrutura bem definida em camadas da prega vocal de coelhos permitiram a confecção de “bolsão” entre a lâmina própria e a camada muscular, aonde foi aplicado a solução tópica de mitomicina-C na prega vocal direita e acomodados os enxertos de gordura bilateralmente. Utilizando este método, reduziu-se a possibilidade de ruptura da mucosa, preveniu-se a possibilidade de extrusão do enxerto e evitou-se a contaminação da prega vocal controle com mitomicina-C aplicada no “bolsão” da prega vocal sob

estudo. Por sinal, evitar a contaminação da prega vocal controle com solução de mitomicina-C foi uma preocupação constante do pesquisador durante todas as intervenções já que esta possibilidade invalidaria o estudo. Ressalta-se ainda que durante todo o estudo não foi utilizada sutura ou mesmo cola biológica nas pregas vocais a fim de se evitar qualquer tipo de interferência na análise histológica.

6.2 APLICAÇÃO DA MITOMICINA-C NA LARINGOLOGIA

O uso da mitomicina-C na Otorrinolaringologia tem sido descrito como tratamento coadjuvante nas dacriocistorrinostomias (Kao et al., 1997), nas cirurgias nasossinauais (Ingrams et al., 1998), nos traumas laríngeos (Spector et al., 1999; Garret et al., 2001; Ribeiro et al., 2004; Pereira, 2006; Camargo et al., 2006), no retardo de cicatrização de paracenteses da membrana timpânica como alternativa para colocação de tubos de ventilação (Estrem et al., 1999; Estrem et al., 2000; Jassir et al., 2001; O'Reilly et al., 2001) e até no tratamento da hidrópsia endolinfática (Yazawa et al., 1999). Mas foi a sua aplicação tópica no tratamento coadjuvante de casos de estenose laríngea para evitar re-estenoses que consagrou o uso da mitomicina-C na laringologia (Ingrams et al., 1998; Ward et al., 1998; Correa et al., 1999; Rahbar et al., 2000a,b; Sennes et al., 2003; Eliashar et al., 2004; Perepelitsyn et al., 2004; Unal, 2004; Türkyılmaz et al., 2005).

Ward et al. (1998) obtiveram os primeiros resultados animadores neste sentido ao utilizar a mitomina-C em pacientes com histórico de re-estenoses após reconstrução

laríngea. Após o tratamento endoscópico com aplicação de mitomicina-C na concentração de 0,1mg/ml todos estes pacientes foram descanulados.

A mitomicina-C é um antibiótico, comumente utilizado como quimioterápico em aplicações endovenosas ou tópicas, que é ativado intracelularmente e desta maneira inibe a divisão celular, a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, agindo sobre o processo de cicatrização, tornando-o menos intenso. Todas estas propriedades da mitomicina-C despertaram o interesse dos pesquisadores para o seu uso em procedimentos cirúrgicos nos quais o processo cicatricial intenso poderia interferir no resultado final. Nos anos que se seguiram, vários outros estudos vieram confirmar a eficiência da mitomicina-C na prevenção de re-estenoses laríngeas através da sua capacidade de interferir sobre o processo cicatricial (Correa et al., 1999; Rahbar et al., 2000a,b; Garret et al., 2001; Sennes et al., 2003; Camargo et al., 2006).

No presente estudo, utilizamos a aplicação tópica de solução de mitomicina-C na prega vocal de coelhos previamente a enxertia de gordura com a finalidade de se obter este efeito inibitório sobre o processo cicatricial em torno do enxerto, reduzindo a proliferação de fibroblastos e assim diminuindo a produção de fibras colágenas, comparando com a prega vocal contra-lateral que foi submetida sempre a enxertia de gordura sem a aplicação de mitomicina-C.

Segundo os autores Tsai et al. (2002), a aplicação tópica de mitomicina-C deve ser através de algodão embebido com a solução na concentração que pode variar entre

0,4mg/ml a 2 mg/ml por um período de 3 minutos até 10 minutos, e sua ação ocorre somente se for utilizada em área cirúrgica. Estes autores recomendam ainda que após a aplicação, irrigar com solução fisiológica a área submetida a aplicação para remover o excesso da substância. Foi determinada a concentração de 0,4mg/ml para aplicação tópica de mitomicina-C baseado no estudo original de Chen (1983) que consagrou o uso desta concentração para prevenir re-estenoses em cirurgias de glaucoma na Oftalmologia, bem como em estudos subseqüentes que utilizaram esta concentração com resultados seguros e poucos efeitos colaterais (Ingrams et al., 1998; Rahbar et al., 2000a,b; Bradner, 2001; Garret et al., 2001; Tsai et al., 2002; Sennes et al., 2003; Camargo et al., 2006). O tempo de aplicação tópica de solução de mitomicina-C de 5 minutos também foi estabelecido baseando-se na descrição da maioria destes estudos. No entanto, ainda não foram definidos a concentração e o tempo ideais para a aplicação da mitomicina-C nos casos de estenose laríngea. Estabelecer ainda a menor dose efetiva e com menor risco de efeitos colaterais é importante para aumentar a eficiência e segurança deste tratamento.

Uma outra grande preocupação durante todo o estudo foi evitar a contaminação da prega vocal “controle” com solução de mitomicina-C aplicada na prega vocal sob estudo. Durante todas as intervenções cirúrgicas, a prega vocal esquerda (“controle”) sempre foi protegida a fim de se evitar o seu contato com a mitomicina-C durante a aplicação na prega vocal direita. Isto exigiu bastante atenção por parte do pesquisador, auxiliado pela magnificação de imagem promovida pelo microscópio e uso de materiais microcirúrgicos apropriados permitindo movimentos delicados e precisos. A

possibilidade de contaminação da prega vocal esquerda (“controle”) certamente invalidaria os resultados deste estudo.

6.3 O USO DE ENXERTO AUTÓLOGO DE GORDURA

Em vista da possibilidade de absorção e conseqüente perda de volume, a utilização de gordura como um tipo de enxerto na laringologia ainda é motivo de resultados imprevisíveis (Hsiung et al., 2000; Nishimura et al., 2000; Steffen et al., 2006). Na realidade, foi principalmente a segurança, a biodisponibilidade e o risco mínimo de reações indesejadas ao enxerto que realmente perpetuaram o uso da gordura até o presente momento (Murta, 2005; Carneiro, 2005). As taxas de absorção parecem ser bastante variáveis, sugerindo que a sobrevivência da gordura não depende somente de um, mas de vários fatores (Boyce et al., 1994).

Nas pregas vocais dos animais dos grupos G1 (sacrifício com 7 dias) e G2 (sacrifício com 14 dias) e G3 (sacrifício com 30 dias) a identificação do enxerto de gordura foi fácil e evidente. Talvez pelo processo de absorção que a gordura sofre com a evolução do tempo, nos coelhos do grupo G4 (sacrifício com 90 dias) aparentemente as dimensões dos enxertos de gordura apresentavam-se diminuídas quando comparadas com os outros grupos. Mesmo assim, é importante ressaltar que os enxertos de gordura foram encontrados em todas as pregas vocais dos coelhos analisados no presente estudo, respeitando os critérios estabelecidos para a análise histológica.

Estes achados apresentam opiniões controversas na literatura. Através de relato de caso, Bauer et al. (1995) apresentaram resultado animador após documentação de enxerto persistente 5 meses após a intervenção cirúrgica em um paciente com paralisia de prega vocal submetido a injeção de gordura. Em estudo experimental com cães, Woo et al. (1999) utilizaram técnica de enxerto de gordura em pregas vocais de cães, e através de análise histológica e vídeo-laringostroboscopia identificaram a presença de gordura viável em todos os casos após seis semanas. Por outro lado, Saccogna et al. (1997) realizaram estudo experimental com injeção de gordura em prega vocal de 6 gatos, onde os resultados identificaram persistência e viabilidade histológica do tecido gorduroso até 8 meses após o seu procedimento de injeção, mas somente uma mínima quantidade de gordura restou no grupo sacrificado após 12 meses. A gordura foi considerada um método efetivo para correções temporárias de paralisias unilaterais das pregas vocais. Em outro estudo experimental com modelo animal, Stein et al. (2000) ao compararem a histologia da reação tecidual local e a migração após a injeção de quatro tipos diferentes de enxertos na prega vocal canina paralisada após secção do nervo laríngeo recorrente (Teflon[®], silicone, hidroxiapatita e gordura), descreveram que a gordura autóloga demonstrou resultados bastante favoráveis como material destinado a enxertia na medialização de pregas vocais e também foi identificada em seu sítio de implantação após 6 meses da intervenção cirúrgica. Em estudo mais recente publicado por Duprat et al. (2004), utilizando enxerto de gordura em pregas vocais de coelhos, não observaram reação inflamatória tecidual aos três meses, sugerindo desta forma que não poderia existir mais reabsorção da gordura após esse período. Ainda, Murta (2005) realizou estudo experimental com procedimento de enxertia de gordura e fásia

muscular em 24 coelhos sacrificados após 90 e 180 dias buscando observar a reação inflamatória celular em torno destes enxerto. Este autor, encontrou tanto os enxertos de gordura quanto de fáscia muscular nos dois grupos de estudos (90 e 180 dias). Finalmente, em estudo histomorfométrico para pesquisa de concentração de fibras colágenas, Carneiro (2005) identificou enxertos de gordura e de fáscia muscular inseridos em pregas vocais de coelhos em todos os casos nos grupos analisados após 3 meses e 6 meses.

6.4 MÉTODO ESTEREOLÓGICO OU MORFOMÉTRICO

Descrita inicialmente em 1848 pelo geólogo francês *Delesse*, a **estereologia**, também chamada de **morfometria**, é um conjunto de métodos para quantificação de estruturas morfológicas, constituindo um instrumento valioso na avaliação de resultados de trabalhos experimentais. Segundo os trabalhos originais de Delesse (1848), Chalkley (1949), Weibel & Gomez (1962) e Elias & Hide (1983), para que os métodos estereológicos possam ser utilizados, os cortes analisados devem ser isotrópicos, ou seja, os diversos elementos que o constituem devem estar distribuídos ao acaso e homogeneamente no espaço. Dessa forma qualquer corte bidimensional, aleatório e uniformemente isotrópico, torna-se representativo de um todo tridimensional, independentemente da direção em que esse corte seja realizado. Ou seja, pela observação de cortes com imagens bidimensionais (corte histológico, por exemplo) é possível determinar o aspecto tridimensional de um órgão, tecido, célula ou mesmo um compartimento celular.

O pesquisador utilizou métodos morfométricos neste estudo a fim de obter dados quantitativamente objetivos e estatisticamente controlados, a partir de amostras de tecido de pregas vocais de coelhos.

