

Helena Hotz Arroyo Ramos

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

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Dr. Rui Imamura

São Paulo

2017

Dados Internacional de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arroyo Ramos, Helena Hotz
Estudo histológico dos efeitos agudos de lesão
com laser diodo 980 nm em pregas vocais de coelhos
/ Helena Hotz Arroyo Ramos. -- São Paulo, 2017.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.
Orientador: Rui Imamura.

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

USP/FM/DBD-465/17

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Auxílio Pesquisa Regular.

Processo: 2015/25095-0

Dedico ...

À Deus,
sempre e soberanamente.

Ao meu marido Bernardo Faria Ramos e minha filha Isabela Arroyo
Ramos,
meus amores e sentido de minha vida.

Aos meus pais Oswaldo Luiz Arroyo e Mônica Hotz Arroyo,
meus pilares, guias e exemplos.

À minha irmã Carmem Hotz Arroyo,
minha amiga e eterna companheira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao **Dr. Rui Imamura**, médico assistente doutor do Hospital das Clínicas da FMUSP e orientador desta tese, pelo qual guardo minha profunda admiração. Desde a residência já me encantava sua imensa sabedoria e veio a ser meu orientador-amigo, no mais profundo sentido. Participou ativamente de cada etapa da pesquisa. Me incentivou, guiou, ensinou e não me deixou desistir. Não há palavras para tamanha gratidão.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP; seu empreendedorismo e vasto conhecimento fortaleceram a Otorrinolaringologia na FMUSP e Brasil afora. Obrigada por me permitir participar de uma página dessa história.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, Professor Associado e Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pelos ensinamentos e exemplos durante minha formação desde a especialização até a pós-graduação.

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

À **Pofa. Dra. Thais Mauad**, Professora Associada do Departamento de Patologia da FMUSP, pela oportunidade de trabalhar em conjunto e ter despendido seu precioso tempo a mim e meu projeto.

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

À **Roberta Ismael Dias Garcia** que me ensinou a manusear as laringes dos coelhos com muita paciência.

À **Dra. Luciana Almeida Lopes** e à **Dra. Marília W. Mancini** da DMC equipamentos, que me ajudaram a delinear esta pesquisa e forneceram equipamentos, funcionários e tempo preciosos para sua execução.

Ao meu melhor amigo, companheiro e esposo **Bernardo Faria Ramos**. Seu amor, carinho e exemplo me fortalecem a cada dia. Obrigada por me incentivar tanto a ser uma pessoa cada vez melhor.

Aos meus avós **Werner Hotz, Neusa Teixeira Hotz, Oswaldo Arroyo** (*in memoriam*) e **Olímpia Campos Pinto** pelo apoio e presença nos momentos importantes de minha vida.

Aos meus sogros, **Sergio Ramos** e **Rosangela Faria Ramos**, por terem aberto as portas de sua família, consultório e corações. Obrigada por todo auxílio, carinho e incentivo.

À minha grande amiga e companheira de pós-graduação **Larissa Neri**. Sua ajuda, parceria e amizade fizeram essa tese ser possível.

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

Aos funcionários do biotério **Claudionor Donizete Vidotti, Clovis Cícero Vidotti e Vicente de Paula Silveira**, por me auxiliarem no manejo e cuidados com os animais de forma tão prazerosa, presenteando-me com amizade e companhia.

À **Kely Cristina Soares Bispo**, funcionária do laboratório de histopatologia, que se esmerou para confeccionar as lâminas deste projeto, que não foram poucas.

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

Aos residentes, fellows e pós-graduandos contemporâneos do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP que se tornaram grandes amigos, por toda a parceria e momentos únicos durante os nove anos que estive nessa Instituição.

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

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), que aprovou e financiou parte deste projeto; e à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que concedeu bolsa de estudo de doutorado direto.

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

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	05
3 REVISÃO DE LITERATURA	07
3.1 Histologia da prega vocal humana	08
3.2 O coelho como modelo animal para estudos experimentais em laringologia	10
3.2.1 Prega vocal de coelho	11
3.3 Processo de cicatrização	12
3.3.1 Fase de inflamação	13
3.3.2 Fase de proliferação	15
3.3.3 Fase de maturação	17
3.4 Cicatrização na prega vocal	18
3.5 Fonocirurgia e cicatrização	20
3.6 Laser	21
3.6.1 Física do laser	23
3.6.2 Laser de diodo	26
3.6.2.1 Laser de diodo em otorrinolaringologia	29
3.6.2.2 Laser de diodo em laringe	29
3.6.3 A injúria térmica em mucosas	33
4 MÉTODO	35
4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos	36

4.2 Local e amostra do estudo	36
4.3 Critérios de inclusão e exclusão	37
4.3.1 Critérios de inclusão	37
4.3.2 Critérios de exclusão	37
4.4 Formação dos grupos e aleatorização	37
4.5 Procedimento pré-operatório	40
4.6 Anestesia	40
4.7 Procedimento cirúrgico	40
4.7.1 Padronização da lesão	44
4.8 Procedimento pós-operatório	47
4.9 Eutanásia, coleta e isolamento das laringes	47
4.10 Preparação histológica	50
4.11 Análise histológica das pregas vocais	51
4.11.1 Técnica de coloração com hematoxilina-eosina	51
4.11.2 Técnicas de coloração com resorcina-fucsina e picrossírus red	53
4.11.3 Técnica de imuno-histoquímica	56
4.11.3.1 Hidratação e bloqueio	56
4.11.3.2 Recuperação antigênica	56
4.11.3.3 Incubação com os anticorpos primários e secundários	56
4.11.3.4 Revelação	57
4.12 Análise estatística	57
5 RESULTADOS	58
5.1 Variáveis de interesse	59
5.1.1 Processo inflamatório	59
5.1.2 Densidade e orientação das fibras elásticas e colágenas	67
5.1.3 Imuno-histoquímica para colágeno tipo I e tipo III	69
6 DISCUSSÃO	71
6.1 Delineamento do estudo e metodologia	72
6.1.1 Parâmetros de escolha do laser de diodo	75
6.2 Efeito do laser de diodo sobre a prega vocal	76
6.2.1 Processo inflamatório	76
6.2.2 Tecido elástico	81

6.2.3 Fibras colágenas	82
6.3 Perspectivas futuras	83
7 CONCLUSÕES	85
8 ANEXO	87
Anexo A – Tabelas de aleatorização dos parâmetros variáveis utilizados em cada grupo de coelhos	88
9 REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE	
Apêndice 1 – Carta de Aprovação da Comissão de Ética	

LISTA DE SIGLAS

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
SP	São Paulo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMC	DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	ácido hialurônico
AlGaAs	<i>gallium aluminium arsenide</i>
CO ₂	dióxido de carbono
EGF	fator de crescimento endotelial
H&E	hematoxilina-eosina
Ho:YAG	<i>holmium:yttrium-aluminium-garnet</i>
IL-1	interleucina-1
LP	lâmina própria
MASER	<i>Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
Nd:YAG	<i>neodimium:yttrium-aluminium-garnet</i>
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PDL	<i>pulsed dye laser</i>
PF-4	fator plaquetário 4
P-N	junção de semicondutores P e N
ppvv	pregas vocais
PV	prega vocal
PVD	prega vocal direita
PVE	prega vocal esquerda
RFO	resorcina-fucsina oxidada
SNOT-20	<i>Sino-Nasal Outcome Test-20</i>
TGF- β	fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
T1	tumor limitado a uma corda vocal, cuja mobilidade permanece normal

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
E	energia
h	hora
Hz	Hertz
J	Joule
kg	quilograma
kW	quilowatt
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
ms	milissegundo
mW	miliWatt
nm	nanometro
s	segundo
µm	micrometro
µm ²	micrometro quadrado
P	potência
W	Watt
λ	comprimento de onda
Δt	intervalo de tempo
x	vezes
/	por
°	grau
o	indicador ordinal masculino
a	indicador ordinal feminino
=	igual a
®	marca registrada
%	por cento

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Relação entre fases da cicatrização e células inflamatórias	14
Figura 2	Representação esquemática das condições universais para produção de um laser	23
Figura 3	Diferença entre os efeitos teciduais provocados pelo laser em modo não contato (coagulação) e contato (vaporização coagulação)	28
Figura 4	Organograma de aleatorização dos parâmetros variáveis	39
Figura 5	Laringoscópio adaptado para laringe de coelhos (visão anterior), acoplado ao seu suporte (base)	42
Figura 6	Posicionamento do animal na mesa cirúrgica e do pesquisador ao realizar a laringoscopia no coelho	42
Figura 7	Imagem endoscópica das pregas vocais do coelho, visualizadas por laringoscopia, endoscópio angulado de 30° e transmitida para a tela do computador	43
Figura 8	Equipamento de laser de diodo 980nm, DMC, São Carlos-SP	43
Figura 9	Ponteira angulada para passagem de fibra óptica do laser e suas dimensões - adaptada para laringe de coelhos, DMC, São Carlos-SP	44
Figura 10	Imagem de corte axial de laringe de coelho de estudo piloto inicial. Notar a reação inflamatória em torno da cartilagem tireóidea na região da sutura na laringofissura	45
Figura 11	Imagens intraoperatórias. (A) lesão em pontual em PVE e fibra sobre PVD antes de lesionar, detalhe do contato da fibra com o tecido sem pressão sob o mesmo; (B)	

	fibra do laser durante lesão pontual em PVD; (C) aspecto final imediatamente após término do procedimento em animal do Grupo II (Potência: PVE – 5W e PVD – 3W)	46
Figura 12	Cervicotomia em coelho após sacrifício, com identificação da laringe	49
Figura 13	Imagem das peças: (A) Laringe fresca excisada, exame macroscópico a fresco, visão anterior; (B) Hemi-laringes formolizadas, visão posterior	49
Figura 14	Interface do programa de análise digital de imagem que mostra a micrografia com corte histológico de prega vocal corada com H&E em sua visão panorâmica (canto superior esquerdo), zoom de 400% (canto inferior esquerdo) e no centro da tela o aumento desejado (Aumento de 10x)	51
Figura 15	Corte coronal de prega vocal direita de um coelho do Grupo 1 em aumento de 10x, evidenciando: (a) extensão do processo inflamatório; (b) extensão linear da úlcera; (c) profundidade do processo inflamatório; (d) profundidade da úlcera	52
Figura 16	Interface do programa de análise digital de imagem que mostra: (A) micrografia com delimitação da área de interesse e reconhecimento das fibras colágenas, marcando-as em verde; (B) micrografia com marcação da área total da lesão. Ambas expressas em μm^2 e em aumento de 100x	55
Figura 17	Prega vocal direita de um coelho do Grupo III que apresenta metaplasia cartilaginosa (seta) (Aumento de 200x)	60
Figura 18	Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I; (A) Prega vocal direita que recebeu frequência de pulsação de 1.000Hz; (B)	

	Prega vocal esquerda que recebeu frequência de pulsação de 10Hz. (Aumento de 50x)	62
Figura 19	Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II; (A) Prega vocal direita que recebeu feixe laser com potência de 3W; (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe laser de diodo com potência de 5W. (Aumento de 20x)	63
Figura 20	Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III; (A) Prega vocal direita que recebeu modo contínuo; (B) Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo no modo pulsado. (Aumento de 20x)	64
Figura 21	Cortes histológicos corados: (A) Corte histológico corado com picrossírus da PV de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser, que mostra fibras colágenas organizadas e densas na lâmina própria e discretas na camada muscular (Aumento de 150x); (B) Corte histológico corado com picrossírus de PV de coelho do Grupo III que recebeu injúria do laser sob modo contínuo, em que se observam fibras colágenas desorganizadas em torno da área ulcerada e abundantes na musculatura em torno da lesão, onde se forma tecido de granulação (Aumento de 100x); (C) Corte histológico corado com resorcina-fucsina oxidada (RFO) da PV de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser, evidenciando as fibras elásticas organizadas, com maior densidade na região subepitelial da lâmina própria (Aumento de 200x); (D) Corte histológico corado com corado RFO de coelho do Grupo III que recebeu injúria do laser sob modo pulsado e mostra as fibras elásticas desorganizadas,	

	fragmentadas e verticalizadas na área de ulceração (Aumento de 140x)	68
Figura 22	Cortes histológicos das pregas vocais de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser de diodo: (A) Corte histológico da PV com marcação para colágeno tipo I (USBiological, MA, USA), titulação 1:1000, peroxidasse, aumento 100x; (B) Corte histológico da PV com marcação para colágeno tipo III (Santa Crus Biotechnology, CA, USA), titulação 1:50, proteinase K, aumento 100x)	70
Figura 23	Imagens de pregas vocais de coelho: (A) aspecto final imediatamente após término do procedimento em animal do Grupo III (PVE - recebeu modo contínuo; PVD - recebeu modo pulsado); (B) laringe fresca do mesmo animal excisada sete dias após o procedimento. Atenção para o aspecto da lesão mais extensa em PVE	81
Gráfico 1	Extensão do processo inflamatório nas pregas vocais por grupo estudado. * P<0,05 para diferenças entre os grupos	65
Gráfico 2	Extensão linear da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado. * P<0,05 para diferenças entre os grupos	66
Gráfico 3	Profundidade da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado. * P<0,05 para diferenças entre os grupos	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados dos 12 estudos mais relevantes sobre laser de diodo em laringe	31
Tabela 2	Comparação das variáveis inflamatórias objetivas (contínuas) analisadas em H&E dos Grupos I, II e III (Teste de Wilcoxon)	61
Tabela 3	Comparação das variáveis inflamatórias subjetivas (categóricas) analisadas com H&E dos Grupos I, II e III (teste de Fisher)	62
Tabela 4	Comparação das densidades de fibras colágenas e elásticas dos Grupos I, II e III (Teste de Wilcoxon)	69

RESUMO

Arroyo Ramos HH. Estudo histológico dos efeitos agudos de lesão com laser de diodo 980nm em pregas vocais de coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A cicatriz em prega vocal que ocorre após injúria constitui causa importante de disфонia. A fonocirurgia ideal é aquela em que a lesão efetivamente removida com o menor dano possível ao tecido adjacente, a fim de reestabelecer a função da prega vocal ao mesmo tempo em que a sua ultraestrutura sua ultraestrutura é preservada. Tanto o bisturi frio quanto lasers em geral são aceitos como instrumentos para fonocirurgia. O laser de diodo tem sido usado no tratamento de doenças laríngeas. Entretanto, não há consenso quanto os parâmetros ideais desse aparelho para tal finalidade. Inexistem trabalhos que mostrem a forma ou a extensão da lesão provocada com laser de diodo em laringe e tampouco as reações histológicas e cicatriciais provocadas por ele. **OBJETIVO:** O objetivo desta pesquisa é estudar as alterações morfométricas e histopatológicas observadas nas pregas vocais de coelhos, sete dias após a lesão provocada com o laser de diodo, comparando diferentes configurações do dispositivo. **MÉTODO:** Vinte e um coelhos machos albinos da raça *New Zealand* foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com sete animais por grupo. Foi realizada uma lesão única durante 20 segundos em cada prega vocal com a ponta da fibra em contato superficial com o tecido. Duas frequências de pulso foram comparadas no Grupo I (10Hz *versus* 1000Hz), diferentes potências no Grupo II (3W *versus* 5W) e modos de radiação distintos no Grupo III (pulsado *versus* contínuo). Após sete dias, as laringes foram excisadas e submetidas à coloração com hematoxilina-eosina, além de coloração histoquímica para colágeno e elastina. Foi realizada análise histológica quantitativa e subjetiva. **RESULTADOS:** o laser de diodo provocou: exocitose de células inflamatórias; edema de mucosa e submucosa; infiltrado celular extenso em torno da úlcera, composto por polimorfonucleares (especialmente eosinófilos), linfócitos e histiócitos; tecido de granulação com a presença de fibroblastos e vasos neoformados e áreas de necrose do tipo coagulativa. A extensão do processo inflamatório e a extensão linear da úlcera apresentaram diferença significativa entre as duas potências, e foi maior com uso do laser ajustado para 5W. A

extensão do processo inflamatório, extensão linear da úlcera, profundidade da úlcera e profundidade do processo inflamatório apresentaram diferença significativa entre os dois modos de emissão do laser, isto é, maior no modo contínuo. A densidade das fibras colágenas apresentaram-se elevadas apenas ao uso do laser no modo contínuo, quando comparado ao modo pulsado. Não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras elásticas. **CONCLUSÃO:** O uso do laser de diodo ajustado em potência de 3W ao invés 5W e o uso do modo contínuo ao invés do pulsado são capazes de aumentar significativamente a injúria térmica nas pregas vocais de coelhos.

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

ABSTRACT

Arroyo Ramos HH. Study of acute vocal fold healing after injury with different settings of 980nm diode laser in a rabbit model [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION. Scarring of the vocal folds is a relevant cause of dysphonia after injury. The ideal phonosurgery would be the one that removes the vocal fold disease in order to restore the biomechanical function, while providing minimal disruption to the surrounding vocal fold layered structure. Steel scalpel and laser systems are widely accepted tools for vocal fold surgical procedures. The diode laser technique has been used in the treatment of laryngeal diseases. However, there is great variability among surgeons with regard to the use of the diode laser for laryngeal surgery and the ideal parameters for this procedure remain unclear. No description of the lesion extent or the vocal fold healing after injury with this device have been reported to date. **OBJECTIVE:** The aim of this research was to study the morphometric and histopathological changes seen in the vocal fold seven days after injury with the diode laser in a rabbit model, comparing different settings of the device. **METHODS:** Twenty-one male New Zealand white rabbits were randomized into three groups with seven animals per group. A single spot injury during 20 seconds was performed in each vocal fold with the fiber tip in superficially contact with the tissue. Two pulse frequency were compared in group I (10Hz versus 1000Hz), different powers in group II (3W versus 5W) and distinct wave mode of radiation in group III (pulsed versus continuous). After seven days, the larynges were harvested and subjected to H&E staining, histochemical staining for collagen and elastin, with quantitative and subjective histological analysis. **RESULTS:** the diode laser provoked exocytosis of inflammatory cells; edema of mucosa and submucosa; extensive cell infiltrate around the ulcer with polymorphonuclear cells (especially eosinophils), lymphocytes and histiocytes; granulation tissue with the presence of fibroblasts and neofomed vessels and areas of coagulative necrosis. The extent of the inflammatory infiltrate and the extent of the ablation crater showed to be greater with the 5W power use. The analyzes of extension of the extent of the inflammatory infiltrate, the extent of the ablation crater, the depth of the ablation crater and depth of the inflammatory process presented greater

measurements with the continuous mode. The density of collagen fibers was higher when the laser was used in continuous wave mode. There was no statistically significant difference in elastic fiber density. **CONCLUSION:** Increasing power from 3W to 5W and using continuous wave rather than pulsed wave mode of the diode laser significantly increased the extent of thermal injury in the rabbit vocal folds.

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

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As técnicas e os instrumentos em fonocirurgia têm sido aprimorados ao longo do tempo, a fim de remover as lesões benignas e malignas das pregas vocais, com máxima preservação de tecidos adjacentes ⁽¹⁾. Tal esforço justifica-se, porquanto uma cicatriz em prega vocal resulta, via de regra, em disfonia cujo tratamento ainda é um grande desafio ^(2,3).

Sob ponto de vista histológico, o processo de cicatrização é uma sequência sobreposta de eventos, que leva à formação de um tecido novo ⁽⁴⁾. Em pregas vocais, na fase aguda de cicatrização, observa-se deposição de neomatriz e reepitelização a partir do quinto dia, enquanto no sétimo dia observa-se deposição de colágeno ⁽⁵⁾. A fase aguda da cicatrização apresenta-se como período crítico, no qual a intervenção terapêutica pode ter impacto significativo na formação da cicatriz madura ⁽⁶⁾. Apesar do conhecimento das reações cicatriciais, as abordagens existentes em fonocirurgia ainda apresentam resultados inferiores ao desejável ⁽⁵⁾.

O bisturi frio é amplamente utilizado em cirurgias laríngeas em razão da facilidade de manipulação, precisão, custo baixo e dano ao tecido adjacente reduzido. No entanto, carece da eficácia do eletrocautério para a hemostasia em lesões mais extensas ou vascularizadas ⁽⁷⁾. Por outro lado, o eletrocautério leva ao prejuízo no processo cicatricial, uma vez que análises histológicas revelam grau elevado de inflamação e necrose relacionadas ao seu uso ⁽⁸⁾.

Para minimizar danos aos tecidos tratados, o laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) foi apresentado como instrumento que possibilita corte e coagulação com dano térmico lateral reduzido, quando comparado a técnica em que se aplica o eletrocautério. O primeiro laser a ser utilizado em laringe humana foi o de dióxido de carbono (CO₂), em 1972 ⁽⁹⁾, e a partir de seus resultados e suas lacunas, outros comprimentos de onda foram estudados e aplicados, buscando melhor relação entre efetividade e dano térmico lateral.

O laser de diodo parece ser uma alternativa em cirurgia laríngea. Quando comparado a outros lasers utilizados em pregas vocais como CO₂ e Nd:YAG (*neodimium:yttrium-aluminium-garnet*) - observa-se que o laser de diodo é mais leve e prático para ser transportado, tem durabilidade longa, custos baixos de instalação e manutenção, além de não necessitar de tempo de aquecimento mínimo ^(10,11). Ademais, seu uso por meio de ponteiros angulados torna possível abordar locais de difícil manuseio quando se emprega laser de CO₂, cujo uso requer acesso em linha reta, na maioria dos casos, com auxílio de microscópio cirúrgico. Desta forma, o laser de diodo é considerado um instrumento de manipulação fácil e precisão adequada para procedimentos em via aérea ^(11,12).

As descrições da aplicação do laser de diodo, no entanto, especificamente em pregas vocais, ainda são escassas. A partir de 2003, os cirurgiões começam a publicar suas experiências com laser de diodo aplicado em doenças laríngeas ⁽¹⁰⁻²¹⁾. Os mesmos não apresentam consenso quanto à sua utilização, de forma que têm sido descritas combinações variadas de

parâmetros ⁽²²⁾. Não há trabalhos que mostrem forma ou extensão da lesão provocada com laser de diodo em laringe e tampouco as reações histológicas e cicatriciais no seu emprego.

Neste contexto, o conhecimento dos efeitos agudos da variação de determinados parâmetros (potência, frequência e modo de energia) do laser de diodo 980nm na extensão da lesão e na cicatrização de pregas vocais torna-se relevante, uma vez que a resposta aguda pode embasar decisões clínicas e atuar como indicador prognóstico de resultado.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar histologicamente os efeitos da variação de determinados parâmetros (potência, frequência e modo de energia) do laser de diodo 980nm na extensão da lesão e cicatrização de pregas vocais de coelhos sete dias após a lesão, de acordo com os aspectos seguintes:

1. Extensão do processo inflamatório, profundidade do processo inflamatório, extensão linear da úlcera, profundidade da úlcera, padrão inflamatório (grau de inflamação e tipo de infiltrado) e características histopatológicas da inflamação (presença ou ausência de exocitose, espongirose, bolha, ulceração, reepitelização, necrose coagulativa, fibroblastos, fibrose, edema de lâmina própria e quantidade de eosinófilos) mediante coloração com hematoxilina-eosina;
2. Concentração e organização de fibras elásticas por meio da coloração resorcina-fucsina;
3. Concentração e organização de colágeno por coloração de picrossírus e imuno-histoquímica específica para colágeno tipo I e tipo III.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histologia da prega vocal humana

A prega vocal humana é estruturada em cinco camadas adaptadas para a fonação e vibração. A primeira camada, mais superficial, é composta por epitélio escamoso estratificado não queratinizado, que mantém o formato da corda vocal e constitui seu revestimento (epitélio de revestimento). Segue abaixo a lâmina própria (LP) dividida em outras três camadas: superficial, intermediária e profunda ⁽²³⁾. A camada superficial da lâmina própria, também chamada de espaço de Reinke, é composta em grande parte por substância amorfa e frouxa (matriz extracelular) e poucas fibras colágenas e elásticas, o que permite boa vibração durante a fonação. A camada intermediária da LP possui maior quantidade de fibras elásticas, enquanto a camada profunda da LP possui mais fibras colágenas. Estas duas últimas camadas constituem o que se denomina ligamento vocal ⁽²⁴⁾. A última das cinco camadas é representada pelo músculo vocal, que forma o corpo de toda a estrutura ⁽²⁵⁾. Portanto, nota-se que a rigidez das camadas aumenta desde a camada superficial em direção ao músculo vocal ⁽²⁶⁾.

De posse desses conhecimentos, Hirano e Kakita (1985)⁽²⁷⁾ propuseram um modelo que explicaria a estrutura morfológica da prega vocal humana e seu mecanismo de vibração. Postularam que a prega vocal seria uma estrutura vibrátil dividida em três camadas: cobertura, composta por

epitélio e camada superficial da lâmina própria; região de transição, representada pelo ligamento vocal; e, finalmente o corpo, constituído pelo músculo vocal. Nomearam de “teoria corpo-cobertura”, em que a estrutura mais leve (cobertura) desliza sobre a mais rígida (corpo) durante a fonação ⁽²⁷⁾.

A composição da matriz extracelular e os componentes celulares presentes na lâmina própria influenciam diretamente nas propriedades biomecânicas da fonação, uma vez que constituem a porção mais vibrátil da prega vocal ^(28,29).

A matriz extracelular é composta por dois grupos de macromoléculas: as proteínas fibrosas (fibras elásticas e colágenas) e as proteínas intersticiais (glicosaminoglicanas, proteoglicanos e glicoproteínas), além de moléculas intersticiais como lipídios e carboidratos ^(29,30). Durante a vibração, as fibras de colágeno desempenham o papel de suportar a tensão e o estiramento da prega vocal, enquanto as fibras elásticas agem para restaurar rapidamente o tecido à sua configuração original ^(28,30). As proteínas intersticiais possuem propriedades mecânicas que determinam algumas das características vibratórias das pregas vocais. Elas afetam a viscosidade, teor fluido e espessura das camadas da lâmina própria, além de influenciar na densidade e tamanho das fibras de colágeno ⁽³¹⁾. Foram identificadas diversas proteínas intersticiais na lâmina própria, tais como: ácido hialurônico, agrecan, versican, decorina, fibromodulina e heparina-sulfato ⁽³⁰⁻³²⁾.

Os componentes celulares da lâmina própria são representados por uma variedade de células importantes, dentre elas fibroblastos,

miofibroblastos e macrófagos ⁽³³⁾. Os macrófagos são encontrados em maior concentração na camada superficial da lâmina própria. Tal localização sugere que essas células estejam ali presentes para combater agentes inflamatórios que possam cruzar a camada epitelial ⁽³⁰⁾. Os fibroblastos são células que reparam danos proteicos da lâmina própria e estão presentes em concentrações semelhantes por todas as camadas da prega vocal. Os miofibroblastos são fibroblastos que se diferenciaram em células de reparo, também em maior concentração na camada superficial da lâmina própria ⁽³³⁾. A presença de miofibroblastos em quase todas as pregas vocais de humanos sugere que as pessoas frequentemente passam por algum trauma vocal mínimo e que as pregas vocais são extremamente competentes na reparação dessas lesões microscópicas de forma eficiente e sem comprometer significativamente o tecido ⁽³⁰⁾.

3.2 O coelho como modelo animal para estudos experimentais em laringologia

O coelho, embora não haja um modelo animal ideal para abordar todas as questões científicas, permite estudar cicatrizes de maneira sistemática, o que não poderia ser feito em humanos ou testes *in vitro*. Desta forma, modelos animais são fundamentais para estudar cicatrização também em pregas vocais, pois torna possível avaliar suas propriedades biomecânicas e estruturais, e, portanto, o desenvolvimento de estratégias na prevenção e tratamento de cicatrizes nas mesmas ⁽³⁴⁾. Não há modelo animal que

apresente anatomia de prega vocal idêntica à dos seres humanos, porém, em coelhos sua ultraestrutura é bastante similar, com lâmina própria organizada em camadas diferenciadas e presença de músculo tireoaritenóideo ⁽³⁵⁾. Contudo, a escolha do modelo animal não se baseia exclusivamente em suas características físicas. Deve-se considerar tamanho do animal, viabilidade técnica do procedimento, recursos disponíveis, além de custos de compra e manutenção do mesmo ^(34,36). Diante disso, os autores consideram o coelho como um modelo economicamente eficiente para os estudos da prega vocal e que possui propriedades teciduais similares à humana ⁽³⁷⁻³⁹⁾.

3.2.1 Prega vocal de coelho

Segundo Kurita et al. (1983)⁽⁴⁰⁾, a prega vocal do coelho possui epitélio escamoso estratificado não queratinizado. A camada epitelial é separada da lâmina própria graças a uma membrana basal. A lâmina própria pode ser dividida em duas camadas não bem delimitadas: uma camada superficial, composta por fibras finas de colágeno entremeadas por pequenas ilhas de tecido gorduroso, e uma camada profunda constituída por uma grande quantidade de fibras grossas e densas de colágeno ancoradas sobre o tecido muscular liso subjacente. Vasos sanguíneos e linfáticos encontram-se sobretudo na região superficial da lâmina própria e há grande quantidade de glândulas submucosas. Não há estrutura comparável ao ligamento vocal ⁽⁴⁰⁾. Ademais, assim como em humanos, as camadas da lâmina própria do coelho possuem grande quantidade de macromoléculas na matriz extra celular como a elastina, o colágeno e o ácido hialurônico ⁽³⁵⁾.

Uma limitação ao uso de coelhos é o fato destes animais apresentarem capacidade fonatória diminuída, portanto, submetidos a menos forças mecânicas que os humanos. Tem sido mostrado que as forças mecânicas externas podem influenciar o aumento da síntese de pró-colágeno, a expressão gênica de elementos da matriz extracelular e estimular *turnover* de colágeno ⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Por isso, em humanos, o aumento de pró-colágeno e de fibras colágenas parece ser mais rápido, bem como a sua degradação. Para preencher esta lacuna, recentemente, alguns autores desenvolveram modelos acústicos para estudar dinamicamente pregas vocais de coelhos ^(37,38,44). Apesar das diferenças, o padrão no processo de cicatrização é semelhante entre as duas espécies ⁽³⁵⁾.

3.3 Processo de cicatrização

O processo de cicatrização, classicamente descrito na literatura, advém de estudos realizados na derme. Em contrapartida, as pesquisas sobre processo cicatricial em mucosas são mais escassas. Desta forma, a descrição dos eventos que ocorrem durante a cicatrização de feridas na pele serve como base para estudos em pregas vocais ⁽⁵⁾.