A pesquisa com uso de um programa de computador específico é um método simples e empregado em vários trabalhos, inclusive em nosso meio (Melo, 2004; Duprat et al., 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005; Rispoli, 2006; Pereira, 2006; Camargo et al., 2006). O pesquisador utilizou o programa *Image-Pro Plus*[®] - versão 4.1 que permite criar uma máscara de gradiente de cores (azul) a partir do qual o computador consegue reconhecer o objeto de estudo (fibras colágenas) e assim fornece quantitativamente a área do colágeno sem que houvesse interferência sobre a contagem por parte do pesquisador.

Os cortes nas pregas vocais foram realizados obedecendo sempre uma mesma metodologia. Todas as pregas vocais de coelho foram submetidas a um mesmo corte perpendicular ao bordo livre pelo examinador (figura 27).

Na análise histológica preliminar (aumento de 50X), ao identificar o enxerto de gordura, ficou estabelecido como critério de seleção aqueles enxertos que necessariamente se encontravam acomodados entre a lâmina própria e o músculo tireoaritenóideo, bem como a ausência de artefatos na lâmina (p.ex.: bolhas gasosas de ar) que pudessem eventualmente prejudicar a análise do pesquisador.

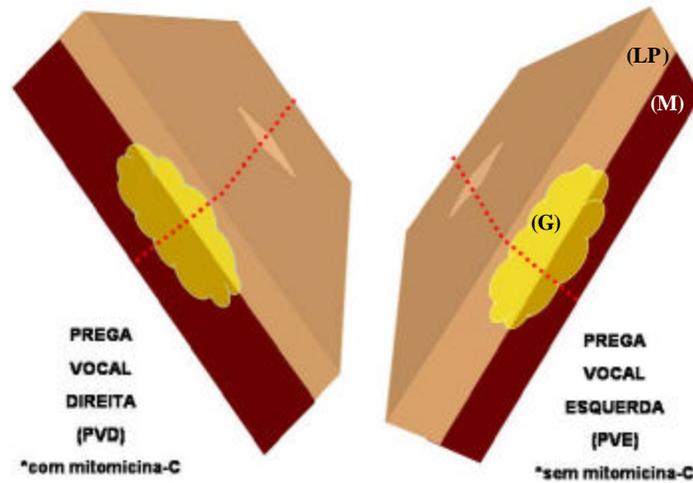


Figura 27. Esquema demonstrando secção perpendicular (em vermelho) ao bordo livre das pregas vocais direita (mitomicina-C) e esquerda (controle), onde (LP) = lâmina própria; (M) = músculo tiroaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura

Com a finalidade de que o pesquisador não pudesse identificar a origem anatômica das lâminas e principalmente a possibilidade de aplicação da mitomicina-C, foi utilizada a técnica de “examinador cego”, onde todas as lâminas foram identificadas somente com uma codificação do coelho, sem referência a aplicação de mitomicina-C na prega vocal ou ao tempo de sacrifício.

Selecionadas as lâminas, também no presente estudo o pesquisador estabeleceu sempre analisar no mínimo cinco campos em cada lâmina ou até se esgotarem os campos em que se identificava a presença do enxerto. Todos os campos examinados obedeceram a uma série de critérios estabelecidos (coloração através do método de picrossirius-polarização, aumento de 200X e padronizações de intensidade de luz do

microscópio, da abertura do diafragma e da altura do condensador). Os campos ainda foram selecionados aleatoriamente, sendo que todo o tecido (músculo tireoaritenóideo e lâmina própria) circundando o enxerto de gordura foi analisado pelo pesquisador, excluindo-se somente as áreas que correspondiam ao próprio enxerto, uma vez que o objetivo do examinador neste estudo era a avaliação e quantificação do processo cicatricial em torno dos enxertos de gordura. O programa *Image-Pro Plus*[®] - versão 4.1 utilizado nesta análise permite esta exclusão sem que haja nenhum tipo de prejuízo ou interferência.

Desta maneira, o examinador respeitou os critérios para o emprego da estereologia ou morfometria na análise deste estudo o que demonstrou ser um método de quantificação confiável, traduzindo numericamente os resultados de estudos experimentais, devendo o seu emprego ser considerado nos trabalhos que necessitem a comparação de alterações estruturais, quer seja em modelos animais ou em humanos.

6.5 MÉTODO DE COLORAÇÃO POR PICROSSÍRIUS-POLARIZAÇÃO

A quantificação morfométrica através da avaliação computadorizada da área corada pelo corante *Sirius Red* sob luz polarizada é um método bem estabelecido pela literatura para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam o estudo do processo cicatricial (Fonseca, 2003; Santos et al., 2003; Ribeiro & Borges, 2004; Varela & Grellet, 2005; Carneiro, 2005; Camargo et al., 2006). Nesse trabalho, para a identificação e quantificação da deposição de fibras colágenas, o pesquisador

preferiu a utilização do método de picrossírius-polarização, pois além de ser bastante específico e sensível, demonstrou ser simples, barato, de fácil reprodução e que apresenta uma experiência acumulada em nosso meio (Montes & Junqueira, 1991; Melo et al., 2003; Melo, 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005).

Toda esta especificidade se deve a presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante *Sirius Red* de natureza ácida (Sweat et al., 1964; Junqueira et al., 1979a,b). Esta reação promove um aumento específico da birrefringência das estruturas que contem colágeno, quando se observa o corte de tecido corado com *picrosirius-red* sob luz polarizada. Além disso, é possível a diferenciação dos vários tipos de colágeno através deste método, onde o tipo I é fortemente birrefringente com fibras espessas de cores amarelas, alaranjadas ou vermelhas e o tipo III pouco refringente com fibras esverdeadas ou amarelo-esverdeadas (Montes & Junqueira, 1991; Melo et al., 2003; Melo, 2004) – (figuras 28 e 29).

A escolha do pesquisador pelo uso do método de picrossírius-polarização foi bastante efetivo na identificação e quantificação da concentração de fibras colágenas. É um método amplamente aplicado em vários trabalhos, desde Montes et al. (1985) que utilizaram esta técnica para analisar fragmentos teciduais de uma múmia com mais de 2.000 anos até complexos estudos da arquitetura das fibras colágenas (Montes & Junqueira, 1991; Mauad et al., 1996; Lemos et al., 1997; Fonseca, 2003; Santos et al., 2003; Melo et al., 2003; Ribeiro & Borges, 2004; Varela & Grellet, 2005; Carneiro, 2005; Camargo et al., 2006).

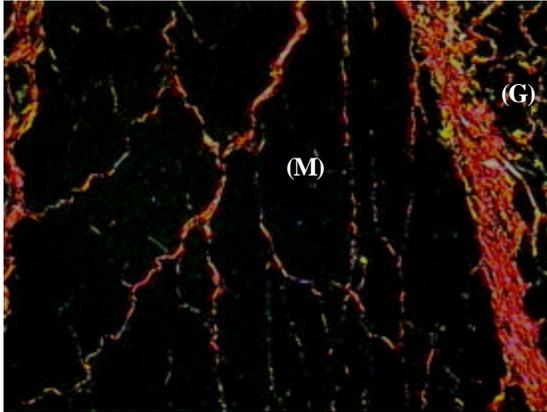


Figura 28. Fotomicrografia demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X; grupo G1 (sacrifício com 7 dias)

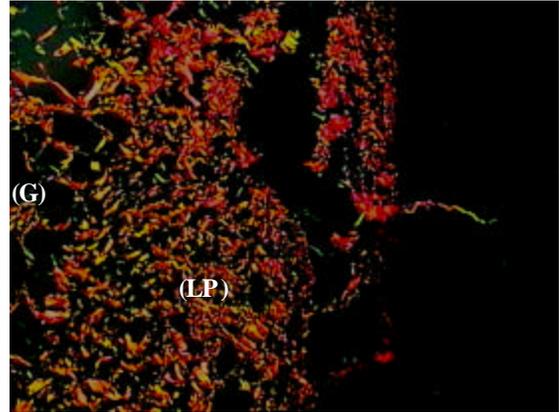


Figura 29. Fotomicrografia demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X; grupo G1 (sacrifício com 7 dias)

No presente trabalho, através do estudo histológico e morfométrico computadorizado verificou-se nas pregas vocais com aplicação de solução tópica de mitomicina-C submetidas a enxerto de gordura, uma redução na deposição de fibras colágenas principalmente do tipo I (bastante birrefringente) quando comparadas com as pregas vocais sem aplicação de solução tópica de mitomicina-C submetidas a enxerto de gordura (Figuras 30, 31, 32 e 33).

6.6 DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS

Em torno dos enxertos de gordura, as fibras colágenas apresentaram uma distribuição tipicamente reticular, formando uma espécie de “rede” de colágeno. Segundo Thibeault et al. (2002), o aumento na rigidez das pregas vocais secundária a um trauma se deve a uma alteração da arquitetura do colágeno cicatricial, adquirindo uma

distribuição anormal e desorganizada. Carneiro (2005) observou comportamento histológico similar ao analisar o processo cicatricial após 3 e 6 meses em torno de enxertos de gordura e de fáscia muscular inseridos em pregas vocais de coelhos. Esta distribuição em torno da gordura foi descrita por este autor como vários “blocos” entremeados por gordura, que tinha o aspecto de rede. Ainda, segundo este autor, a gordura com suas “ilhas” envoltas por colágeno, parece formar pequenas unidades que podem contribuir para uma desorganização maior na lâmina própria.