As reações envolvidas no processo de cicatrização foram didaticamente divididas em três fases (inflamação, proliferação e maturação), todavia consistem em eventos sobrepostos e interligados, descritos a seguir ^(4,45,46).

3.3.1 Fase de inflamação

A fase inflamatória envolve respostas vasculares (coagulação e hemostasia) e celulares (infiltração de leucócitos e liberação de citocinas) ⁽⁴⁵⁾.

Logo após a injúria no tecido, ocorre vasodilatação, com extravasamento de sangue e fluido para o espaço extravascular, o que diminui a drenagem do sistema linfático e pode produzir os sinais cardinais da inflamação: hiperemia, edema e calor local. O colágeno subendotelial exposto na ruptura vascular leva à adesão e agregação plaquetária, ao mesmo tempo em que libera mediadores (serotonina, adenosina difosfato, tromboxano A₂) e proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospodina e fator VIII de von Willebrand). Tais fenômenos resultam na ativação da cascata de coagulação ^(4,45).

A função principal da coagulação é a hemostasia. Uma função secundária, mas igualmente importante, é o início do processo de cicatrização mediante a liberação de fatores de crescimento e citocinas ⁽⁴⁷⁾. O coágulo formado é composto por colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina. A trombina converte o fibrinogênio em fibrina, que é insolúvel e forma um tampão hemostático, além de funcionar como suporte para recrutamento de células como queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos – incluindo neutrófilos e macrófagos ^(4,45). Estes últimos, participam do processo de remoção de *debris* e partículas estranhas. Os neutrófilos chegam até o sítio da lesão minutos após o dano, atraídos pela interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e fator plaquetário 4 (PF-4); e têm como função o combate inicial às

bactérias e ativação de queratinócitos, fibroblastos e células inflamatórias ^(47,48). A menos que haja infecção, o infiltrado neutrofílico começa a diminuir em cerca de 48h. Entre 48h e 96h após a lesão, ocorre predomínio de monócitos, com sua maturação para macrófagos (Figura 1) ⁽⁴⁶⁾. Uma vez no local da ferida, os macrófagos ativados cumprem ação antimicrobiana, amplificada com a produção de óxido nítrico; além de liberarem fatores de crescimento e citocinas importantes que vão regular a fagocitose, angiogênese e síntese de matriz, o que dá início à formação do tecido de granulação ^(4,47).

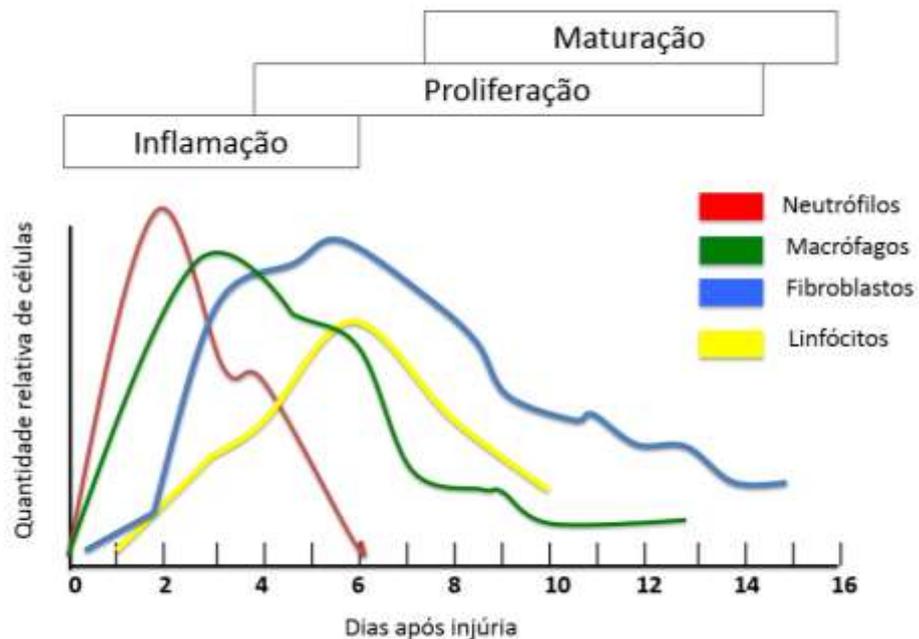


Figura 1 – Relação entre fases da cicatrização e células inflamatórias (Adaptado de Witte e Barboul, 1997⁴)

Todd et al. (1991)⁽⁴⁹⁾ mostraram que o infiltrado eosinofílico presente em pele de coelhos durante a cicatrização, também é capaz de produzir fator de crescimento alfa (TGF- α), uma citocina que facilita a cicatrização.

A resposta inflamatória aguda geralmente dura de 24h a 48h e, em certos casos, pode persistir por até duas semanas. Alguns autores consideram as respostas vasculares tão relevantes que reconhecem quatro fases de cicatrização. A primeira é denominada “hemostasia” ⁽⁴⁵⁾.

3.3.2 Fase de proliferação

Os eventos mais importantes durante a fase de proliferação são: reepitelização, com criação de barreira para permeabilidade; formação de tecido de granulação, que provê reforço ao tecido lesionado; e, angiogênese, porque assegura suprimento sanguíneo adequado ⁽⁴⁵⁾. As primeiras células a se proliferarem nessa fase são os queratinócitos, os fibroblastos e as células endoteliais ⁽⁴⁾.

Os queratinócitos migram a partir das margens livres da lesão cerca de 24h após a injúria. A reepitelização envolve proliferação de queratinócitos, o que assegura organização adequada de células para migrar e cobrir a ferida. Quando cessa a migração, possivelmente por inibição desencadeada por contato, os queratinócitos recolocam-se na camada mais profunda a fim de restaurar a membrana basal. Em seguida, iniciam o processo de diferenciação final, para gerar uma epiderme estratificada ^(45,47).

Os fibroblastos migram até o local da inflamação cerca de três a quatro dias após a intervenção, advindos de células mesenquimais indiferenciadas

presentes nos tecidos subjacentes e precisam ser ativados de seu estado quiescente (Figura 1). Os responsáveis pela ativação são os fatores de crescimento liberados por plaquetas e macrófagos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial (EGF), que induzem quimiotaxia e proliferação dos fibroblastos. Estes são responsáveis pela produção de colágeno e ácido hialurônico. Desta forma, inicia-se a síntese de uma matriz temporária composta por colágeno, proteoglicanos, elastina e fibronectina ^(4,45). Estudos em derme apontam que o colágeno tipo III é o mais sintetizado por fibroblastos no tecido de granulação inicial, produzido cerca de 48h a 72h após a injúria e com pico máximo entre cinco e sete dias ⁽⁴⁵⁾. Esse tipo de colágeno atua como uma matriz na ferida precoce, apresentando-se como base para a migração e proliferação de fibroblastos. Posteriormente, vai sendo dissolvido e substituído por colágeno tipo I - que fornece, em longo prazo, resistência à tração para o local da ferida ⁽⁵⁰⁾. A densidade de colágeno na derme apresenta-se estável cerca de 21 dias após a lesão ⁽⁵¹⁾.

O ácido hialurônico, por sua vez, aumenta de volume entre 48h e 72h após a intervenção, e apresenta queda rápida até níveis pré-lesionais ⁽⁵²⁾.

As células endoteliais proliferam-se por meio de vênulas intactas, próximas à inflamação, e iniciam a formação de neovasos, desencadeando o processo de angiogênese. Os vasos neoformados participam da composição do tecido de granulação e fornecem nutrição e oxigênio ao tecido em crescimento ^(4,45).

3.3.3 Fase de maturação

Na fase de maturação ocorrem eventos importantes como a contração da ferida, deposição de colágeno e remodelamento do tecido cicatricial. Todos esses eventos apresentam importância clínica, uma vez que velocidade, qualidade e quantidade de matriz depositada podem determinar o padrão final da cicatriz ⁽⁴⁾.

A contração da ferida inicia-se de quatro a cinco dias após a lesão. Caracteriza-se pelo movimento centrípeto de recuperação da borda para o centro da ferida, o que mantém a continuidade do tecido, reduz o tamanho da ferida e facilita a cicatrização ⁽⁵³⁾. Tanto miofibroblastos quanto fibroblastos parecem ser responsáveis por este processo.

O remodelamento consiste em deposição da matriz e suas mudanças subsequentes. Ele ocorre durante todo o processo de reparação da ferida, com início na fase inflamatória graças à formação do tampão de fibrina. O mesmo é, então, substituído por tecido de granulação rico em colágeno tipo III e vasos sanguíneos (durante fase proliferativa), que por sua vez é sucedido por tecido cicatricial rico em colágeno tipo I e com menos vasos ⁽⁴⁵⁾. Em pele de adultos saudáveis, o colágeno tipo I representa cerca de 80-90% do colágeno existente na derme, enquanto colágeno tipo III representa 10-20% ⁽⁴⁾. Ao longo da maturação cicatricial – processo que pode durar até 1 ano – a derme retoma gradualmente os níveis de colágeno da pele saudável, porém a força tênsil e sua organização estrutural nunca se recuperam completamente. Na cicatriz madura, as fibras de colágeno são mais espessas e ficam dispostas paralelamente às linhas de tensão ⁽⁵⁴⁾.

3.4 Cicatrização na prega vocal

O processo de cicatrização nas pregas vocais é semelhante àquele classicamente descrito para a derme. No entanto, Branski et al. (2006)⁽⁵⁵⁾ defendem que a organização estrutural em camadas das pregas vocais representa um cenário ímpar para a cicatrização. Os autores propõem duas explicações possíveis para esta afirmação. A primeira é que as pregas vocais apresentam capacidade regenerativa apurada, uma vez que pequenos danos na lâmina própria ou no epitélio podem ser reparados sem que todo o processo de cicatrização seja ativado - desde que a injúria não atinja o limiar para desencadear inflamação plena. A segunda é que a microestrutura da lâmina própria está organizada de forma a absorver mais estresse mecânico que a derme, porque é um tecido relativamente estático, enquanto pregas vocais estão sujeitas a estresse mecânico contínuo em razão da fonação.

Branski et al. (2005)⁽⁵⁾ descreveram a cicatrização em prega vocal de coelho após desnudamento de epitélio e lâmina própria de toda sua extensão. Em torno do terceiro dia, ocorre a fase proliferativa, podendo ser observado infiltrado inflamatório importante, proliferação de células inflamatórias e fibroblastos além de deposição de uma neolâmina própria. Já no quinto dia, ocorre a deposição de uma neomatriz e reepitelização completa, enquanto no sétimo dia é possível observar deposição de colágeno mais maduro⁽⁵⁾. Neste estudo, os autores não utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para diferenciação entre tipos de colágenos. Em outro estudo, Teteya et al. (2006)⁽⁵⁶⁾ distinguiram a deposição dos tipos de colágeno por meio de

imunofluorescência para colágenos I e III em feridas com 1, 3, 5, 7 e 14 dias após injúria (desnudamento da prega vocal). Constataram que inicialmente houve elevação de colágeno tipo I seguida de queda do quinto para o sétimo dia de pós-operatório (mas ainda elevado em relação ao controle), enquanto o colágeno tipo III permaneceu elevado e sem alteração desde o terceiro até o décimo quarto dia após a injúria.

Thibeault et al. (2002)⁽³⁵⁾ realizaram estudo histológico e reológico em pregas vocais de coelhos. Observaram que, após dois meses, há diminuição do colágeno e aumento do pró-colágeno I (precursor do colágeno) na lâmina própria das pregas vocais em cicatrização. Estes achados foram interpretados pelos autores como processo de síntese e deposição do colágeno em andamento, durante fase inicial de cicatrização. Rousseau et al. (2004)⁽³⁹⁾ estudaram cicatrização crônica em pregas vocais de coelhos. Constataram que as mesmas atingem fase madura de cicatrização seis meses após a injúria. Os autores observaram que o colágeno estava aumentado, organizado e formava feixes espessos na lâmina própria da prega vocal cicatrizada. Não havia mais aumento pró-colágeno I. A elastina estava desorganizada e fragmentada. Mesmo que o pleno remodelamento não esteja completo - conquanto tal processo pode durar até um ano - os autores sugerem que seis meses é tempo suficiente para estudos de cicatrização crônica em pregas vocais de coelhos. Rousseau et al. (2003)⁽⁵⁷⁾ descreveram os efeitos na ultraestrutura de pregas vocais de cães no segundo e sexto mês após a indução de lesão cirúrgica. Em 2004⁽³⁹⁾, Rousseau et al. encontraram resultados semelhantes em pregas vocais de coelhos. Tais achados sugerem

que o sistema colágeno nas cordas vocais não se estabiliza até cerca de seis meses após a injúria - ao contrário da derme, em que o colágeno se estabiliza em 21 dias ⁽⁵⁷⁾.

3.5 Fonocirurgia e cicatrização

Sob o ponto de vista clínico, a cicatriz em prega vocal, via de regra, resulta em disfonia ⁽²⁾. Isso porque após a fonocirurgia, o processo cicatricial nas pregas vocais pode implicar em irregularidades na borda livre e modificações na estrutura viscoelástica da lâmina própria, o que provoca rigidez de sua estrutura vibratória ⁽⁵⁸⁾. Tais alterações modificam a relação corpo-cobertura, impedindo a propagação da onda mucosa e culminando em disfonia ⁽³⁵⁾.

Em geral, a teoria de que a rigidez mucosa em pregas vocais cicatrizadas seria resultado de aumento de fibrose ou deposição de colágeno é bem aceita. No entanto, Thibeault et al. (2002)⁽³⁵⁾ mostraram que o aumento de rigidez e viscosidade pode não ser consequência da deposição de colágeno pura e simplesmente, mas associado à perda da arquitetura original das fibras colágenas. A alteração da relação entre proteínas intersticiais e proteínas fibrosas pode desempenhar um papel mais importante do que se esperava.

De forma semelhante, Rousseau et al. (2004)⁽³⁹⁾ estudaram pregas vocais de coelhos seis meses após a injúria. Seus resultados sugerem que

tecidos cicatriciais apresentam fibras elásticas desorganizadas e fragmentadas, quando comparados ao grupo controle. Além disso, o colágeno apresentava-se aumentado, organizado e formava feixes espessos na lâmina própria destes tecidos ⁽³⁹⁾.

3.6 Laser

Em 1960, Theodore Harold Maiman apresentou o primeiro laser da história, que tinha como meio ativo um cristal de rubi ⁽⁵⁹⁾. Em pouco tempo, o laser foi incorporado pela comunidade médica, com ênfase em sua capacidade de remover lesões cancerígenas ⁽⁶⁰⁾. O laser era promissor em cirurgia graças a sua onda contínua, potência de saída alta e capacidade de concentrar o feixe em uma área reduzida ⁽⁶¹⁾. No entanto, os primeiros aparelhos causavam danos teciduais importantes e o ajuste do comprimento de onda (λ) para melhor absorção dos tecidos foi estudado por anos ⁽⁶⁰⁾. Em 1964, o físico americano Kumar Patel, de New Jersey - EUA, descreveu o primeiro laser de CO₂ ⁽⁶²⁾, cuja tecnologia foi sendo aprimorada por ele até o primeiro aparelho comercial, em 1966 ⁽⁶³⁾. Strong e Jako apresentaram os primeiros resultados com laser em laringes humanas, em 1972 ⁽⁹⁾, e, em 1975, Strong apresentou 11 casos de pacientes com T1 de laringe tratados com sucesso após intervenção com laser de CO₂ ⁽⁶⁴⁾. A partir dos resultados e lacunas do laser de CO₂ (acesso em linha reta a partir de microscópio cirúrgico, tamanho pouco conveniente do aparelho e custo elevado), outros

lasers foram produzidos na década de 80, cada um com características singulares e indicações específicas ⁽⁶⁰⁾.

Para a produção de um laser, são necessárias algumas condições universais (cavidade ressonante, meio ativo e fonte de energia ou bombeio), expostas a seguir de forma simplificada (Figura 2) ⁽⁶⁵⁾. O feixe laser é gerado no interior de uma cavidade denominada ressonante ou óptica, cuja câmara contém um meio ativo que pode ser de estado sólido, gasoso, líquido-corantes, semicondutores ou cristais. A interação entre a fonte de excitação e o meio ativo gera fótons (passagem de um estado iônico excitado para o estado fundamental) de determinada energia. Dentro da cavidade ressonante, existem dois espelhos posicionados nas extremidades, um totalmente refletivo (100%), enquanto outro é parcialmente refletivo (98%-95%). A diferença na capacidade de reflexão dos espelhos permite saída de parte da radiação laser de dentro da cavidade com as características de um feixe laser (descritas no próximo item), uma vez que os fótons são refletidos nos espelhos, amplificando a energia da luz e uma porção pode ser emitida pela cavidade óptica. O tamanho e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo e com a potência do aparelho ⁽⁵⁹⁾.

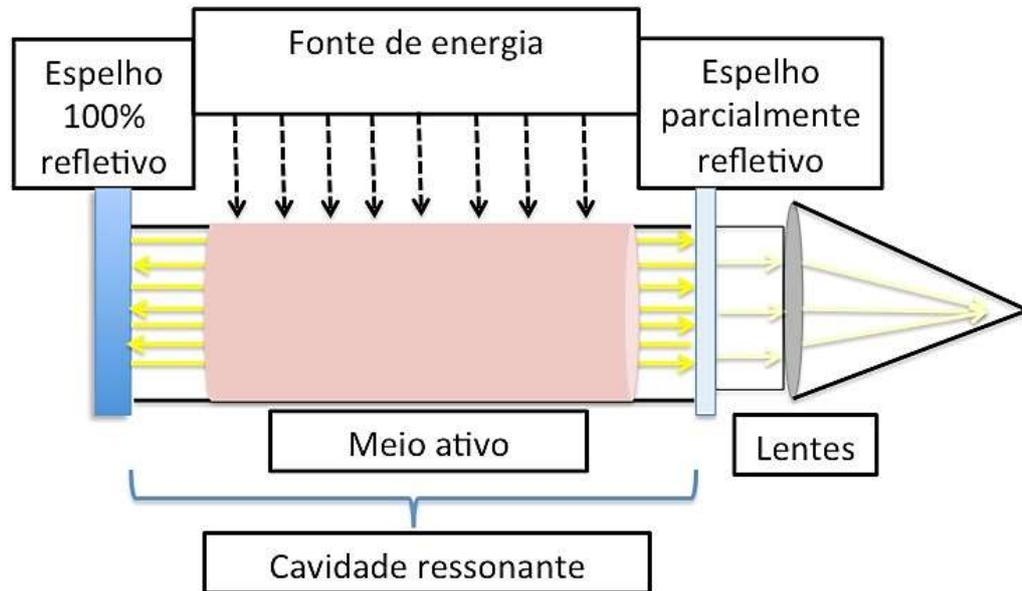


Figura 2 – Representação esquemática das condições universais para produção de um laser (Adaptado de Dhar e Malik, 2011⁶⁵)

3.6.1 Física do laser

A luz comum é formada por fótons ou ondas eletromagnéticas de comprimentos de onda diferentes entre si, propagados de forma isotrópica, em várias direções. Por causa desta dispersão, é considerada luz difusa e conseqüentemente costuma ser menos intensa. O laser é um tipo de luz com características singulares: é unidirecional, coerente e monocromática. A unidirecionalidade ocorre porque fótons idênticos se propagam sobre trajetórias paralelas, fenômeno também conhecido como paralelismo ou colimação. Trata-se de uma luz coerente, uma vez que picos e vales de cada onda coincidem em direção, amplitude, comprimento e fase. Por fim, a luz

emitida tem comprimento de onda único, o que caracteriza seus fótons como de “cor pura” ou monocromáticos ^(65,66).

Por se tratar de uma luz, o laser segue os princípios da mesma, podendo sofrer reflexão, refração, absorção, espalhamento e transmissão quando em contato com determinada superfície. Somente a fração absorvida pelo tecido biológico produzirá efeito. Um dos elementos responsáveis pela maior ou menor absorção de determinado comprimento de onda do laser é o cromóforo: molécula pigmentada do tecido que tem seletividade absorptiva, como melanina, hemoglobina e água. Desta forma, pode-se dizer que os tecidos são heterogêneos do ponto de vista óptico, podendo refletir, refratar, bem como absorver ou espalhar energia luminosa de maneiras distintas ⁽⁶⁵⁾. Em última análise, o comprimento de onda é um dos fatores que influi diretamente na profundidade de penetração óptica do laser no tecido, uma vez que em um mesmo tecido, apresenta diferentes coeficientes de absorção frente a diferentes comprimentos de onda. Como exemplo, o laser de CO₂ ($\lambda = 10.600\text{nm}$) é fortemente absorvido pela água, de forma a vaporizar tecidos porque há grande porcentagem de água dentro das células. Diferentemente, o laser de diodo com $\lambda = 980\text{nm}$ tem propriedades hemostáticas excelentes, uma vez que é mais bem absorvido pela melanina e hemoglobina, e menos pela água ^(11,12,67).

Outro fator relevante para reflexão do feixe laser é o ângulo de incidência do feixe com o tecido alvo: quanto menor o ângulo, maior a reflexão. Uma vez absorvida, a energia do fóton pode produzir diferentes interações teciduais. Quando a energia não ultrapassa o limiar de sobrevivência da

célula, mas induz a mesma à biomodulação (estimulando sua membrana ou organela), classifica-se este aparelho como “laser terapêutico” ou laser de potência baixa. Por outro lado, se a energia leva a dano ou morte celular, é possível utilizá-lo para incisões, excisões ou vaporizações e o mesmo é denominado “laser cirúrgico” ⁽⁶⁸⁾.

A “potência óptica útil ou de saída do laser” é expressa em Watts (W), no entanto, esta grandeza isolada não apresenta relevância, pois a energia depositada em determinado tecido depende também do tempo de exposição do mesmo à radiação. Portanto, a “energia” é definida multiplicando-se a potência (W) pelo tempo de exposição (em segundos). O resultado obtido é representado em Joule (J). Outro conceito diretamente relacionado à potência é o tamanho da área irradiada (comumente denominado *spot size*). Denomina-se “irradiância” a potência do laser (W) dividida pela área irradiada (cm²). O conceito de “fluência” talvez seja um parâmetro chave, pois combina os parâmetros previamente mencionados, multiplicando-se a irradiância (expressa em W/cm²) pelo tempo de exposição (em segundos). O resultado é expresso em J/cm². Por meio destes conceitos, é possível entender que uma energia de 20J aplicada a uma área de 1cm² por 1s (irradiância 20W/cm²) tem efeito diferente que os mesmos 20J aplicados na mesma área, porém distribuídos ao longo de 20s (irradiância 1W/cm²) ⁽⁶⁶⁾. O modo de emissão do laser também pode ser controlado. Se optado pela emissão pulsada (chaveada), o laser será emitido em pulsos enquanto a emissão contínua emite luz ininterruptamente.

3.6.2 Laser de diodo

O laser de diodo apresenta como meio ativo um cristal semicondutor, constituído por um diodo chamado Junção P-N: duas regiões semicondutoras dispostas uma sobre a outra, em que há concentração de dopantes (impurezas que alteram as propriedades de uma substância pura) doadoras na zona N (com quantidades extras de elétrons) e receptoras na zona P (com “buracos” para receber elétrons). Quando uma tensão elétrica é aplicada, essa união é polarizada, produzindo uma corrente elétrica que se traduz na passagem de elétrons para zona P, deixando vazios na zona N. Este processo leva à emissão de fótons cuja energia é correspondente à chamada energia de gap do semicondutor. O comprimento de onda depende do salto energético entre a banda de valência e a de condução. Quando a material base é o mesmo em ambas as zonas, denomina-se homojunção. Em geral, lasers de diodo comerciais são do tipo heterojunção, caracterizado pela união de dois materiais distintos, como AlGaAs (arseneto de gálio alumínio), o que lhes confere certas vantagens técnicas em relação à homojunção ⁽⁶⁹⁾.

Uma das diferenças entre lasers de estado sólido e gasoso para lasers de diodo é a fonte de energia. Os primeiros utilizam luz como fonte de bombeio, lâmpadas de *flash* com espectro de emissão largo ou mesmo outro laser, enquanto o segundo utiliza corrente elétrica mediante junções P-N. Ademais, os semicondutores são os emissores de menor dimensão existente, o que permite a comercialização de aparelhos de lasers diodo pequenos, de fácil manuseio e transporte, de durabilidade alta e custo menor; e que podem ser produzidos em larga escala.

Os lasers de diodo comercializados atualmente são capazes de transmitir aos tecidos energia que varia entre alguns mW a 60W ⁽⁷⁰⁾ com comprimento de onda que varia entre 800nm e 2.000nm, dependendo do efeito desejado ^(12,15,71). O comprimento de onda entre 810nm e 830nm, por exemplo, tem absorção seletiva na hemoglobina e pouca absorção na água, e por isso a luz penetra profundamente no tecido até cerca de 4mm a 5mm de profundidade ⁽⁶⁷⁾. Estas características resultam em incisão e coagulação com necrose mínima ⁽⁷²⁾. Já o comprimento de onda de 980nm é mais absorvido pela água e, portanto, produz menos dano térmico lateral ⁽¹²⁾.

Como vantagem especial, a luz do laser de diodo é conduzida por uma fibra óptica delgada e manipulada por meio de uma sonda dirigida pelo cirurgião como um lápis, e sua aplicação por meio de contato direto com o tecido ou a poucos milímetros deste (não contato) ^(10-12,15). Este fato determina mais firmeza e acurácia ao procedimento ⁽¹¹⁾. Na aplicação sob contato direto, a ponta da fibra óptica encosta diretamente na superfície do tecido e pode favorecer tanto ablação (incisões, excisões) quanto vaporização do tecido, dependendo da potência utilizada. Na faixa de potência baixa a média, ocorre ablação e em potências mais altas, vaporização. Abaixo do volume vaporizado de tecido, uma zona de coagulação leva à oclusão imediata de vasos ⁽⁷¹⁾. A técnica de não contato favorece a fotocoagulação, uma vez que sua ação se difunde rapidamente sobre maior superfície de alcance ^(67.71.72). A Figura 3 mostra os efeitos produzidos pelos modos não contato e contato. Não obstante, existe um terceiro modo de aplicação: a intersticial, em que a ponta do laser é introduzida no tecido e sua energia é absorvida localmente.

Esse calor causa necrose tissular via coagulação de forma precoce ou tardia e é usada para tratamento de tumores malignos ou benignos ⁽⁷¹⁾. Seu emprego pode ainda ser de forma contínua ou pulsada. Esta última resulta em ablação de uma porção de tecido a cada impacto e ameniza a temperatura do tecido por causa da pausa e, portanto, evita o efeito térmico cumulativo e reduz a carbonização. Neste modo, a frequência pode ser ajustada, de forma que o tempo de respiração do tecido é maior ou menor conforme a frequência escolhida. O tecido pode se comportar de forma diferente, dependendo da frequência ajustada, uma vez que a interação do laser com o tecido terá tempo de repouso diferente. Já a forma contínua gera o máximo de calor no menor tempo possível ⁽⁷²⁾.



Figura 3 – Diferença entre os efeitos teciduais provocados pelo laser em modo não contato (coagulação) e contato (vaporização coagulação).

3.6.2.1 Laser de diodo em otorrinolaringologia

Trabalhos com lasers de diodo aplicados à otorrinolaringologia pouco a pouco aparecem na literatura mundial. Entre as primeiras publicações relacionadas à otorrinolaringologia está a de Dilkes et al., de 1994⁽⁷³⁾. Os autores apresentam experiência preliminar do grupo ao uso do laser de diodo para comprimento de onda de 810nm. Descrevem os parâmetros utilizados para tonsilectomia, uvulopalatoplastia, turbinectomia e polipectomia nasal ⁽⁷³⁾. A partir deste, diversos outros foram publicados mostrando resultados de laser de diodo em outros procedimentos otorrinolaringológicos, tais como: redução de volume de cornetos, fotocoagulação de telangectasias em paciente com Osler-Weber-Rendu, ablação de papiloma nasal ⁽⁷¹⁾, dacriocistorrinostomia endonasal e endocanalicular ⁽⁷²⁾, miringotomia em otite média com efusão ⁽⁷⁴⁾, cauterização de pequenas lesões vasculares de cabeça e pescoço ⁽⁶⁷⁾, cirurgia de atresia de coana ⁽⁷⁵⁾, litotripsia de sialolitíases ⁽⁷⁶⁾ e ampliação de óstio natural do esenoide visando acesso à glândula pituitária ⁽⁷⁷⁾.

3.6.2.2 Laser de diodo em laringe

O primeiro relato do uso de laser de diodo em laringe data de 1995, apresentado por Wang et al. ⁽⁷⁰⁾, porém o objetivo era utilizá-lo como instrumento de potência baixa (400mW) para “soldar” enxertos livres de mucosa em pregas vocais.

No ano de 2000, Jameson et al.⁽⁷⁸⁾ publicaram um *short scientific communication* revelando a possibilidade de vaporização de granuloma

subglóticos por meio de máscara laríngea e broncoscópio. Os autores utilizaram laser de diodo de 980nm, fibra de 400µm.

A partir de 2003, os autores começam a publicar suas experiências com laser de diodo em tratamentos de doenças laríngeas, tais como para cirurgias de granulomas, laringomalácia, disfonia ventricular, pólipos vocais, *web* laríngeo, papilomas, carcinoma glótico, paralisia de prega vocal bilateral, cisto subglótico, estenose subglótica e hemangioma/linfangioma subglóticos ⁽¹⁰⁻²¹⁾. A Tabela 1 mostra um resumo sobre os 12 estudos mais relevantes, com os respectivos parâmetros utilizados.

Tabela 1 - Dados dos 12 estudos mais relevantes sobre laser de diodo em laringe.