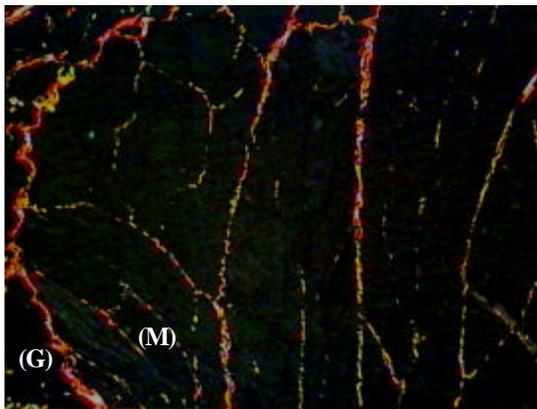


Figura 30. Fotomicrografia de prega vocal direita que recebeu aplicação tópica de mitomicina-C (grupo G2 sacrificado com 14 dias) demonstrando redução da concentração de fibras colágenas (tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho), onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X

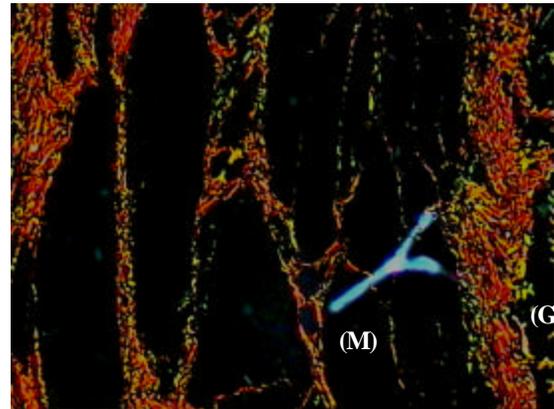


Figura 31. Fotomicrografia de prega vocal esquerda que não recebeu aplicação de mitomicina-C (grupo G2 sacrificado com 14 dias) demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (M) = músculo tireoaritenóideo e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X

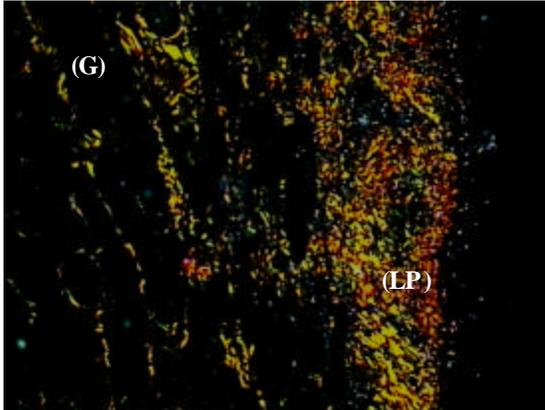


Figura 32. Fotomicrografia de prega vocal direita que recebeu aplicação tópica de mitomicina-C do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) demonstrando redução da concentração de fibras colágenas (tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho), onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X

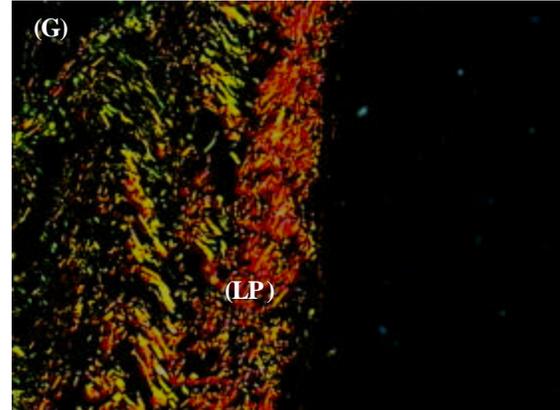


Figura 33. Fotomicrografia de prega vocal esquerda que não recebeu aplicação de mitomicina-C do grupo G3 (sacrifício com 30 dias) demonstrando o aumento da birrefringência das fibras colágenas em tons de amarelo, amarelo-esverdeado, laranja e vermelho, onde (LP) = lâmina própria e; (G) = enxerto de gordura. Método de coloração por picrossírius-polarização, aumento de 200X

6.7 PROCESSO CICATRICAL NA PREGA VOCAL DE COELHOS

A partir do estudo de Branski et al. (2005), observou-se **qualitativamente** a formação de tecido cicatricial em prega vocal de coelhos nos primeiros 21 dias após a intervenção cirúrgica. Os autores identificaram uma proliferação celular abundante no sítio cicatricial no 3º dia de pós-operatório, sendo que este infiltrado caracterizava-se por uma combinação de células inflamatórias e fibroblastos depositando material na matriz extracelular. A partir do 5º dia de pós-operatório um depósito de colágeno é iniciado. Este colágeno parece ser mais denso que o colágeno normal. No 7º dia de pós-operatório, mais colágeno é depositado na matriz extracelular. A partir do 10º dia de pós-operatório, observa-se o depósito de mais colágeno denso e desorganizado com uma completa cobertura epitelial. Entre o 10º e 14º dias de pós-operatório as alterações são mínimas, mantendo a deposição de colágeno denso e desorganizado. Apesar da

subjetividade desta análise qualitativa, os autores concluíram através destas observações que entre o 5^o e 21^o dias de pós-operatório houve um aumento progressivo do depósito de fibras colágenas. Os autores sugerem ainda que os eventos da fase proliferativa da cicatrização que se iniciam no 3^o dias após alguma injúria representariam um período crítico para o decorrer do processo cicatricial.

6.8 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO ENTRE AS PREGAS VOCAIS

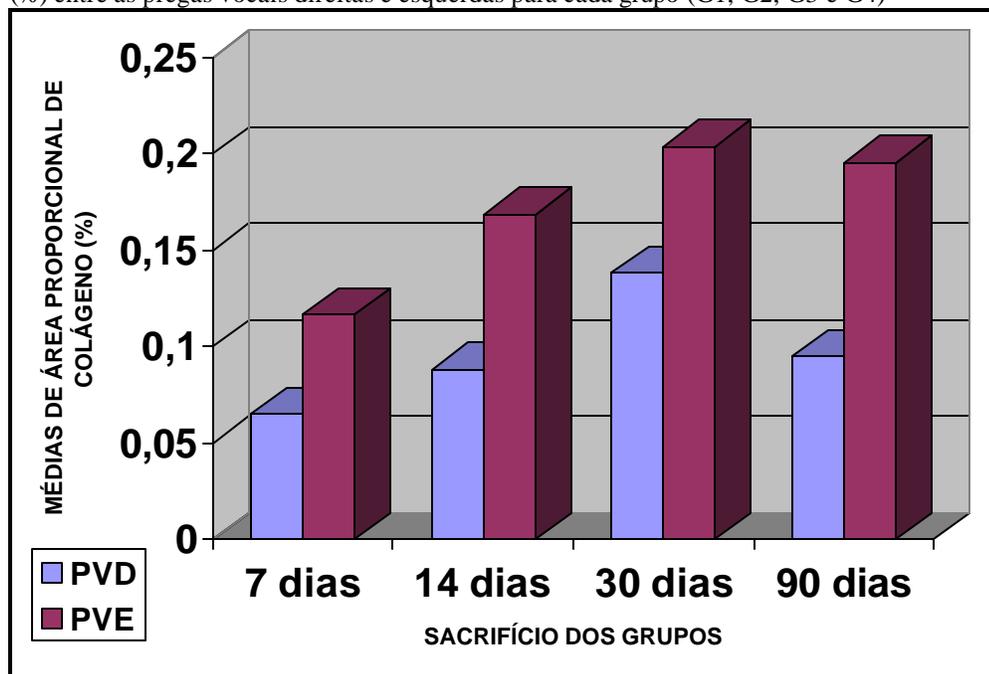
Segundo as observações de Hom (1994), a gordura é uma substância metabolicamente ativa, promovendo um estímulo do processo inflamatório e desta maneira uma deposição maior de colágeno cicatricial. Este colágeno é o principal componente da cicatriz fibrótica, e a desorganização de sua arquitetura normal é marcadamente responsável pela rigidez da prega vocal.

Baseado no fato de que esta fibrose cicatricial é diretamente proporcional à reação inflamatória induzida por uma substância de preenchimento e que a mesma altera as propriedades viscoelásticas da prega vocal, acarretando evidentes prejuízos ao seu padrão vibratório, o ideal é que esta reação inflamatória causada pelo enxerto seja a menor possível (Murta, 2005; Carneiro, 2005).

A partir do estudo histológico e morfométrico computadorizado, através da análise **estatística**, comparando as médias aritméticas das áreas proporcionais de colágeno (%) através do teste “t” de *Student* entre as pregas vocais direitas (com mitomicina-C) e

esquerdas (controle) - (anexo G), observou-se que ocorreu uma deposição menor de colágeno estatisticamente significativa ($p= 0,05$) em torno dos enxertos de gordura naquelas pregas vocais que receberam enxerto de gordura e aplicação tópica de mitomicina-C em todos os grupos (7, 14, 30 e 90 dias) – (gráfico 3).

Gráfico 3. Comparação das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre as pregas vocais direitas e esquerdas para cada grupo (G1, G2, G3 e G4)



Onde: PVD = prega vocal direita com aplicação de mitomicina-C tópica (experimental); PVE = prega vocal esquerda (controle); G1 = grupos de coelhos sacrificados com 7 dias; G2 = grupos de coelhos sacrificados com 14 dias; G3 = grupos de coelhos sacrificados com 30 dias; G4 = grupos de coelhos sacrificados com 90 dias.

Esta deposição de fibras colágenas menor em torno dos enxertos naquelas pregas vocais que receberam aplicação de mitomicina-C, evidencia uma fibrose cicatricial menos exuberante e desta forma, mantendo as propriedades viscoelásticas do enxerto de gordura, supostamente resultaria em um padrão vibratório mais adequado das pregas vocais. Estudos futuros que comparem o padrão vibratório das pregas vocais com o

enxerto de gordura nesses dois tipos de situação (com e sem aplicação de mitomicina-C) poderão ajudar a elucidar o impacto dessa relação entre enxerto, mitomicina-C e o processo cicatricial resultante (representado pela distribuição das fibras colágenas) sobre a vibração vocal.

6.9 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NAS PREGAS VOCAIS DE CONTROLE

Aparentemente, nas pregas vocais que não receberam a aplicação de mitomicina-C, manteve-se o comportamento de depósito do colágeno no período correspondente a fase proliferativa de 7 a 30 dias (G1-G2-G3), bem como a estabilização e redistribuição das fibras colágenas no período correspondente a fase de remodelação (G3-G4) – (gráfico 2).

No presente estudo, analisando-se **estatisticamente** (*one-way repeated measures ANOVA* e teste de *Tukey*) a partir do estudo histológico e morfométrico computadorizado, ao comparar as médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos daquelas pregas vocais que não receberam aplicação de mitomicina-C tópica (controle), observa-se que a concentração de fibras colágenas aumenta progressivamente entre o grupo G1 (7 dias) e os grupos G2 (14 dias) e G3 (30 dias), representando a fase proliferativa do processo cicatricial. Na fase proliferativa, o depósito de colágeno foi significativo ($p= 0,05$) entre os grupos G1 (7 dias) e G2 (14 dias). Ainda na fase proliferativa, a partir do 14º dia após a enxertia de gordura, o depósito de fibras colágenas se mantém, apesar da diferença das médias aritméticas das

áreas proporcionais de colágeno (%) entre os grupos G2 (14 dias) e G3 (30 dias) não ser significativa ($p > 0,05$). Já representando a fase de remodelação, ocorre uma estabilização do processo de depósito de fibras colágenas, caracterizado pela ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos G3 (30 dias) e G4 (90 dias) - (gráfico 2) - (anexo H).

A diferença das médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos G1 (7 dias) e G4 (90 dias) é estatisticamente significativa ($p = 0,05$), demonstrando que o incremento final de depósito de fibras colágenas em torno dos enxertos de gordura do 7º dia (fase proliferativa) até o 90º dia pós-operatório (fase de remodelação) é significativo ($p = 0,05$) naquelas pregas vocais que não receberam aplicação de mitomicina-C tópica (controle) – (anexo J).