Autores	Ano	País	Quantidade de pacientes operados	Tipo de doença laringea	λ (nm)	Diâmetro da fibra (μm)	Potência (W)	Modo de radiação
Saetti et al. ⁽¹³⁾	2003	Itália	39	Paralisia ppv bilateral	810	300-600	10	--
Ferri et al. ⁽¹⁴⁾	2006	Itália	18	Paralisia ppv bilateral	810	600	10	Contínuo
Saetti et al. ⁽¹²⁾	2008	Itália	27	Hemangioma / infangioma subglótico	810	300-600	5-8	Contínuo/ pulsado
Fanjul et al. ⁽¹⁵⁾	2008	Espanha	21	Diagnósticos variados	820+20	400-600	10-15	-
				(5)				
Ferri et al. ⁽¹⁰⁾	2008	Itália	45	Carcinoma glótico	810	600-1000	5-60	Contínuo
Bajaj et al. ⁽¹¹⁾	2010	Reino Unido	31	Diagnósticos variados	805	400	3-5	Contínuo
				(8)				
Edizer et al. ⁽¹⁶⁾	2013	Turquia	58	Carcinoma glótico	--	--	6-12	Contínuo
Liu et al. ⁽¹⁷⁾	2013	Taiwan	8	Disfonia ventricular	810	1400	máx. 5	Contínuo
Tunçel et al. ⁽¹⁸⁾	2013	Turquia	64	Carcinoma glótico	980	400	4-9	Contínuo
Karasu et al. ⁽¹⁹⁾	2014	Turquia	26	Pólipo vocal	980	400	3-5	Contínuo
Cömert et al. ⁽²⁰⁾	2014	Turquia	72	Carcinoma glótico	980	400	4-9	Contínuo
Karkos et al. ⁽²¹⁾	2016	Grécia	12	Carcinoma glótico	980	-	6-8	Contínuo

λ = comprimento de onda; ppv = pregas vocais; máx. = máximo

Não há um consenso sobre a utilização do laser de diodo, de forma que são citadas combinações variadas de parâmetros. O único parâmetro que apresenta uniformidade entre os autores é o modo de contato, uma vez que todos relataram ter usado a fibra sob contato direto com o tecido. Além disso, o modo contínuo também foi o mais utilizado, mesmo não havendo estudos que permitam comparar sua superioridade em relação ao modo pulsado ⁽²²⁾.

Seis dos 12 autores (50%) citados na Tabela 1, não reportaram efeitos colaterais ou complicações com uso do laser de diodo em laringe. Granulomas e sinéquia posterior foram descritos no tratamento de paralisia de pregas vocais ⁽¹³⁾. Sinéquia traqueal e granuloma subglótico foram relacionados ao tratamento de hemangioma e linfangioma subglóticos ⁽¹²⁾. Quanto ao tratamento de câncer glótico, não foi descrito caso de edema com necessidade de traqueostomia. Complicações descritas no intraoperatório foram a exposição da cartilagem tireóidea e fogo no tubo da intubação. Dois pacientes evoluíram com enfisema que se resolveu espontaneamente em um dia ⁽¹⁶⁾. No período pós-operatório, foram descritos sinéquia e granuloma ⁽¹⁸⁾. Outros efeitos colaterais raros foram infecção, halitose (em pacientes submetidos a cirurgias mais extensas), estenose laríngea ⁽¹⁶⁾, hemorragia e formação de fístula ⁽¹⁸⁾.

Não há trabalhos que mostrem forma ou extensão da lesão provocada com laser de diodo em laringe e tampouco as reações histológicas e cicatriciais no seu emprego.

3.6.3 A injúria térmica do laser de diodo em mucosas

Histologicamente, a injúria térmica é caracterizada por destruição do tecido com separação entre epitélio e membrana basal, dilatação vascular, desorganização hialina e citoplasma eosinofílico, quadro chamado de necrose coagulativa ^(79,80).

Apenas dois trabalhos apresentam estudos histológicos em mucosas após a utilização do laser de diodo ^(81,82). Em 2002, pesquisadores alemães publicaram comparação entre os lasers de CO₂ ($\lambda = 10.600\text{nm}$), Argon-ion ($\lambda = 488\text{nm}$ e 514nm), Nd:YAG ($\lambda = 1.064\text{nm}$), Ho:YAG ($\lambda = 2.080\text{nm}$) e diodo ($\lambda = 940\text{nm}$) aplicados em produtos de turbinectomia inferior parcial. Cada laser foi aplicado no tecido removido, 15min após a cirurgia, por meio de um braço mecânico a uma velocidade de 3mm/s ao longo do corneto, todos ajustados a 8W de potência, com ângulo de 30° e não contato com tecido, e densidade de energia cerca de 1,6kW/cm². Com ajuda de microscopia eletrônica, foram medidas áreas de ablação, coagulação e diâmetro de lesão nos tecidos. O laser de diodo mostrou área de ablação reduzida (média de 200-300 μm), seguida de área de coagulação extensa de 600-700 μm ⁽⁸¹⁾. Ainda não são conhecidas áreas de ablação e coagulação do laser de diodo em pregas vocais.

Em 2007, D'Arcangelo et al.⁽⁸²⁾ realizaram estudo em mucosa oral de 24 ratos, utilizando laser de diodo de 808nm, fibra de 400 μm , a 0,5cm do tecido (não-contato), modo contínuo e potência entre 4W e 6W. Foi feita incisão longitudinal de 15mm a 20mm no palato duro, com duração

média do procedimento de 6s. Paralela à essa, foi realizada outra incisão com lâmina 15. Os animais foram divididos em grupos e sacrificados com sete e 14 dias do pós-operatório. As peças foram analisadas por histologia e imunohistoquímica para marcadores inflamatórios derivados do óxido nítrico. Os autores mostraram que a incisão e a coagulação foram excelentes durante o procedimento com laser de diodo, no entanto, a cicatrização foi bastante comprometida naqueles tecidos que receberam irradiação com potência de 6W, comprovando que a absorção excessiva de energia pode induzir dano térmico com necrose extensa e tecido carbonizado. Por outro lado, o laser regulado à potência de 4W diminuiu a precisão da incisão, porém minimizou dano térmico no tecido ⁽⁸²⁾. Não se sabe de que forma diferentes potências podem influenciar no dano térmico de pregas vocais.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Foi realizado estudo exploratório em animais.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 177/13 em 26 de junho de 2013 (Apêndice 1).

Os coelhos não sofreram ferimentos ou procedimentos desnecessários, respeitando-se as normas éticas postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com a lei nº 11.794/08, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais ⁽⁸³⁾.

4.2 Local e amostra do estudo

Os procedimentos foram realizados no Centro de Bioterismo da FMUSP. Em estudo piloto, quatro coelhos foram utilizados para definir parâmetros (ver item 4.7.1). Para o estudo em si, foram utilizados 22 coelhos, destes, 21 foram igualmente divididos em três grupos de sete animais; um coelho foi sacrificado sem ser submetido a procedimentos para que sua prega vocal fosse utilizada como parâmetro histológico de uma prega vocal normal.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

4.3.1 Critérios de inclusão

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

4.3.2 Critérios de exclusão

- Coelhos em uso de anti-inflamatórios;
- Coelhos com ferimentos em qualquer área do corpo ou em recuperação de qualquer dano;
- Coelhos com laringoscopia difícil ou qualquer outra alteração da morfologia ou função laríngea.

4.4 Formação dos grupos e aleatorização

Os coelhos foram divididos em três grupos com sete animais cada. A forma de utilização do laser de diodo pode ser bastante ampla em função da combinação de parâmetros que ele permite. Os “parâmetros fixos” foram aqueles que se repetiam em todos os procedimentos de um mesmo grupo, e os “parâmetros variáveis” aqueles cujas opções de ajuste seriam comparadas entre si, em cada experimento. Cada prega vocal serviu como parâmetro para sua correspondente contralateral, ou seja, as comparações com relação ao

parâmetro variável foram feitas entre pregas vocais de um mesmo animal. Foram selecionados os parâmetros variáveis seguintes: frequência de onda (medida em Hertz), potência (medida em Watts) e modo de energia (pulsado ou contínuo). A energia total dispendida (E), em cada procedimento, é expressa em Joules (J), calculada por multiplicação da potência utilizada pelo intervalo de tempo em segundos ($E = \text{Potência} \times \Delta t$), quando no modo contínuo. Para os parâmetros selecionados, no modo pulsado a fórmula é a mesma, porém divide-se o resultado por 2, uma vez que o *duty cycle* foi mantido fixo em 50%. Este parâmetro é dado pela razão entre a largura do pulso (s) e o período T (s) (inverso da frequência) da operação pulsada do laser, e consiste na fração de tempo em que o laser se encontra ligado no modo de operação pulsada ou modulada. No caso da frequência de 10Hz (período de 100ms), a largura de pulso utilizada foi de 50ms; já na frequência de 1kHz (período de 1ms), a largura de pulso empregada foi de 0,5ms, ambos resultando em 50% (daí a divisão da energia pelo fator de 2). Segue abaixo a distribuição dos grupos (Figura 4):

- Grupo I (coelhos de 1 a 7): parâmetros fixos: modo pulsado, potência de 3W. Como parâmetros variáveis, foram comparadas duas frequências de pulsação: 10Hz ($E = 30\text{J}$) *versus* 1000Hz ($E = 30\text{J}$);
- Grupo II (coelhos de 8 a 14): parâmetros fixos: modo pulsado, frequência de 10Hz. Como parâmetros variáveis, foram comparadas duas potências: 3W ($E = 30\text{J}$) *versus* 5W ($E = 50\text{J}$);

- Grupo III (coelhos de 14 a 21): parâmetro fixo: potência de 3W. Como parâmetros variáveis, foram comparados dois modos: pulsado a 10Hz (E = 30J) *versus* contínuo (E= 60J).

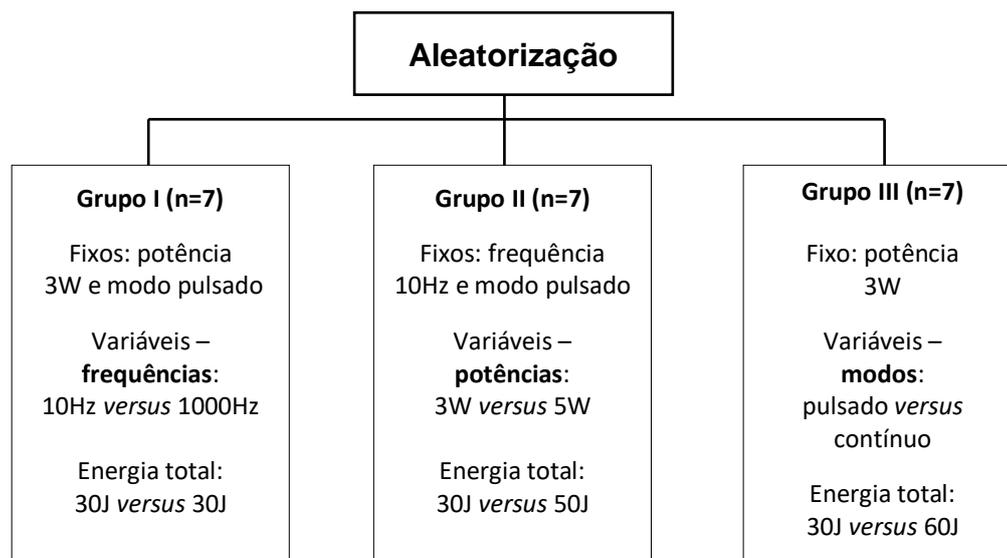


Figura 4 - Organograma de aleatorização dos parâmetros variáveis.

Para cada grupo, as pregas vocais de um mesmo coelho foram aleatorizadas quanto ao recebimento do parâmetro através lista criada pelo sítio da internet *randomization.com*. Assim, o parâmetro variável se alternou com relação ao lado a ser aplicado em cada procedimento (exemplo: no Grupo I, a prega vocal direita (PVD) do “coelho 1” recebe 10Hz e a prega vocal esquerda (PVE) 1000Hz; no “coelho 2”, a PVD recebe 1000Hz e a PVE 10Hz – conforme aleatorização). Desta forma, minimizou-se vícios cirúrgicos e facilitou-se cegamento do pesquisador (que não teve acesso à lista de

aleatorização durante o ato cirúrgico e tampouco aos parâmetros selecionados no aparelho, ato realizado pelo responsável técnico do laser (Anexo A). O pesquisador respeitou a alocação cega, seguindo a ordem temporal dos procedimentos.

4.5 Procedimento pré-operatório

Os animais foram mantidos em jejum por 3h antes do procedimento cirúrgico. Foram pesados e identificados com tatuagem na pele da orelha esquerda.

4.6 Anestesia

Os animais foram sedados com xylazina (5mg/kg) associada à quetamina (50mg/kg) via intramuscular e mantidos sob ventilação espontânea.

4.7 Procedimento cirúrgico

Após a anestesia, os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal, hiperextensão cervical com coxim dorsal e submetidos à laringoscopia direta,

com ajuda de laringoscópio adaptado para coelhos, desenvolvido pelo grupo de pesquisa em laringe da FMUSP, sob coordenação de Dr Domingos Tsuji e confeccionado pela Ferrari® Medical de São Paulo, conforme já utilizado e descrito por Campagnolo et al. (2010)⁽⁸⁴⁾, Garcia et al. (2012)⁽⁸⁵⁾, Takahashi-Ramos (2014)⁽⁸⁶⁾. O laringoscópio (Figura 5) foi desenvolvido a partir de um modelo baseado em um espéculo nasal de Killian que foi adaptado para laringe de coelhos.

Após a laringoscopia, foi introduzido telescópio rígido angulado de 30° (Karl Storz®, 4mm, Alemanha) conectado a uma câmera de vídeo para endoscopia (modelo MFX 10H, Ferrari® Medical, Brasil) e as imagens foram visualizadas na tela de um *laptop* (Figuras 6 e 7).

Foi utilizado o laser de diodo Medilaser 980nm (DMC, São Carlos, SP), empregando-se fibra óptica de 400µm de diâmetro (Modelo: Kit Introdutor para Cateter FO 400, DMC, São Carlos, SP) por meio de uma ponteira angulada, própria para laringe de coelhos (Cânula ENT Modelo X2-400-10-140-30 ST, DMC) (Figuras 8 e 9). O procedimento foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador, que estava cego ao parâmetro utilizado.



Figura 5 - Laringoscópio adaptado para laringe de coelhos (visão anterior), acoplado ao seu suporte (base).



Figura 6 - Posicionamento do animal na mesa cirúrgica e do pesquisador ao realizar a laringoscopia no coelho.

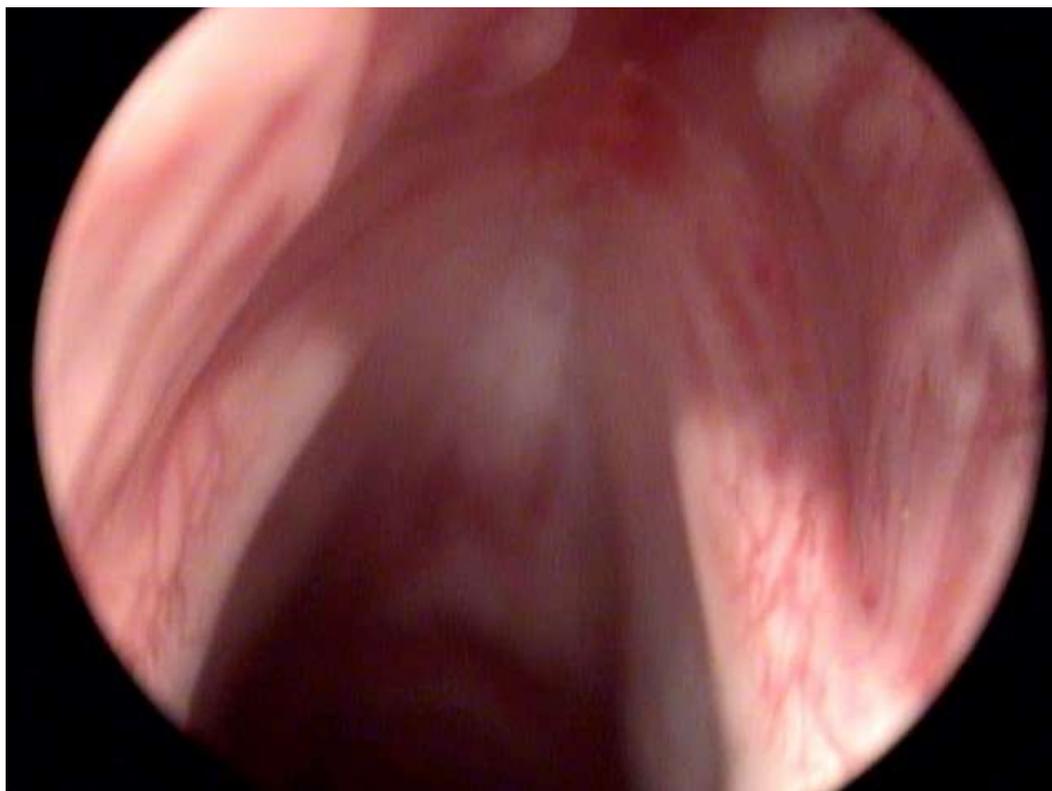


Figura 7 - Imagem endoscópica das pregas vocais do coelho, visualizadas por laringoscopia, endoscópio angulado de 30° e transmitida para a tela do computador.