6.10 DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS NAS PREGAS VOCAIS COM MITOMICINA-C

Aparentemente, nas pregas vocais que receberam a aplicação tópica de mitomicina-C, também se manteve o comportamento de depósito do colágeno no período correspondente a fase proliferativa de 7 a 30 dias (G1-G2-G3), bem como a estabilização e redistribuição das fibras colágenas no período correspondente a fase de remodelação (G3-G4) – (gráfico 2).

A partir do estudo histológico e morfométrico computadorizado deste estudo, analisando-se **estatisticamente** (*one-way repeated measures ANOVA* e teste de Tukey), ao comparar as médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos daquelas pregas vocais que receberam aplicação de solução tópica de mitomicina-C, observa-se que a concentração de fibras colágenas aumenta progressivamente entre o grupo G1 (7 dias) e os grupos G2 (14 dias) e G3 (30 dias), representando a fase proliferativa do processo cicatricial. Apesar de se evidenciar o depósito de colágeno entre os grupos G1 (7 dias) e G2 (14 dias), este aumento não foi significativo ($p > 0,05$), demonstrando as propriedades da mitomicina-C de inibição sobre a proliferação de fibroblastos e a síntese de fibras colágenas que se iniciam aproximadamente a partir do 3º e o 5º dias após a enxertia de gordura, respectivamente. Ainda na fase proliferativa do processo cicatricial, a partir do 14º dia pós-operatório, o depósito de colágeno se mantém, caracterizado no entanto por uma diferença significativa ($p = 0,05$) entre os grupos G2 (14 dias) e G3 (30 dias). Na fase de remodelação, inicia-se o processo de estabilização e redistribuição das fibras colágenas, caracterizado pela ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos G3 (30 dias) e G4 (90 dias) – (gráfico 2) - (anexo I).

É importante ressaltar que a diferença das médias aritméticas de área proporcional de colágeno (%) entre os grupos G1 (7 dias) e G4 (90 dias) não foi significante ($p > 0,05$), demonstrando que a aplicação tópica de mitomicina-C nas pregas vocais interferiu no incremento final de depósito destas fibras colágenas do 7º dia (fase proliferativa) ao 90º dia (fase de remodelação) após a enxertia de gordura, tornando-o menos significativo

(anexo J). Estes achados sugerem que os eventos que ocorrem nos primeiros momentos da fase proliferativa podem representar significativamente para o decorrer do processo cicatricial. As propriedades da mitomicina-C sobre a síntese de fibroblastos e o colágeno na fase proliferativa da cicatrização já eram sugeridas em outros estudos, no entanto inexistiam análises comparando os efeitos da mitomicina-C tópica sobre as fases proliferativa e de remodelação do processo cicatricial em torno de enxertos de gordura nas pregas vocais.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- A área proporcional de colágeno (%) em torno dos enxertos de gordura foi significativamente menor nas pregas vocais que receberam aplicação tópica de mitomicina-C na concentração de 0,4mg/ml durante 5 minutos em todos os grupos analisados de 7, 14, 30 e 90 dias ($p \leq 0,05$);

- A aplicação prévia de solução tópica de solução de mitomicina-C em pregas vocais submetidas a enxerto de gordura demonstrou promover uma redução significativa na deposição de fibras colágenas peri-enxerto até o 14º dia pós-operatório na fase proliferativa do processo cicatricial quando comparada com as pregas vocais de controle;

- A comparação da área proporcional de colágeno (%) entre o 30º dia e o 90º dia pós-operatório (fase de remodelação) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$)

em ambas pregas vocais, persistindo menor naquelas que receberam aplicação tópica de mitomicina-C;

- Não houve incremento significativo do depósito de colágeno entre o 7º dia (fase proliferativa) e o 90º dia (fase de remodelação) após a enxertia de gordura nas pregas vocais que receberam aplicação tópica de mitomicina-C ($p > 0,05$) em comparação com as pregas vocais de controle ($p \leq 0,05$).

8 ANEXOS

ANEXO A



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DO FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

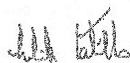
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22.06.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **469/05**, intitulado: "Estudo experimental histológico e morfométrico dos efeitos da mitomicina-C sobre a prega vocal de coelhos associada a aplicação de enxertos de gordura e fásia lata" apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA.

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

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

Pesquisador (a) Executante: Dr. Jan Alessandro Socher

CAPPesq, 22 de Junho de 2005.


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

ANEXO **B****EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA DOS DIFERENTES****GRUPOS DE COELHOS**

GRUPO	COELHO	MASSA (g)	PÓS-OPERATÓRIO	INTERCORRÊNCIA
G1	1	2900	7 dias	Ausente
	2	2800		
	3	3000		
	4	2850		
	5	2750		
	6	2600		
G2	7	3200	14 dias	Ausente
	8	2750		
	9	2800		
	10	3100		
	11	2500		
	12	3000		
G3	13	2950	30 dias	Ausente
	14	2900		
	15	3100		
	16	3000		
	17	3200		
	18	3050		
G4	19	2700	90 dias	Ausente
	20	2950		
	21	2800		
	22	3050		
	23	3500		
	24	2800		

Foram operados no total 28 coelhos: 24 animais foram utilizados no estudo, 2 coelhos foram empregados no estudo piloto, 1 animal sofreu óbito no pós-operatório imediato por insuficiência respiratória aguda e outro coelho foi eliminado do estudo por ter sido identificado formação de abscesso cervical no 7º dia de pós-operatório

Onde: G1 = grupo de coelhos sacrificados com 7 dias; G2 = grupo de coelhos sacrificados com 14 dias; G3 = grupo de coelhos sacrificados com 30 dias; G4 = grupo de coelhos sacrificados com 90 dias

ANEXO C

LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G1 (7 DIAS)

GRUPO	COELHO	AMOSTRA	PVD	PVE
G1	1	1	0,1812	0,1381
G1	1	2	0,1691	0,0441
G1	1	3	0,0194	0,1703
G1	1	4	0,0255	0,0420
G1	1	5	0,0252	0,2355
G1	1	6	0,4204	0,0572
G1	1	7	0,0840	0,2352
G1	1	8		0,0678
MÉDIA	1		0,0840	0,1238
G1	2	9	0,0073	0,0957
G1	2	10	0,0327	0,1723
G1	2	11	0,0340	0,1420
G1	2	12	0,0267	0,1057
G1	2	13	0,0510	0,1708
G1	2	14	0,0424	0,0901
G1	2	15	0,0544	
G1	2	16	0,0686	
MÉDIA	2		0,0396	0,1294
G1	3	17	0,0534	0,1438
G1	3	18	0,0237	0,1150
G1	3	19	0,0239	0,1499
G1	3	20	0,0593	0,1578
G1	3	21	0,0609	0,1288
G1	3	22	0,0346	0,0830
G1	3	23	0,1173	0,1482
G1	3	24	0,1524	0,0897
G1	3	25	0,1660	0,0602
G1	3	26	0,1301	0,0584
G1	3	27		0,0752
G1	3	28		0,1416
MÉDIA	3		0,0811	0,1130
G1	4	29	0,0776	0,1215
G1	4	30	0,0774	0,0736
G1	4	31	0,0405	0,0334
G1	4	32	0,0958	0,0325
G1	4	33	0,0272	0,0705

G1	4	34	0,0309	0,0535
G1	4	35		0,0861
G1	4	36		0,0572
G1	4	37		0,0363
G1	4	38		0,0536
G1	4	39		0,0655
G1	4	40		0,0470
G1	4	41		0,0612
G1	4	42		0,0758
G1	4	43		0,1235
G1	4	44		0,0748
G1	4	45		0,0640
G1	4	46		0,0719
MÉDIA	4		0,0582	0,0858
G1	5	47	0,0123	0,1671
G1	5	48	0,0358	0,1322
G1	5	49	0,0305	0,1619
G1	5	50	0,0397	0,1518
G1	5	51	0,0342	0,1401
G1	5	52		0,0687
G1	5	53		0,1028
G1	5	54		0,0614
G1	5	55		0,0670
G1	5	56		0,1004
MÉDIA	5		0,0305	0,1153
G1	6	57	0,1462	0,1178
G1	6	58	0,0984	0,1020
G1	6	59	0,1075	0,1933
G1	6	60	0,0686	0,2506
G1	6	61	0,0480	0,1861
G1	6	62	0,0952	0,1189
G1	6	63	0,0957	0,1093
G1	6	64	0,0887	0,0922
G1	6	65		0,0856
G1	6	66		0,0950
G1	6	67		0,0972
G1	6	68		0,1501
MÉDIA	6		0,0935	0,1332

ANEXO D

LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G2 (14 DIAS)

GRUPO	COELHO	AMOSTRA	PVD	PVE
G2	7	1	0,0305	0,1504
G2	7	2	0,0486	0,2070
G2	7	3	0,0224	0,1046
G2	7	4	0,1176	0,0813
G2	7	5	0,0240	0,1700
G2	7	6		0,1786
G2	7	7		0,1286
G2	7	8		0,1882
G2	7	9		0,1878
G2	7	10		0,1418
G2	7	11		0,1401
G2	7	12		0,1023
G2	7	13		0,2518
MÉDIA	7		0,0486	0,1563
G2	8	14	0,1281	0,1125
G2	8	15	0,0517	0,1048
G2	8	16	0,0546	0,0921
G2	8	17	0,0605	0,1410
G2	8	18	0,1081	0,2243
G2	8	19	0,0939	0,1510
G2	8	20	0,0628	0,1083
G2	8	21	0,0537	0,0897
G2	8	22	0,0628	0,1060
G2	8	23		0,0872
G2	8	24		0,1176
G2	8	25		0,1349
G2	8	26		0,1547
G2	8	27		0,2257
MÉDIA	8		0,0751	0,1321
G2	9	28	0,0663	0,2513
G2	9	29	0,0758	0,2793
G2	9	30	0,2701	0,1732
G2	9	31	0,0385	0,3266
G2	9	32	0,0550	0,1989
G2	9	33	0,2705	0,2386
G2	9	34		0,1445

G2	9	35		0,2580
G2	9	36		0,1222
G2	9	37		0,2794
G2	9	38		0,0889
G2	9	39		0,3216
G2	9	40		0,1871
G2	9	41		0,2339
G2	9	42		0,1410
G2	9	43		0,1890
G2	9	44		0,1851
G2	9	45		0,2112
G2	9	46		0,1531
G2	9	47		0,1903
MÉDIA	9		0,1294	0,2087
G2	10	48	0,1272	0,1732
G2	10	49	0,0620	0,2387
G2	10	50	0,0543	0,1951
G2	10	51	0,1098	0,1589
G2	10	52	0,1596	0,1229
G2	10	53	0,1065	0,1071
G2	10	54	0,0973	0,1131
G2	10	55	0,1080	0,2295
G2	10	56		0,2399
G2	10	57		0,1669
MÉDIA	10		0,1030	0,1745
G2	11	58	0,0571	0,1647
G2	11	59	0,1642	0,1987
G2	11	60	0,0386	0,1364
G2	11	61	0,0220	0,2064
G2	11	62	0,0308	0,0983
G2	11	63	0,0178	0,0804
G2	11	64	0,0306	0,0822
G2	11	65	0,0227	0,0979
G2	11	66	0,0512	0,2203
G2	11	67		0,1150
MÉDIA	11		0,0483	0,1400
G2	12	68	0,0936	0,2307
G2	12	69	0,1588	0,1349
G2	12	70	0,1304	0,2759
G2	12	71	0,1026	0,2035
G2	12	72	0,1710	0,1129
G2	12	73	0,0846	0,2103
G2	12	74		0,1964
G2	12	75		0,2141
G2	12	76		0,2369
G2	12	77		0,1886

G2	12	78		0,1895
MÉDIA	12		0,1235	0,1994

ANEXO E

LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G3 (30 DIAS)

GRUPO	COELHO	AMOSTRA	PVD	PVE
G3	13	1	0,0763	0,1741
G3	13	2	0,0894	0,2393
G3	13	3	0,1509	0,1993
G3	13	4	0,0856	0,1607
G3	13	5	0,0734	0,1239
G3	13	6	0,0493	0,1772
G3	13	7	0,0525	0,2345
G3	13	8	0,0912	0,1581
G3	13	9	0,1136	0,1249
G3	13	10		0,0922
MÉDIA	13		0,0869	0,1684
G3	14	11	0,1323	0,2066
G3	14	12	0,1356	0,1872
G3	14	13	0,1674	0,1669
G3	14	14	0,1778	0,1973
G3	14	15	0,1746	0,2594
G3	14	16	0,0851	0,2850
G3	14	17	0,1368	0,2787
G3	14	18	0,1218	0,2867
G3	14	19	0,1691	0,1658
G3	14	20	0,1525	0,1725
G3	14	21	0,1519	0,1273
G3	14	22	0,1421	0,1666
G3	14	23	0,1425	0,1541
G3	14	24	0,1874	0,1606
G3	14	25		0,2459
G3	14	26		0,1450
G3	14	27		0,1263
G3	14	28		0,1144
MÉDIA	14		0,1484	0,1915
G3	15	29	0,1284	0,1303
G3	15	30	0,0732	0,0945
G3	15	31	0,1229	0,1096
G3	15	32	0,1857	0,1252
G3	15	33	0,2490	0,2323
G3	15	34	0,2384	0,2279

G3	15	35	0,2220	0,2851
G3	15	36	0,2095	0,3388
G3	15	37	0,2020	0,3268
G3	15	38		0,2783
G3	15	39		0,2907
G3	15	40		0,2897
G3	15	41		0,2217
G3	15	42		0,2334
G3	15	43		0,2296
G3	15	44		0,2329
G3	15	45		0,2177
G3	15	46		0,2321
MÉDIA	15		0,1812	0,2276
G3	16	47	0,1650	0,2756
G3	16	48	0,1843	0,2293
G3	16	49	0,2150	0,2318
G3	16	50	0,2119	0,2807
G3	16	51	0,1730	0,2660
G3	16	52	0,1956	0,2820
G3	16	53	0,1805	0,2598
G3	16	54	0,1389	0,1494
G3	16	55	0,1293	0,1594
G3	16	56		0,1983
G3	16	57		0,1758
G3	16	58		0,2443
MÉDIA	16		0,1593	0,2294
G3	17	59	0,1186	0,1826
G3	17	60	0,1223	0,1603
G3	17	61	0,1701	0,2784
G3	17	62	0,1110	0,1391
G3	17	63	0,1195	0,1262
G3	17	64	0,1073	0,1785
G3	17	65	0,0796	0,1384
G3	17	66		0,1652
G3	17	67		0,1718
G3	17	68		0,2139
G3	17	69		0,1786
G3	17	70		0,1771
G3	17	71		0,2072
G3	17	72		0,1446
G3	17	73		0,1732
G3	17	74		0,1834
G3	17	75		0,2033
G3	17	76		0,2339
G3	17	77		0,2389
G3	17	78		0,2476

MÉDIA	17	79	0,1183	0,1871
G3	18	80	0,1221	0,1785
G3	18	81	0,0426	0,2165
G3	18	82	0,1581	0,1723
G3	18	83	0,2111	0,2830
G3	18	84	0,2101	0,2318
G3	18	85	0,0576	
MÉDIA	18		0,1336	0,2165

ANEXO **F****LEITURA DAS LÂMINAS DO GRUPO G4 (90 DIAS)**

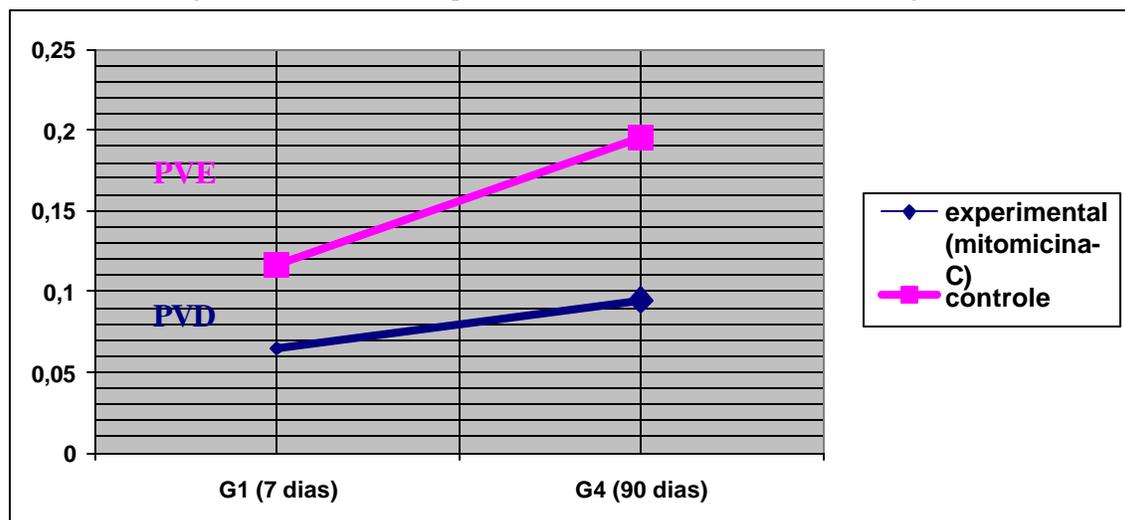
GRUPO	COELHO	AMOSTRA	PVD	PVE
G4	19	1	0,0534	0,1432
G4	19	2	0,0237	0,1161
G4	19	3	0,0239	0,0663
G4	19	4	0,0593	0,0674
G4	19	5	0,0609	0,1388
G4	19	6	0,0346	0,1690
G4	19	7	0,1173	0,1949
G4	19	8	0,1524	0,1643
G4	19	9	0,1660	0,2428
G4	19	10	0,1301	0,2296
G4	19	11		0,1899
MÉDIA	19		0,0821	0,1566
G4	20	12	0,2000	0,1178
G4	20	13	0,1728	0,1314
G4	20	14	0,0186	0,1709
G4	20	15	0,0255	0,1339
G4	20	16	0,0286	0,1448
G4	20	17		0,1927
G4	20	18		0,1762
G4	20	19		0,2461
G4	20	20		0,2165
G4	20	21		0,2032
MÉDIA	20		0,0891	0,1733
G4	21	22	0,1411	0,1746
G4	21	23	0,1399	0,2068
G4	21	24	0,1414	0,1361
G4	21	25	0,1127	0,2506
G4	21	26	0,0934	0,2201
G4	21	27	0,1155	0,3027
G4	21	28	0,0944	0,2238
G4	21	29		0,2752
G4	21	30		0,2401
G4	21	31		0,2748

MÉDIA	21		0,1197	0,2309
G4	22	32	0,1107	0,4067
G4	22	33	0,0825	0,2826
G4	22	34	0,0686	0,2384
G4	22	35	0,1170	0,1736
G4	22	36	0,0843	0,2953
G4	22	37	0,0767	0,2006
G4	22	38	0,0452	0,1329
G4	22	39	0,0509	0,2253
G4	22	40	0,0834	
MÉDIA	22		0,0777	0,2444
G4	23	41	0,0227	0,2597
G4	23	42	0,0221	0,2275
G4	23	43	0,1194	0,2073
G4	23	44	0,0224	0,2180
G4	23	45	0,1472	0,1538
G4	23	46	0,1454	0,1679
G4	23	47	0,1482	0,1901
G4	23	48	0,1213	0,1493
MÉDIA	23		0,0936	0,1748
G4	24	49	0,1640	0,1782
G4	24	50	0,1702	0,1379
G4	24	51	0,0606	0,1915
G4	24	52	0,0877	0,2491
G4	24	53	0,0541	0,2004
MÉDIA	24		0,1073	0,1914

ANEXO J

INCREMENTO DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS G1 E G4

Comparação das médias aritméticas de área proporcional de fibras colágenas (%) entre os grupos G1 e G4 das pregas vocais com e sem a aplicação de mitomicina-C prévia ao enxerto de gordura representando o incremento de colágeno entre o 7º dia (fase proliferativa) e o 90º dia (fase de remodelação)



G1 = grupo de coelhos sacrificados com 7 dias; G4 = grupo de coelhos sacrificados com 90 dias; PVD = prega vocal direita com aplicação de solução tópica de mitomicina-C (experimental); PVE = prega vocal esquerda (controle)

Onde o incremento de colágeno foi significativo ($p = 0,05$) entre o grupo G1 e G4 nas pregas vocais de controle enquanto não foi significativo ($p > 0,05$) entre os mesmos grupos nas pregas vocais que receberam mitomicina-C.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Adzick NS. Wound healing: biologic and clinical features. In: Sabiston DC, Lyerly HK, editores. *Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 15^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997. p.207-20.

Arnold GE. Vocal rehabilitation of paralytic disphonia: I. Cartilage injection into a paralyzed vocal cord [abstract]. *AMA Arch Otolaryngol*. 1955; 62: 1-17.

Arnold GE. Vocal rehabilitation of paralytic disphonia: IX. Technique of intracordal injection [abstract]. *Arch. Otolaryngol*. 1962; 76: 358-68.

Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long term results of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995; 104: 871-4.

Belafsky, PC, Postma GN Vocal fold augmentation with calcium hydroxyapatite. *Otolaryngol Head Neck Surgery*. 2004; 131: 351-4.