Figura 8 – Equipamento de laser de diodo de 980nm, DMC, São Carlos-SP.

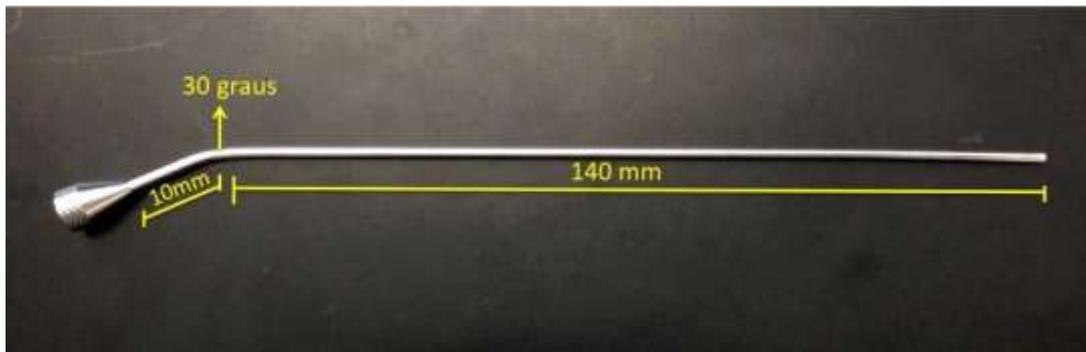


Figura 9 - Ponteira angulada para a passagem de fibra óptica do laser e suas dimensões - adaptada para laringe de coelhos, DMC, São Carlos-SP.

4.7.1 Padronização da lesão

Todos os parâmetros e o tempo de lesão mencionados foram definidos mediante estudo piloto. No estudo piloto inicial com dois coelhos, foi realizada laringofissura e decorticação da prega vocal com laser. Foram feitos cortes axiais das laringes excisadas para análise histopatológica, em lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E). À análise microscópica, observou-se reação inflamatória extensa em torno da cartilagem tireóidea, suturada com fio reabsorvível. Tal lesão grave, poderia influenciar na análise da cicatrização das pregas vocais (Figura 10).

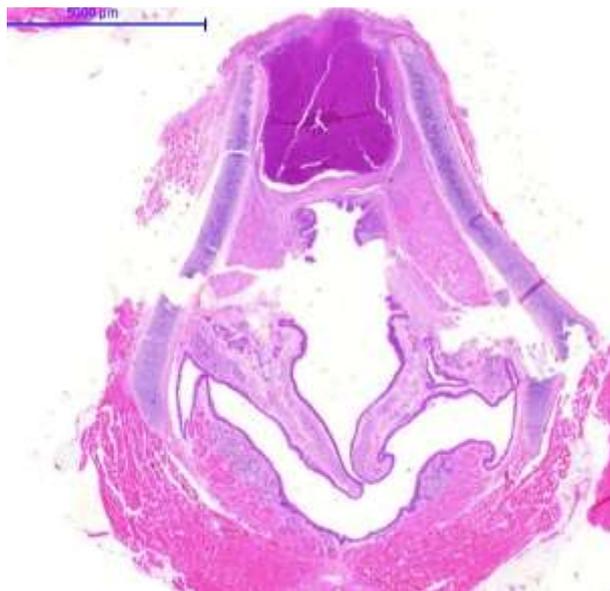


Figura 10 – Imagem de corte axial de laringe de coelho em estudo piloto inicial. Notar a reação inflamatória em torno da cartilagem tireóidea na região da sutura na laringofissura.

Em um segundo estudo piloto, realizou-se laringoscopia direta em dois coelhos. Lesões pontuais foram realizadas em diferentes tempos e parâmetros para determinar uma lesão com laser de diodo que pudesse ser estudada em sua fase aguda (sete dias) de forma evidente e clara.

No presente estudo, portanto, optou-se por uma única lesão pontual em cada prega vocal como já descrito por outros autores ^(37,79). Além disso, antes de cada aplicação do laser, foi realizada clivagem da fibra, bem como pré-carbonização de sua ponta em papel carbono e subsequente acionamento do laser (20s) antes de sua utilização, para que todas as fibras emitissem o mesmo padrão de irradiação. Durante o procedimento, a fibra ficou sob contato direto com o tecido, superficialmente ao mesmo, de forma que o pesquisador tocava com a fibra do laser na prega vocal em ângulo de 90°, sem aprofundar a fibra na mesma. O procedimento iniciava-se apenas

quando o pesquisador se certificava de que não havia pressão na prega vocal, apenas contato com a fibra. O tempo foi padronizado em 20s no mesmo local, para realizar lesão pontual na prega vocal (Figura 11). O parâmetro a ser pesquisado foi ajustado conforme os grupos expostos no item 4.4.

O coelho que teve sua prega vocal utilizada como parâmetro histológico de normalidade também foi anestesiado e submetido à laringoscopia direta conforme descrito, para que se certificasse de que não haviam alterações em suas pregas vocais. O coelho foi sacrificado no mesmo dia.

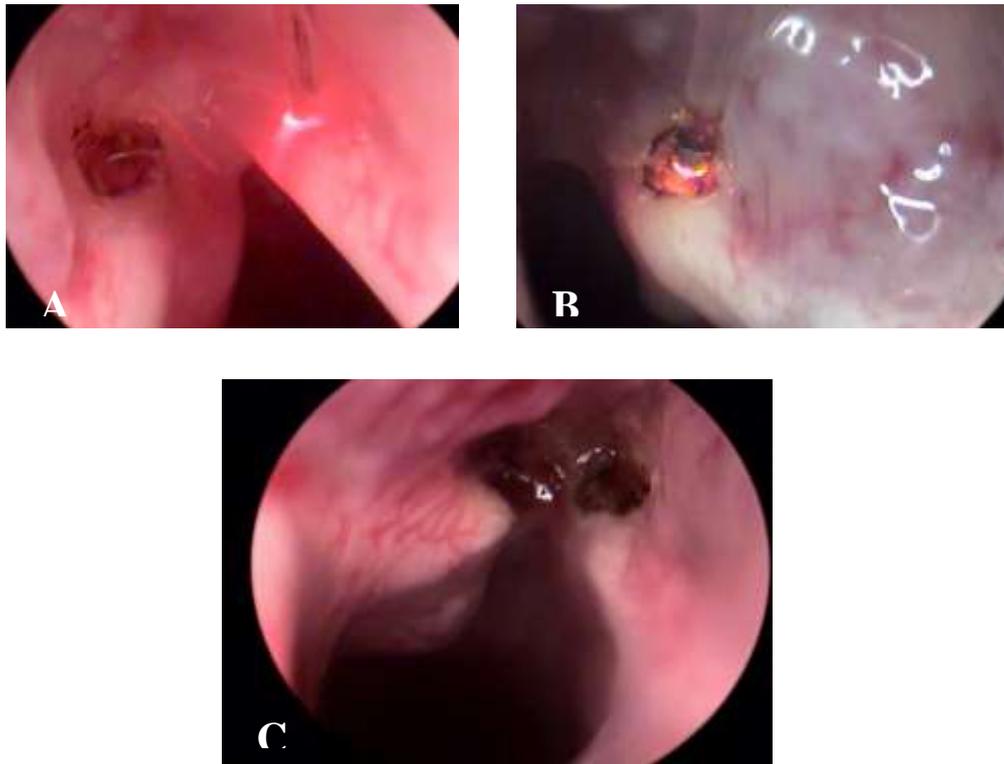


Figura 11 - Imagens intraoperatórias: **(A)** lesão em pontual em PVE e fibra sobre PVD antes de lesionar, detalhe do contato da fibra com o tecido sem pressão sob o mesmo; **(B)** fibra do laser durante lesão pontual em PVD; **(C)** aspecto final, imediatamente após o término do procedimento em animal do Grupo II (Potência: PVE – 5W e PVD – 3W).

4.8 Procedimento pós-operatório

Após a cirurgia, os coelhos permaneceram sob os cuidados do pesquisador por pelo menos 1h. Posteriormente, foram mantidos em gaiolas individuais no Centro de Bioterismo da FMUSP, onde foram alimentados, medicados e cuidados em ambiente adequado. Os animais foram medicados com antibiótico de uso veterinário Flotril® 10% (Enrofloxacina - Laboratório Schering-Plough Saúde Animal Ind. Com. Ltda., Brasil) em dose única diária por três dias, na concentração de 2,5mg/kg. Em seres humanos, a fonocirurgia é um procedimento que causa pouca dor no período pós-operatório, no entanto, ao serem observados sinais de desconforto no animal, foram administrados analgésicos via intramuscular (opióides a 0,3mg/kg).

4.9 Eutanásia, coleta e isolamento das laringes

Após sete dias, os animais de todos os grupos foram sacrificados sem sofrimento da maneira seguinte: primeiramente foram anestesiados (quetamina 50mg/kg associada a xilazina 10mg/kg), e em plano profundo foi administrado propofol 10mg/mL. O sacrifício dos animais e a coleta da laringe também ocorreram no Centro de Bioterismo da FMUSP. Após certificar-se do sacrifício, foi realizada incisão na linha média cervical do coelho (Figura 12) e excisão da laringe em bloco (da epiglote até o primeiro ou segundo anel traqueal). As peças foram dissecadas, removendo-se as partes moles e

isolando-se a laringe (Figura 13A). As laringes excisadas foram colocadas em fixador (formaldeído 10% tamponado com acetato de sódio) por 24h. A seguir, foi realizada incisão longitudinal posterior entre as cartilagens aritenóides, seguida de uma incisão mediana anterior (Figura 13B). As cartilagens tireoide, PV e aritenóide de cada hemilaringe foram ressecadas em bloco por incisão longitudinal paralela à PV, entre o ventrículo laríngeo e a subglote. As peças foram colocadas em cassetes, identificadas adequadamente e transportadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais que não foram mais úteis no experimento, após o sacrifício, foram acondicionados em sacos plásticos brancos e congelados em *freezer* até serem enviados para incineração, juntamente com o lixo hospitalar (segundo instruções do Manual de Normas Técnicas Biotério de Experimentação Animal Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas – USP). Não houve intercorrências e todos os animais sobreviveram até o dia de seu sacrifício (sétimo dia).

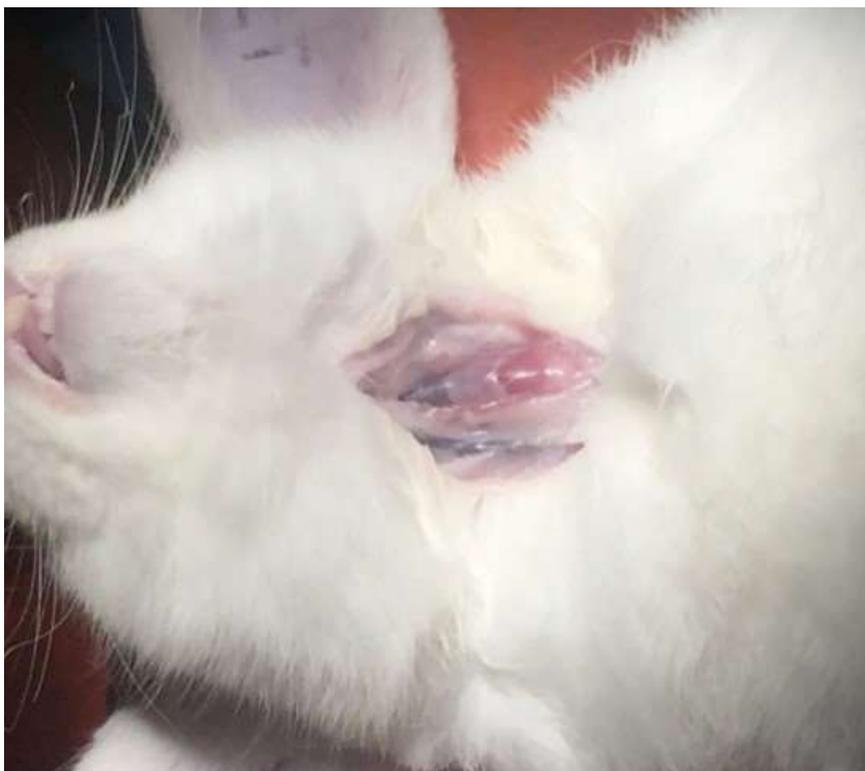


Figura 12 - Cervicotomia em coelho, após sacrifício, com identificação da laringe.

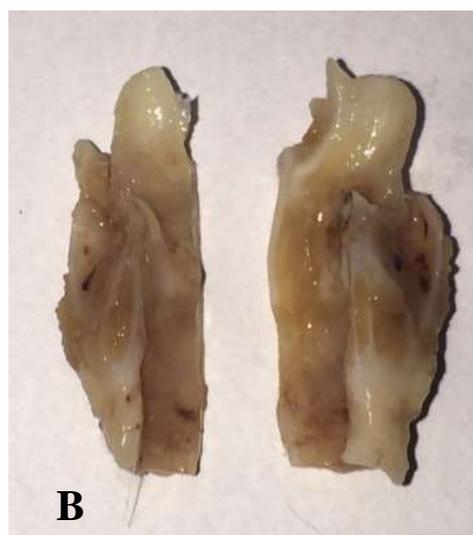


Figura 13 - Imagens das peças: **(A)** Laringe fresca excisada, exame macroscópico a fresco, visão anterior; **(B)** hemilaringes formolizadas, visão posterior.

4.10 Preparação histológica

As peças foram desidratadas com álcool etílico a 95%, submetidas à diafanização em xilol e impregnadas. O pesquisador incluiu cada peça em parafina fundida em estufa a 60°C, com a porção anterior da cartilagem tireóidea voltada para baixo. A seguir, foram orientadas, desbastadas e cortadas em lâminas no plano coronal em micrótomo, com espessura de 3µm, em direção anteroposterior, de forma seriada, até o final da lesão. Em seguida, foram desparafinizadas e silanizadas. Uma a cada cinco lâminas da série preparada foi corada com hematoxilina-eosina. Uma quantidade variável de lâminas foi confeccionada para cada peça. Todo o processo (exceto inclusão em parafina) foi sempre realizado pelo mesmo técnico.