Benninger MS, Crumley RL, Ford CN, Gould WJ, Hanson DG, Ossof RH, Sataloff RT. Evaluation and treatment of the unilateral paralyzed vocal fold. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1994; 111: 497-598.

Benninger MS, Alessi D, Archer S. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryng Head Neck Surg.* 1996; 115: 474-82.

Boyce RG, Nuss DW, Kluka EA. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994; 27: 39-68.

Bradner WT. Mitomycin C: a clinical update. *Cancer Treat Rev.* 2001; 27: 35-50.

Brandenburg JH, Kirkham W, Koschkee D. Vocal cord augmentation with autogenous fat. *Laryngoscope.* 1992; 102: 495-500.

Branski RC, Rosen CA, Verdolini KV, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114: 19-24.

Brunnings W. Ube reine neue behandlungsmethode der rekurrenslahmung [abstract]. *Vehr Ver Laryngol.* 1911; 18: 151.

Bruns B. *Zur technik der operative heilung grosser bauchbruche and mastdarmprolapse.* 1905; 77, p. 257. Cited by Peer LA. Transplantation of tissue [v. 1]. Transplantation of fascia in humans. Baltimore: Williams & Wilkins, 1959, p. 258-76.

Callegari-Jacques SM. *Bioestatística – Princípios e Aplicações*. 1ª edição. São Paulo: Artmed Editora S.A.; 2003.

Camargo PAM, Campos ACL, Matias JEF, Rispoli DZ, Przysieszny PE, Fonseca VR. Efeito da mitomicina C tópica na cicatrização de prega vocal em modelo suíno. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006; 72: 601-4.

Carneiro CG. *Avaliação da deposição de colágeno após enxerto de fascia lata e de gordura na prega vocal de coelho: histudo histomorfométrico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005a.

Carneiro CG, Sennes LU, Saldiva PHN, Ximenes Filho JA. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fáschia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005b; 71: 798-802.

Chalkley HW, Cornfield I, Park H. A method for estimating volume-surface ratios [abstract]. *Science*. 1949; 110: 295-7.

Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope*. 1998; 108: 725-31.

Chen C. Enhanced intraocular pressure controlling effectiveness of trabeculectomy by local application of mitomycin-c. *Trans Asia-Pacific Acad Ophtalmol*. 1983; 9: 172-9.

Chen Y, Pai L, Wang H, Hsiung M. Fat augmentation for nonparalytic glottic insufficiency. *ORL*. 2003; 65: 176-8.

Christopher E. Kinetic aspects of epidermal healing. In: Maibach H, Rovee D, editores. *Epidermal wound healing*. Chicago, IL: Year Book Medical Pub; 1972. p.53-70.

Clark RAF, Lanigan JM, Dellapelle P. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelization. *J Invest Dermatol*. 1982; 79: 264.

Clark RAF. Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol*. 1985; 13: 701.

Clark RAR. Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol*. 1998; 124: 201.

Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen II: the use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy [abstract]. *J Invest. Dermatol*. 1968; 50: 414-9.

Correa AJ, Reinisch L, Sanders DL, Huang S, Deriso W, Duncavage JA, Garret CG. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin-c in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999; 108: 1053-60.

Courey MS. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann. Otol. Rhino Laryngol.* 1996; 105: 525-58.

Courey MS. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope.* 2001; 111: 747-58.

Dahlgvist A, Gärskog O, Laurent C, Hertegard S, Ambrosio L, Borzacchiello A. Viscoelasticity of rabbit vocal folds after injection augmentation. *Laryngoscope.* 2004; 114: 138-42.

Dedo HH, Rowe LH. Laryngeal reconstruction in acute and chronic injuries. [Review]. *Otolaryngol Clin North Am.* 1983; 16:373-89.

Delesse M. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches [abstract]. *Ann Mines.* 1848; 13: 379-88.

Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1981; 68:107.

Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. *Collagen Rel Res.* 1985; 5: 481.

Doria Filho U. *Introdução à bioestatística: para simples mortais.* 2ª edição. São Paulo: Negócio Editora; 1999.

Duprat AC, Costa HO, Eckley CA, Pupo DB, Rossi HHZ. Implante de gordura no espaço de Reinke para correção de alterações histoestruturais das pregas vocais. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2001; 67: 78-83.

Duprat AC, Costa HO, Almeida RR, Lancelotti C, Caron R. Histologic behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004; 111: 636-40.

Elias H, Hyde DM. *A Guide to Practical Stereology*. Basileia: Karger; 1983.

Eliashar R, Gross M, Maly B, Sichel JY. Mitomycin does not prevent laryngotracheal repeat stenosis after endoscopic dilation surgery: an animal study. *Laryngoscope*. 2004; 114: 743-6.

Estrem SA, Batra PS. Preventing myringotomy closure with topical Mitomicin C in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 120: 794-8.

Estrem SA, van Leeuwen RN. Use of Mitomycin C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 122: 8-10.

Fonseca, VRCD. *Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exereses de fragmento de mucosa a frio e uso de Mitomicina-C tópica*. [Dissertação]. Curitiba: IPREM; 2003.

Ford CN. Histological studies on the fate of soluble collagen injected into canine vocal folds. *Laryngoscope*. 1986; 96: 1248-57.

Ford CN, Bless DM. A preliminary study of injectable collagen in human vocal folds augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1986a; 94: 104-12.

Ford CN, Bless DM. Clinical experience with injectable collagen for vocal fold augmentation. *Laryngoscope*. 1986b; 96: 863-9

Ford CN, Bless DM, Loftus JM. Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1992; 101: 237-47.

Ford CN, Stakowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: a preliminary clinical study. *Laryngoscope*. 1995; 105: 944-8.

Garret CG, Coleman JR, Reinish L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope*. 2000; 110: 814-24.

Garret CG, Soto J, Billante CR, Riddick J, Reinish L. Effects of mitomycin-c on vocal fold healing in canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110: 25-30.

Gentilhomme E, Neveux Y, Lebeau J, Desmouliere A, Bergier J, Schmitt D, Haftek M. Modulation of a fibrotic process induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. *Cell Biol Toxicol.* 1999;15: 229-38.

Glat PM, Longaker MT. Wound healing. In: Ason SJ, Beasley RW, Thorne CNM, editores. *Grabb and Smith's Plastic Surgery.* 5^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.3-12.

Grinnel F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol.* 1981; 76:181.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96: 379-94.

Hallen L, Johansson C, Laurent C. Cross-linked hyaluronan (Hylan B gel): a new injectable remedy for treatment of vocal fold insufficiency: an animal study. *Acta Otolaryngol.* 1999; 119: 107-11.

Halum SL, Naidu M, Delo DM, Atala A, Hingten CM. Injection of autologous muscle stem cells (myoblasts) for the treatment of vocal fold paralysis: a pilot study. *Laryngoscope.* 2007; 117: 917-22.

Harlow E, Lane D. *Antibodies: a Laboratory Model*. 2^a ed. Woodbury: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1988.

Hartl DM, Travagli JP, Leboullex S, Baudin E, Brasnu DF, Schlumberger M. Current Concepts in the Management of Unilateral Recurrent Laryngeal Nerve Paralysis after Thyroid Surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 3084-8.

Hertegard S, Laurent C, Daulqvist A, Borzachiello A, Ambrosio L. Viscoelastic properties of rabbit vocal folds after augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 128: 401-6.

Hertegard S, Daulqvist A, Goodie E, Mauer F. Viscoelasticity in scarred rabbit vocal folds after hyaluronan injection. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 131: 126.

Hill DP, Meyers AD, Harris J. Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine larynx. *Laryngoscope*. 1991; 101: 344-8.

Hinman CD, Maibach H. Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds [abstract]. *Nature*. 1963; 200: 377.

Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr*. 1974; 26: 89-94.

Hirano M. Surgical anatomy and physiology of the vocal fold. In: Gould WJ, Sataloff RT, Spiegel JR, editores. *Voice surgery*. Chicago: Mosby Year Book Press; 1993. p.125-58.

Hirshberg A, Buchner A, Dayan D. The central odontogenic fibroma and the hyperplastic dental follicle: study with picosirius red and polarization microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1996; 25: 125-7.

Hirshberg A, Buchner A, Dayan D. Collagen fibers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1999; 28: 410-2.

Hoffman HT, McCulloch TM. Anatomic considerations in the surgical treatment of unilateral laryngeal paralysis. *Head Neck*. 1996; 18: 174-87.

Hom IDB. The wound healing response to grafting tissues. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994; 27: 13-24.

Hsiung MW, Woo P, Minasian AMS, Schaefer Mojica, JMS. Fat augmentation for glottic insufficiency. *Laryngoscope*. 2000; 110: 1026-33.

Hsiung M, Chen Y, Pai L, Lin Y, Kang B, Wang H. Fat augmentation following microsurgical removal of the vocal fold nodules. *Laryngoscope*. 2002; 112: 1414-9.

Hsiung M, Lin Y, Su W, Wang H. Autogenous fat injection for vocal fold atrophy. *Eur Arch Otolaryngol*. 2003; 260: 469-74.

Illouz YG. Study of subcutaneous fat. *Aesthetic Plastic Surgery*. 1990; 14: 165-77.

Imamura R, Sennes LU, Chung D, Bohadana S, Tsuji DH. Injeção de gordura na prega vocal: efeitos do local de injeção sobre a configuração glótica e a distribuição espacial da gordura injetada. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69: 445-50.

Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shapshay SM. Sinus surgery: does mitomycin-c reduce stenosis ? *Laryngoscope*. 1998; 108: 883-6.

Isshiki N. *Phonosurgery theory and practice*. Tokyo: Springer-Verlag; 1989. p.5-21.

Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 124: 368-73.

Junqueira LCU, Cossermemeli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978; 41: 267-74.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Pricosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979a; 11: 447.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Ann Biochem*. 1979b; 94: 96-9.

Junqueira LCU Carneiro J. *Histologia básica*. 9^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1995.

Larson R, Farber B. *Estatística aplicada*. 2^a ed. São Paulo: Prentice Hall; 2004.

Kao CSC, Liao CL, Tse NG JHS, Chen MS, Hou PK. Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin-c. *Ophthalmology*. 1997; 104: 86-91.

Khaw PT, Doyle W, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin-c. *Laryngoscope*. 1993; 111: 263-7.

Korolkovas A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1997.

Kriesel RJ, Thibeault SL, Chan RW, Suzuki T, Van Groll TJ, Bless DM, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002; 111: 884-9.

Kruschewsky LS, de Mello-Filho FV, Saggiaro F, Serafini LN, Rosen CA. Histologic Study of an Autologous Fat Graft in the Larynx of Dogs With Unilateral Vocal Fold Paralysis. *Laryngoscope*. 2007; 117: 2045-9.

Kunimoto N; Mori S. Studies on pterygium: Part IV. A treatment of the pterygium by mitomycin-c instillation [abstract]. *Acta Soc Ophtalmol Jpn.* 1963; 67: 601-7.

Kupper DS. Análise histológica da injeção de látex e hidroxiapatita em pregas vocais: estudo experimental em cães [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006.

Kurita S, Nagata K, Hirano M. Comparative study of the layer structure of the vocal fold. In: Bless DM, editor. *Vocal Fold Physiology*. 1^a ed. San Diego: Singular; 1995. p.3-21.

Laccourreye O, Papon JF, Kania R, Crevier-Buchman L, Brasnu D, Hans S. Intracordal injection of autologous fat in patients with unilateral laryngeal nerve paralysis: long-term results from the patient's perspective. *Laryngoscope*. 2003; 113: 541-5.

Lawrence CM, Comaish HS, Dahl MGC. Excision of skin tumors without wound closure. *Br J Dermatol*. 1986; 115: 563.

Lemos M, Pozo RMK, Montes GS, Saldiva PHN. Organization of collagen and elastic fibers studied in stretch preparations of whole mounts of human visceral. *Ann Anat*. 1997; 179: 447-52.

Levine DM, Bereson ML, Stephan D. *Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português*. 1^a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2000.

Magalhães MN, Lima ACP. *Noções de Probabilidade e Estatística*. 6ª ed. São Paulo: Edusp; 2005.

Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol*. 2003; 78:393-410.

Mau T, Courey MS. Influence of gender and injection site on vocal fold augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 138: 221-5.

Mauad T, Leick-Maldonato EA, Lemos M, Dohlnikoff M, Caldini G, Montes GS, Saldiva PHN. The role of collagenous and elastic fibers in modulation bronchoconstriction. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29: 1995-9.

McCulloch TM, Andrews BT, Hoffman HT, Graham SM, Karnell MP, Courey M. Long-term follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*. 2002; 112: 1235-8.

Media Cybernetics. *Image-Pro Plus reference guide for windowstm*. Bethesda: Media Cybernetics LP; 1999.

Mélega JM. *Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte. Princípios Gerais*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi; 2002.

Melo ECM, Lemos M, Ximenes-Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina própria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003; 113: 2187-91.

Melo ECM. *Distribuição das fibras colágenas na lâmina própria e no músculo da prega vocal humana: estudo descritivo e morfométrico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

Mikaelian DO, Lowri LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*. 1991; 101: 465-8.

Mikus JL, Kilpatrick SE, Koufman JA. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope*. 1995; 105: 17-22.

Montes GS, Junqueira LCU. Biology of collagen. *Rev Can Biol Exp*. 1982; 41: 143-56.

Montes GS, Kristian RM, Junqueira LCU. Preservation of elastic system fibers and of collagen molecular arrangement and stainability in na egyptian mummy. *Histochemistry*. 1985; 83: 117-19.

Montes GS, Junqueira LCU. The use of the picrossirius-polarization method for the study of biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 1-11.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagens and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996; 20: 15-27.

Mosher DF, Furcht LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol.* 1981; 77: 175.

Murta AA. *Implante de fascia lata e de gordura na prega vocal de coelho: analise quantitativa do processo inflamatório* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

Neuber G. Fet transplantation [abstract]. *Chir Kongr Verhandl Dtsch Gesellsh Chir.* 1893; 22: 66.

Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular Angiogenesis and Apoptosis in the Survival of Free Fat Grafts. *Laryngoscope.* 2000; 110: 1333-8.

Noordzij JP, Cates JM, Cohen SM, Bennet ML, Ries WMR, Russell PT, Garret G, Ossaf RH. Preparation techniques for the injection of human autologous cartilage: an ex vivo feasibility study. *Laryngoscope.* 2008; 118: 185-8.

Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing. *Criect. Care Med.* 1988; 16: 899-907.

Ortonne JP, Clévy JP. Physiologie de la cicatrisation cutanée. *Rev Prat.* 1994; 44: 1733-4.

Peacock EE. *Wound Repair*. 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1984.

Peacock EE, Cohen IK. Wound healing. In: McCarthy JG , May JW, Littler JW, editores. *Plastic Surgery*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p.161-83.

Peer LA. *Transplantation of tissue* [v. 1]. Baltimore: Williams & Wilkins. 1959.

Pereira MC. *Efeito da mitomicina C tópica sobre os depósitos de colágeno total na submucosa das pregas vocais íntegras de suínos* [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.

Perepelitsyn I, Shapshay SM. Endoscopic treatment of laryngeal and tracheal stenosis-has mitomycin C improved the outcome? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 131: 16-20.

Petrova MB. Morfofunktsional'nye osobennosti zazhivleniia kozhnoi rany u krys pri vozdeistvii nizkointensivnogo lazernogo izlucheniia. *Morfologiia*. 1992; 102:112-21.

Rabau MY, Dayan D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol. Histopathol*. 1994; 9: 525-8.

Rahbar R, Stanley SM, Healy GB. Mitomycin-c: effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000a; 110: 1-6.

Rahbar R, Valdez TA, Stanley SM. Preliminary results of intraoperative mitomycin-c i treatment and prevention of glottic and subglottic stenosis. *J Voice*. 2000b; 14: 282-6.

Remacle M, Lawson G, Kechian J, Jamart J. Use of injectable collagen for correcting glottic gaps: initial results. *J Voice*. 1999; 13: 280-7.

Remacle M, Lawson G. Injectable substances for vocal fold augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 9: 393-7.

Remacle M, Lawson G, Hedayat A, Trussart T, Jamart J. Medialization framework surgery for voice improvement after endoscopic cordectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2001; 258: 267-71.

Ribeiro FA, Guaraldo L, Borges JDEP, Zacchi FF, Eckley CA. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. *Laryngoscope*. 2004; 114: 148-52.

Rispoli DZ. *Efeito da dexametasona intracordal após exerése à daser de CO2 de fragmento de cordal vocal em modelo suíno* [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.

Rondini-Gilli E, Grayeli AB, Borges Crossara PF, El Garem H, Mosnier I, Bouccara D, Sterkers O. Ossiculoplasty with total hydroxyapatite prostheses anatomical and functional outcomes. *Otol Neurotol*. 2003;24: 543-7.

Rosen C.A. Vocal folds scar: evaluation and treatment. *Otolaryngologic Clin North Am.* 2000; 33: 238-46.

Rosen CA, Thedky AA Vocal fold augmentation with injectable calcium hydroxylapatite: Short-Term results. *J Voice.* 2004; 18: 387-91.

Rubin HJ. Histologic and high-speed photographic observations on the intracordal injection of synthetics. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1966; 70: 909-21.

Saccogna PW, Werning J, Setrekian S, Struss M. Lipoinjection in paralyzed feline vocal fold: study of graft survival. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997; 117: 465-70.

Santos FCC, Grellet M, Junior AR, Jamur MC, Pinto JA, Fomin DS. Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO2 em modelo animal. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69: 753-9.

Sasai H, Watanabe Y, Muta H, Yoshida J, Hayashi I, Ogawa M, Kubo T. Long-term histological outcomes of injected autologous fat into human vocal folds after secondary laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132: 685-8.

Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Rosen DC, Heuer RJ. Autologous fat implantation for vocal fold scar: a preliminary report. *J. Voice.* 1997; 11: 238-46.

Schramm VL, May M, Lavorato AS. Gelfoam paste injection for vocal cord paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence [abstract]. *Laryngoscope*. 1978; 88: 1268-73.

Sennes LU, Tsuji RK, Imamura R, Tsuji DH. O uso da mitomicina-c no tratamento endoscópico de estenoses supraglóticas. *Arq Otorrinolaringol*. 2003; 7: 71-6.

Shaw GY, Szewczyk MA, Searle J, Woodroof J. Autologous fat injection into the vocal folds: technical considerations and long-term follow-up. *Laryngoscope*. 1997; 107: 177-86.

Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996; 105: 602-6.

Simpson CB, White S, McGuff S. Anti-transforming growth factor beta as a treatment for laryngotracheal stenosis in a canine model. *Laryngoscope*. 2008; 118: 546-51.

Spector JE, Werkhaven JA, Spector NC, Huang S, Page RN, Baranowski B, Luther M, McGehee B, Reinisch L. Preservation of function and histologic appearance in the injured glottis with topical mitomycin C. *Laryngoscope*. 1999; 109: 1125-9.

Steffen N, Steffen LM, Garcia DC. Unilateral Vocal Fold Paralysis: Is there a place for Teflon? *ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia*. 2006; 24: 186-93.

Stegman SJ, Tromovitch TA, Glogau RG. Grafts. *Basics of Dermatological Surgery*. St Louis: Mosby, 1982.

Stein J, Eliachar I, Myles J, Munoz-Ramirez H, Strome M. Histopathologic study of alternative substances for vocal cord medialization. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000; 9: 221-6.

Sweat F, Puchtler H, Woo P. A light-fast modification of little's allochrome stain. Periodic acid-shiff-picric-sirius supra blue GL. *Arch Patol*. 1964; 78: 73-5.

Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats. *Anais Bras Dermatol*. 2007; 82: 141-9.

Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal folds scarring. *J Voice*. 2002; 16: 96-104.

Tsai CC, Kau HC, Kau SC, Hsu WM, Liu JH. Efficacy of probing the nasolacrimal duct with adjuvant mitomycin-C for epiphora in adults. *Ophthalmology*. 2002; 109: 172-4.

Umeno H, Shirozu H, Chitose, SI, Nakashima T. Analysis of voice function following autologous fat injection for vocal fold paralysis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 132: 103-7.

Unal M. The successful management of congenital laryngeal web with endoscopic lysis and topical mitomycin-C. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2004; 68: 231-5.

Van Winkle W. The fibroblast in wound healing [abstract]. *Surg Gynecol Obstet.* 1967; 124: 369.

Varela DG, Grellet M. Histologia da camada superficial da lâmina própria da prega vocal ao se aplicar retalho pediculado de mucosa: estudo experimental em cães. *Rev Bras Otorrinolarigol.* 2005; 71: 318-24.

Ward RF, April MM. Mitomycin-c in the treatment of tracheal cicatrix after tracheal reconstruction. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1998; 44: 275-9.

Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections [abstract]. *J Appl Physiol.* 1962; 17:343-8.

Wetmore SJ. Injection of fat for soft tissue augmentation. *Laryngoscope.* 1989; 99: 50-7.

Wexler DB, Gray S, Jiang J, Titze I. Phonosurgical studies: fat-graft reconstruction of injured canine vocal cords. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989; 98: 668-73.

Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig [abstract]. *Nature.* 1962; 193: 293.