As lâminas coradas com H&E foram analisadas pelo pesquisador e dois patologistas, até que se obtivesse a melhor visualização das estruturas a serem analisadas, procurando-se sempre o centro da lesão. A lâmina com H&E selecionada era referência para as próximas colorações. Todas as lâminas selecionadas para o estudo passaram pelo processo de digitalização com auxílio do *scanner* Panoramic Scan (3DHistech, Budapeste, Hungria) e transportadas para o *software* Panoramic Viewer® 1.3 para Windows® (3DHistech, Budapeste, Hungria) (Figura 14).

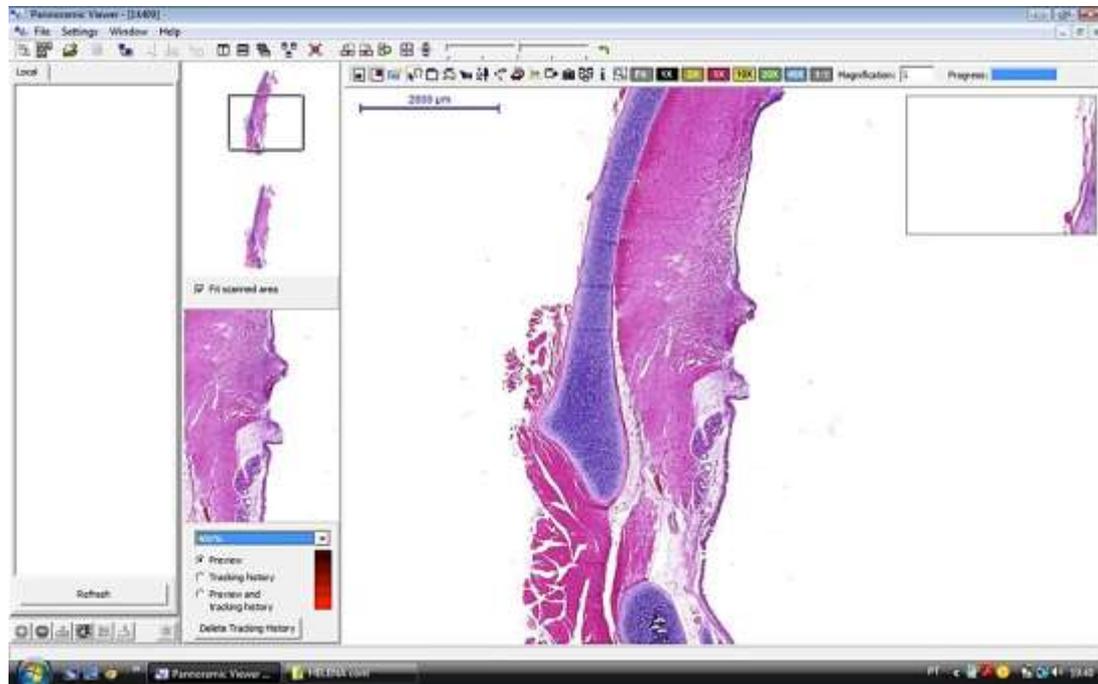


Figura 14 - Interface do programa de análise digital de imagem que mostra a micrografia com corte histológico de prega vocal corada com H&E em sua visão panorâmica (canto superior esquerdo), zoom de 400% (canto inferior esquerdo) e no centro da tela o aumento desejado (Aumento de 10x).

4.11 Análise histológica das pregas vocais

4.11.1 Técnica de coloração com hematoxilina-eosina

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram analisadas por um patologista juntamente com o pesquisador quanto ao processo inflamatório mediante análises objetivas (variáveis contínuas, em micrometros - μm) e subjetivas (variáveis categóricas/ordinais).

Primeiramente, as análises objetivas foram realizadas por meio de um comando do programa Panoramic Viewer®, com o qual se delimitou a extensão do processo inflamatório (sentido crânio caudal da lâmina H&E, ou seja, de supraglote até a subglote na peça) bem como a profundidade do processo inflamatório (no sentido do epitélio para a cartilagem). Seguiu-se com a medida da extensão linear da úlcera (quando existente) - sentido crânio caudal da lâmina, ou seja, de supraglote para subglote, bem como a profundidade da úlcera (no sentido do epitélio para cartilagem). Todas essas variáveis foram expressas em micrometros. Para essa avaliação, foi utilizado aumento de 10X (Figura 15)

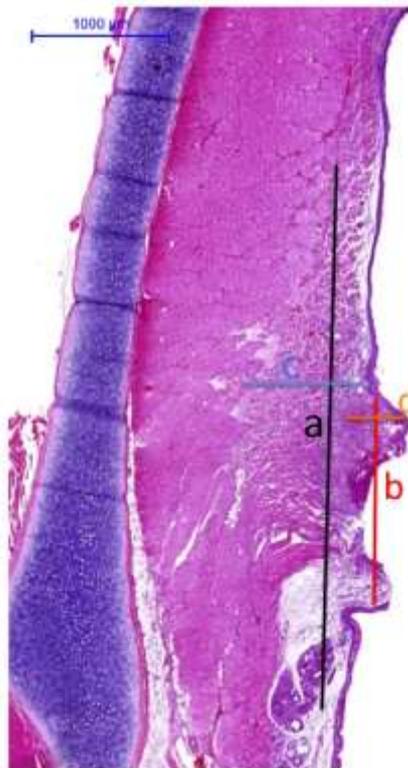


Figura 15 - Corte coronal de prega vocal direita de um coelho do Grupo 1 em aumento de 10x, evidenciando: **(a)** extensão do processo inflamatório, **(b)** extensão linear da úlcera, **(c)** profundidade do processo inflamatório, **(d)** profundidade da úlcera.

Para as análises subjetivas, os dados foram categorizados da forma descrita a seguir. O processo inflamatório foi avaliado utilizando-se um *score* de 0 a 3, de modo que: 0 = ausência de reação inflamatória; 1 = leve infiltrado inflamatório (menos de 25% de células inflamatórias na área analisada); 2 = moderado infiltrado inflamatório (entre 25 a 50% de células inflamatórias); 3 = infiltrado inflamatório acentuado (mais de 50% de células inflamatórias) ^(82,85). O tipo de infiltrado apresentado foi classificado como: 1 = supurativo; 2 = misto; 3 = linfomononuclear ou 4 = granulomatoso. O edema de lâmina própria e a quantidade de eosinófilos foram graduados em: 1 = pouco; 2 = moderado; 3 = intenso. A extensão da lesão foi graduada conforme a profundidade: 1 = se atinge camada muscular superficial; 2 = camada muscular profunda; 3 = pericôndrio; ou, 4 = atinge a cartilagem ⁽³⁷⁾. Foi considerada a presença ou ausência de exocitose, espongiose, bolha, ulceração, necrose coagulativa, fibroblastos e fibrose (presença = 1; ausência = 0). A integridade do epitélio foi avaliada quanto a reepitelização (se reepitelização completa = 1 ou não = 0). Para todas essas análises, foram utilizados aumentos variados.

4.11.2 Técnicas de coloração com resorcina-fucsina e picrossírus red

Para a análise de fibras elásticas, foi utilizada coloração resorcina-fucsina. As fibras do sistema elástico são dotadas de um conjunto de caracteres histoquímicos que aumentam grandemente sua afinidade tintorial, facilitando sua evidência seletiva. As lâminas coradas com resorcina-fucsina foram precedidas de oxidação pela oxona-resorcina-fucsina oxidada

(RFO). Foram selecionados cortes imediatamente anteriores àqueles escolhidos para coloração com H&E.

A coloração picrossírus red foi realizada a fim de estudar as fibras colágenas. As moléculas de colágeno, ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente com corantes ácidos. Os cortes foram desparafinados, hidratados e corados durante 1h em solução de sirus red a 1%, dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram rapidamente lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 5min. Em seguida, foram lavados e montados. Para esta coloração, foram selecionados cortes imediatamente posteriores àqueles escolhidos para coloração com H&E. Foi utilizada visualização sob luz convencional.

As lâminas dessas duas colorações passaram pelo processo de digitalização descrito no item 4.10 e foram transportadas para o programa Panoramic Viewer[®], em que foi selecionada área que continha extensão total da lesão de cada lâmina e tal imagem foi exportada em sua resolução máxima (1024x1024) para arquivos no formato TIFF e posteriormente convertidas para formato JPG. Utilizou-se então o programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) para análise das imagens. Neste programa, foi definido o espectro de cores para cada coloração. A fibra de interesse (colágena ou elástica) a ser analisada, foi identificada e determinada como “positivo” para então ser salva na forma de um padrão, aplicado em todas análises correspondentes. Para isso, diferentes amostras de imagens de cada coloração, assim como controles negativos, foram analisadas por patologistas experientes do Departamento de Patologia da FMUSP. Por meio de um

comando do programa, foi realizada a quantificação da fibra de interesse e da área total analisada, ambos expressos em μm^2 (Figura 16). Posteriormente, foi obtida a razão da área da fibra em questão em relação à área total de tecido analisado, valor expresso em porcentagem. Nos arquivos em que a imagem se apresentava extensa e o programa não suportava medir a área toda de uma única vez, as medidas foram realizadas por segmentos e somadas.

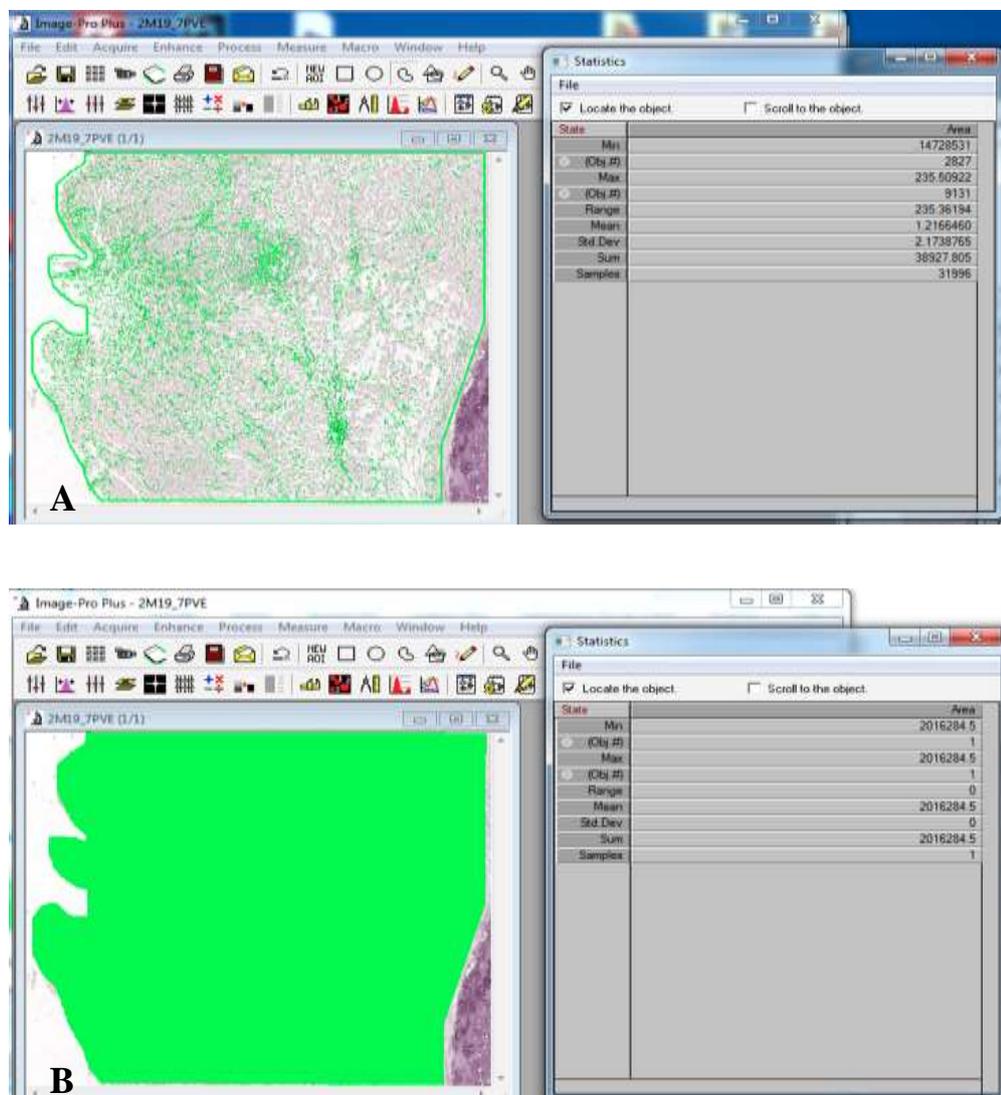


Figura 16 – Interface do programa de análise digital de imagem que mostra: **(A)** micrografia com delimitação da área de interesse e reconhecimento das fibras colágenas, marcando-as em verde; **(B)** micrografia com marcação da área total da lesão. Ambas expressas em μm^2 e em aumento de 100x.

4.11.3 Técnica de imuno-histoquímica

Os cortes histológicos com 3µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma) e seguiu-se o protocolo descrito abaixo:

4.11.3.1 Hidratação e bloqueio

As lâminas foram desparafinadas e hidratadas, e seguiu-se o bloqueio com ácido fórmico por 3min, lavagem com água corrente e água destilada. Posteriormente seguiu-se com bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂)10V 3% por quatro vezes de 5min cada, com posterior lavagem com água corrente, água destilada e TBS/Tween, nesta sequência.

4.11.3.2 Recuperação antigênica

Para o Colágeno I a recuperação antigênica foi obtida em temperatura alta, em tampão citrato pH = 6, em panela de pressão à 121°, por 3min. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e em TBS/Tween, nesta ordem.

Para o Colágeno III a recuperação antigênica foi feita com proteinase K por 30min em estufa a 37°C. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e em TBS/Tween, nesta ordem.

4.11.3.3 Incubação com os anticorpos primários e secundários

Os anticorpos primários Colágeno I (USBiological, MA, USA), título 1:1000, e o Colágeno III, título 1:50 (Santa Crus Biotechnology, CA, USA),

foram aplicados sobre os cortes e as lâminas incubadas *overnight*.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBS/Tween e incubadas em estufa à 37°C com anticorpo secundário Vectastain anti-Goat (Vector Laboratories, CA, USA) para ambos anticorpos.

4.11.3.4 Revelação

Após a etapa anterior, as lâminas foram lavadas em PBS/Tween e seguiu-se a revelação com cromógeno 3,3 diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich, USA). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e em água destilada e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente e em água destilada, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Alemanha).

4.12 Análise estatística

Os dados contínuos mostraram distribuição assimétrica (não normal) e a casuística pequena, por isso foram avaliados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. Foi usado o programa STATA version 11.2 (Stata Corp, College Station, TX, USA) para as análises e adotou-se o nível de significância de 0,05. Considerou-se este, um estudo exploratório e não foram adotadas medidas para corrigir o erro tipo I decorrente de múltiplas comparações.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Variáveis de interesse

5.1.1 Processo inflamatório

Alguns achados se repetem entre as lâminas coradas com H&E, o que caracteriza reações em comum ao uso do laser de diodo: exocitose de células inflamatórias; edema de mucosa e submucosa; infiltrado celular extenso em torno da úlcera, composto por polimorfonucleares (especialmente eosinófilos), linfócitos e histiócitos; tecido de granulação com a presença de fibroblastos e vasos neoformados; e, áreas de necrose do tipo coagulativa.

Em alguns casos (dois do Grupo I, quatro do Grupo II e dois do Grupo III), observou-se formação de abscesso supurativo na área de lesão. Em outros (um do Grupo II e dois do Grupo III), houve alteração semelhante a uma metaplasia cartilaginosa (Figura 17).