Woo P, Rahbar R, Wang Z. Fat implantation into Reinke space: a histological and stroboscopic study in the canine. *Ann. Otol. Laryngol.* 1999; 108: 738-44.

Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR. Effects of 5-fluouracil and mitomycin-c on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology.* 1990; 97: 1204-10.

Yazawa Y, Suzuki M, Kitano H, Kitajima K. Intraoperative mitomicyn-C in endolymphatic sac surgery for Ménière's disease: a pilot study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1999; 61: 188-94.

Zaretsky LS, Detar M, Shindo M, Rice D. Autologous fat injection for vocal fold paralysis: long term histologic evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104: 1-4.

Zeitels SM. The Evolution of the assessment and treatment of paralytic dysphonia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000a; 33: 803-15.

10 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

10 **B**IBLIOGRAFIA CONSULTADA

Anand VK, Tabae A, Kacker A, Newman JG, Huang C. The role of mitomycin C in preventing synechia and stenosis after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol.* 2004; 18: 311-4.

Aragon HG. *Bioestatística teórica e computacional.* 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Model Med Today.* 1998; 4: 69-75.

Borowiecki B, Croft CB. Experimental animal model of subglottic stenosis. *Ann Otol.* 1977; 86: 835-40.

Bruijin EA, Sleeboom HP, van Helsdinger PJRO, van Oosterom AT, Tjaden UR, Maes RAA. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical Mitomycin C upon different dwelling times. *Int J Cancer*. 1992; 51: 359-64.

Carneiro CG, Tsuji DH, Sennes LU, Ximenes Filho JA, Imamura R. Uso da gordura e fásia muscular autólogas no tratamento da insuficiência glótica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006; 72:140-4.

Chen Y, Pai L, Wang H, Hsiung M. Fat augmentation for nonparalytic glottic insufficiency. *ORL*. 2003; 65: 176-8.

Coppit G, Perkins J, Munaretto J, Nielsen RML, Ulnick K. The effects of mitomycin-cand stenting on airway wound healing after laryngotracheal reconstruction in a pig model. *Int J Ped Otorhinolaryngol*. 2000; 53: 125-35.

Cotton RT, Evans JNG. Laryngotracheal reconstruction in children: five year follow up. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1982; 90: 516.

Courey MS. Injection Laryngoplasty. *Otolaryngol Clin North Am*. 2004; 37: 121-38.

Crooke ST, Bradner WT. Mytomycin C: a review. *Cancer Tret Rev*. 1976; 3: 121-39.

Cubukcu A, Alponat A, Gonullu NN, Ozkan S, Ercin C. An experimental study evaluating the effect of Mitomycin C on the prevention of postoperative intraabdominal adhesions. *J Surg Res.* 2001; 96: 163-6.

Dijkers FG, Nikkels PG. Lamina propria of the mucosa of benign lesions of the vocal folds. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1684-9.

Dijkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104: 698-703.

Doolin EJ, Strande LF, Tsuno K, Santos MC. Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998; 107: 275-9.

Duke SG, Salmon S, Blalock D, Postma GN, Koufman JA. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope.* 2001; 111: 759-64.

Ford CN. Advances and refinements in phonosurgery. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1891-900.

Giovanni A, Vallicioni JM, Gräs R, Zanaret M. Clinical Experience With Gore-Tex for Vocal Fold Medialization. *Laryngoscope.* 1999; 109: 284-8.

Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, editor. *Vocal Fold Physiology: frontiers of basis science*. San Diego: Singular Publishing Group; 1993. p.1-34.

Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999; 109: 845-54.

Gray SD, Titze IR, Alipour TH, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000a; 109: 77-85.

Gray SD. Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000b; 33: 679-98.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96: 379-94.

Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray S. The intermediate layer: a morphological study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice*. 1997; 11: 59-66.

Hammond TH, Gray SD, Butler JE. Age- and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000; 109: 913-20.

Havas TE, Priestley KJ. Autologous fat injection laryngoplasty for unilateral vocal fold paralysis. *J Surg.* 2003; 73: 938-43.

Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Daniloff RG, editor. *Speech science: recent advances.* San Diego: College-Hill Press; 1985. p.1-46.

Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Current Op Otol Head Neck Surg.* 2005; 13: 143-7.

Hörl HW, Feller AM, Biemer E. Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann Plastic Surg.* 1991; 26: 248-58.

Hu D, Sires BS, Tong DC, Royack GA, Oda D. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2000; 16: 119-25.

Junqueira LCU, Carneio J. *Biologia celular e molecular.* 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000.

Kreis T, Vale R. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press; 1999.

Kurita S. Layer structure of the human vocal fold: morphological investigation. *Otologia*. 1980; 26: 973-97.

Kuttan R, Di Ferrante N. Sirius red-collagen interaction: a method for the measurement of collagen and bacterial collagenase activity. *Biochem Int*. 1980; 1: 455-62.

Lopes-De-Leon A, Rojickind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem*. 1985; 33: 737-43.

Mandía CJ. *Trabeculectomia com Mitomicina C no tratamento de glaucomas refratários* [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1997.

Martins-Neto A, Paro G, Schellini SA, Moraes Silva MRB. Mitomicina C no intra-operatório do pterígio. *Arq Bras Oftalmol*. 1996; 59: 397.

Mattar DB, Alves MR, Silva MHT, José NK. Estudo da influência da aplicação subconjuntival da mitomicina C na reparação de defeito epitelial corneano, em coelhas. *Arq Bras Oftal*. 1995; 58: 65-7.

Montes GS, Kristan RM, Shigahara KM, Tokoro R. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry*. 1980; 65: 131-41.

Montgomery WW. Laryngeal paralysis: Teflon injection. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979; 88: 647-57.

Negri EM, Montes GS, Saldiva PHN, Capelossi VL. Architectural remodeling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? *Histopathology*. 2000; 37: 1-11.

Nimni ME, Harkness RD. Molecular structures and functions of collagen. In: Nimni ME, editor. *Collagen*. Boca Raton: CRC Press; 1998. p.1-77.

Nishiyama K, Hirose H, Iguchi Y, Nagai H, Yamanaka J, Okamoto M. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold as a treatment for recurrent nerve paralysis. *Laryngoscope*. 2002; 112: 1420-5.

O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 124: 40-5.

Paro G, Martins-Neto A, Schellini SA, Padovani CR. Nossa experiência com o colírio de Mitomicina C no pós-operatório do pterígio. *Arq Bras Oftalmol*. 1996; 59: 398-401.

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med.* 1979; 301: 13-23.

Reijonen P, Leivo I, Nevalainen T, Rihkanen H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope.* 2001; 111: 1068-74.

Reijonen P, Lehikoinen-Söderlund S, Rihkanen H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002; 111: 523-9.

Rihkanen H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope.* 1999; 108: 51-4.

Rihkanen H, Soderlund-Lehikoinen S, Reijonen P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1854-7.

Rihkanen H, Kaliste E, Leivo I. Processing of fascia for vocal fold injection: a study in vitro and in paralyzed canine vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003; 122: 729-33.

Rosen CA. Phonosurgical vocal fold injection: indications and techniques. *Op Tech Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998a; 9: 203-9.

Rosen CA. Complications of phonosurgery: results of a national survey. *Laryngoscope.* 1998b; 108: 1697-703.

Saldiva PHN, Delmonte VC, Carvalho CRR, Kairalla RA, Auler Junior JOC. Histochemical evaluation of lung collagen content in acute and chronic interstitial diseases. *Chest*. 1989; 95: 953-7.

Sampaio MW, José NK, Alves MR. Efeitos do uso tópico da Mitomicina C em olhos de ratas. *Arq Bras Oftal*. 1995; 58: 56-9.

Sato K, Umero H, Nakashima T. Autologous fat injection laryngohypopharyngoplasty for aspiration after vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004; 113: 87-92.

Simpson GT, Strong MS, Healy GB, Shampshay SM, Vaughan CW. Predictive factors of success or failure in the endoscopic management of laryngeal and tracheal stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1982; 91: 384-8.

Snedocor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. 8^a ed. Iowa: Iowa State University Press; 1989. p. 38-63.

Stasney CR, Beaver ME, Rodriguez M. Minifenestration type I thyroplasty using an expanded polytetrafluorethylene implant. *J Voice*. 2001; 15: 151-7.

Stegman SJ, Tromovitch TA, Glogau RG. Grafts. *Basics of Dermatological Surgery*. St Louis: Mosby Press; 1982.

Stein CE, Loesch C. *Estatística e Probabilidade*. 1^a ed. Blumenau: Edifurb, 2008.

Stiblar-Martinic D. Histology of laryngeal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 1997; 527 (suppl): 130-41.

Suarez-Nieto R, Casas A, Vigil M. Morfologia comparada del músculo tireoritenoideo. *Anales ORL Iber-Amer XIII*. 1986; 1: 39-63.

Sulica L, Blitzer A. *Vocal Fold Paralysis*. Birkhäuser: Springer; 2006.

Szwarcwald CL, Castilho EA. Os caminhos da estatística e suas incursões pela epidemiologia. *Cad Saúde Pública*. 1992; 8: 5-21.

Tamura E, Kitahara S, Kohno N, Ogura M, Hiroi S. Use of freeze-dried autologous fascia to augment the vocal fold: na experimental study in dogs. *Acta Otolaryngol.* 2002; 122: 537-40.

Terkeltaub RA, Ginsberg MH. Platelets and response to injury. In: Clark RAF, Henson PM, editores: *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press; 1998.

Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*. 1999; 109: 504-8.

Tsunoda K, Baer T, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: long term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*. 2001; 111: 453-7.

Tucker HM. Reinnervation of the unilaterally paralyzed larynx [abstract]. *Ann. Otol. Laryngol*. 1977; 86: 789-94.

Türkyilmaz Z, Sönmez K, Demirtola A, Karabulut R, Poyraz A, Gülen S, Dinçer S, Basaklar AC, Kale N. Mitomycin C prevents strictures in caustic esophageal burns in rats. *J Surg Res*. 2005; 123: 182-7.

Wakaki S, et. al. Antibiot. *Chemo*. 1958; 8: 228.

Whited RE. A prospective study of laryngotracheal sequelae in long term intubation. *Laryngoscope*. 1984; 94: 367.

Woo P. Quantification of videostroboscopic findings – measurement of the normal glottal cycle. *Laryngoscope*. 1996; 106 (suppl): 1-19.

Ximenes Filho JA. *Alterações histológicas de pregas vocais humanas correlacionas com o envelhecimento* [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2003.

Zeitels SM, Hochman I, Hillman RE. Adduction arytenopexy: A new procedure for paralytic dysphonia with implications for implant medialization. *Ann. Otol.Rhinol Laryngol Suppl.* 1998; 173: 2-24 .

Zeitels SM. New procedures for paralytic dysphonia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000b; 33: 841-53.