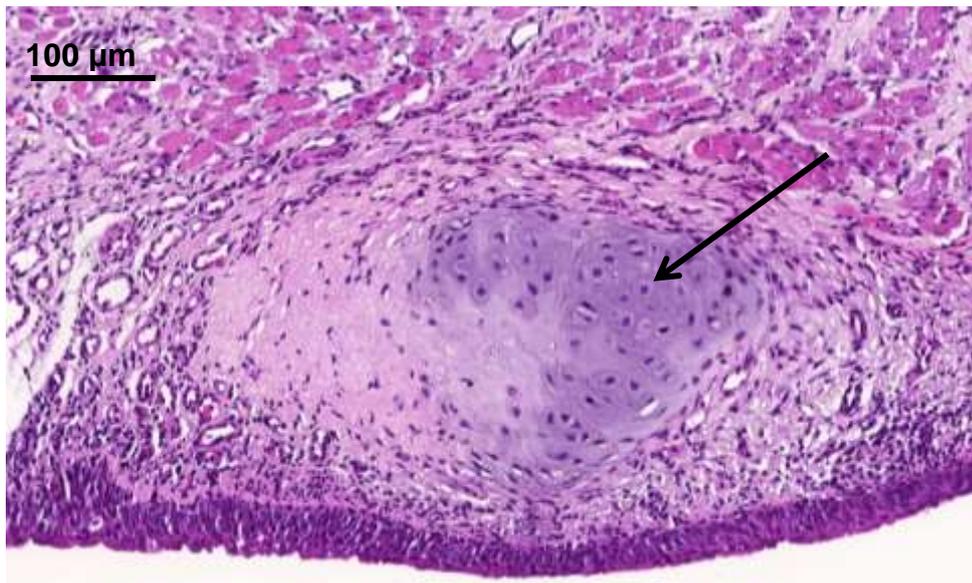


Figura 17 - Prega vocal direita de um coelho do Grupo III que apresenta metaplasia cartilaginosa (seta). (Aumento de 200x).

No Grupo I (em que se comparou as frequências de pulsação 10Hz *versus* 1.000Hz), apesar de a extensão linear da úlcera e a profundidade da úlcera apresentarem medidas relativamente maiores com uso da frequência ajustada em 1.000Hz, não houve diferença estatisticamente significativa nas análises objetivas (extensão do processo inflamatório, profundidade do processo inflamatório, extensão linear da úlcera e profundidade da úlcera) e tampouco das análises subjetivas (grau de inflamação, tipo de infiltrado presença ou ausência de exocitose, espongirose, bolha, ulceração, necrose coagulativa e fibrose; edema de lâmina própria e quantidade de fibroblastos e de eosinófilos), Tabelas 2 e 3.

Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I são mostrados na Figura 18.

Tabela 2 - Comparação das variáveis inflamatórias objetivas (contínuas) analisadas com H&E dos Grupos I, II e III (Teste de Wilcoxon).

Descrição	Grupo I Média (DP) (μm)		p	Grupo II Média (DP) (μm)		p	Grupo III Média (DP) (μm)		p
	10Hz	1.000Hz		3W	5W		pulsado	contínuo	
Extensão do processo inflamatório	3730,87 (1942,71)	4157,67 (2136,65)	0,735	4628,83 (794,43)	6880,74 (1332,67)	0,018	7711,28 (4365,17)	11124,26 (4160,99)	0,018
Extensão linear da úlcera	565,65 (895,79)	1657,02 (1414,80)	0,102	1547,97 (992,02)	2840,39 (1194,11)	0,018	993,39 (1078,95)	2884,04 (2375,96)	0,028
Profundidade do processo inflamatório	1131,37 (670,97)	1235,40 (834,57)	0,866	1753,90 (311,82)	1805,10 (387,38)	0,865	1179,23 (645,09)	1491,27 (431,90)	0,091
Profundidade da úlcera	145,68 (206,09)	415,34 (549,18)	0,102	295,61 (221,54)	199,66 (147,72)	0,398	186,67 (309,62)	255,64 (300,67)	0,028

DP = desvio padrão; p = significância

Tabela 3 - Comparação das variáveis inflamatórias subjetivas (categóricas) analisadas com H&E dos Grupos I, II e III (teste de Fisher).

Discriminação	Grupo 1 Mediana (IIQ)		Grupo 2 Mediana (IIQ)		Grupo 3 Mediana (IIQ)	
	10Hz	1000Hz	3W	5W	Pulsado	Contínuo
Grau de inflamação	3 (1,5)	2 (1)	3 (1)	3 (1)	3 (1,5)	3 (0)
Tipo de infiltrado	2 (0,5)	1 (1)	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (0,5)	2 (0)
Edema da lâmina própria	3 (1)	3 (0)	3 (1)	3(0)	3 (0,5)	2 (1)
Eosinófilos	2 (1)	2 (2)	2 (1)	2 (0,5)	2 (2)	3 (0,5)
Profundidade	2 (1,5)	3 (1,5)	3 (0)	3 (0)	*2 (2)	*3 (0)
Exocitose	1 (0)	1(0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
Espongiose	0 (1)	1 (1)	1 (0)	1(0)	1 (0)	1 (0)
Bolha	0 (0)	0 (1)	0 (0,5)	0 (0,5)	0 (1)	0 (1)
Ulceração	0 (1)	1 (0,5)	1 (0)	1(0)	1 (1)	1 (0,5)
Necrose coagulativa	0 (1)	0 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)	1 (0)
Fibroblastos	1 (0)	1(0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
Fibrose	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
Reepitelização	0 (0,5)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* = p (significância)<0,01; IIQ = intervalo Interquartil

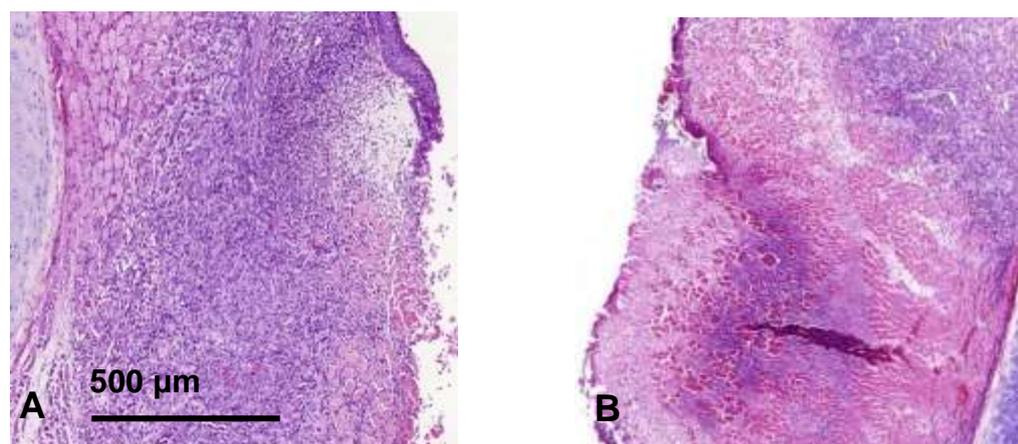


Figura 18 - Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo I; **(A)** Prega vocal direita que recebeu frequência de pulsação de 1.000Hz; **(B)** Prega vocal esquerda que recebeu frequência de pulsação de 10Hz. (Aumento de 50x).

No Grupo II, em que foram comparadas as potências de 3W versus 5W, a extensão do processo inflamatório e a extensão linear da úlcera (ambas no sentido crânio caudal na laringe) apresentaram diferença significativa entre as duas potências, sendo maior com uso do laser a 5W. (Tabela 2)

Não houve diferença estatisticamente significativa na profundidade do processo inflamatório e da úlcera; e tampouco nas análises subjetivas (Tabela 3).

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II, podem ser vistos na Figura 19.

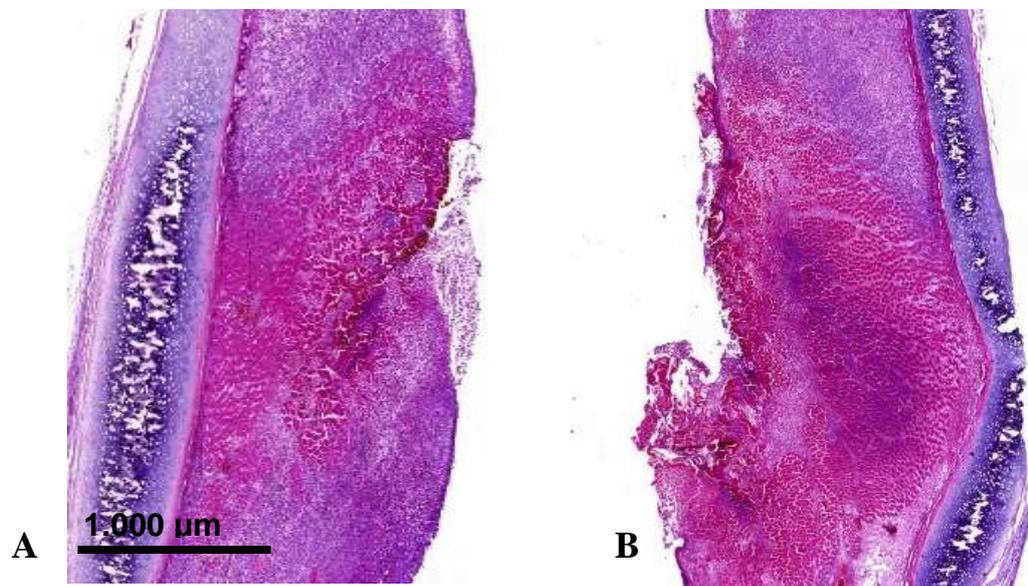


Figura 19 - Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo II; **(A)** Prega vocal direita que recebeu feixe laser com potência de 3W; **(B)** Prega vocal esquerda que recebeu feixe laser com potência de 5W. (Aumento de 20x).

No Grupo III, comparou-se os modos pulsado (10Hz) *versus* contínuo. Das variáveis objetivas, a extensão do processo inflamatório e a extensão linear da úlcera (ambas no sentido crânio caudal na laringe); além da profundidade da úlcera (sentido epitélio-cartilagem) apresentaram diferença significativa entre os dois modos de emissão do laser, maior no modo contínuo (Tabela 2). Das análises subjetivas, a profundidade do processo inflamatório (sentido epitélio-cartilagem) apresentou diferença estatística, também maior no modo contínuo. As outras características analisadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Na Figura 20 são vistos os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III.

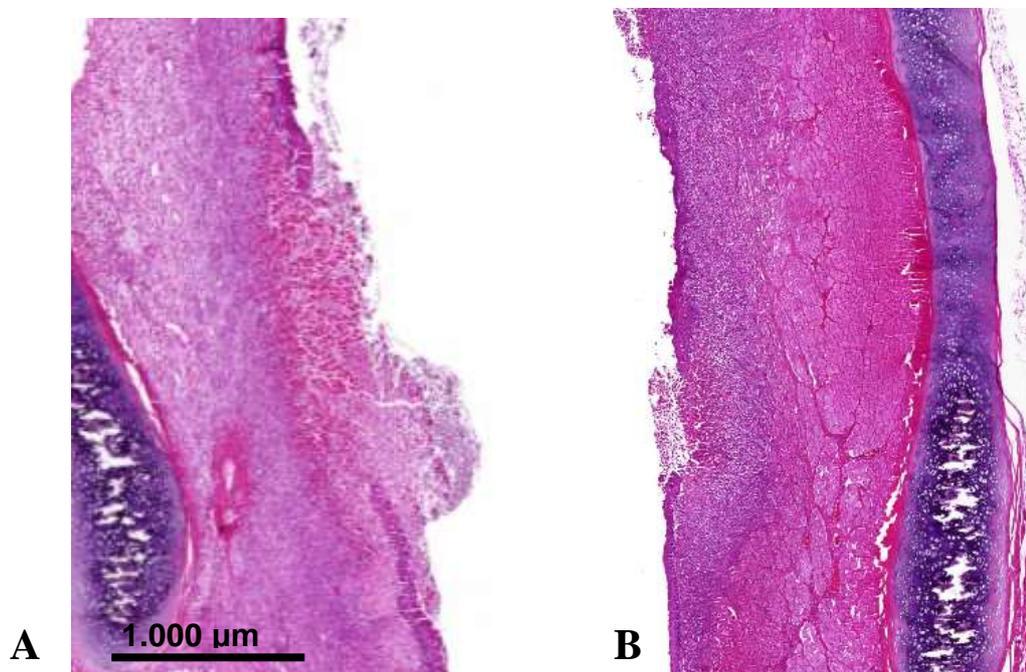


Figura 20 - Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de um mesmo coelho do Grupo III; **(A)** Prega vocal direita que recebeu feixe de laser de diodo no modo contínuo; **(B)** Prega vocal esquerda que recebeu feixe de laser de diodo no modo pulsado. (Aumento de 20x).

O Gráfico 1 mostra a extensão do processo inflamatório nas pregas vocais por grupo estudado, o Gráfico 2 a extensão linear da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado e o Gráfico 3 a profundidade da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado.

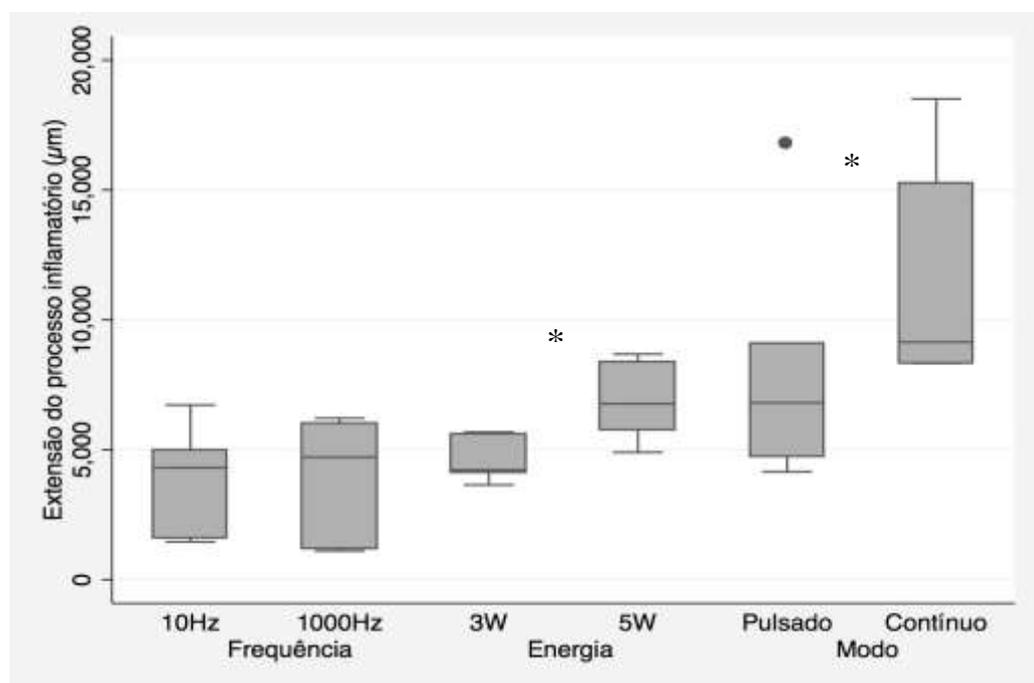


Gráfico 1 – Extensão do processo inflamatório nas pregas vocais por grupo estudado.

* $P < 0,05$ para diferenças entre os grupos.

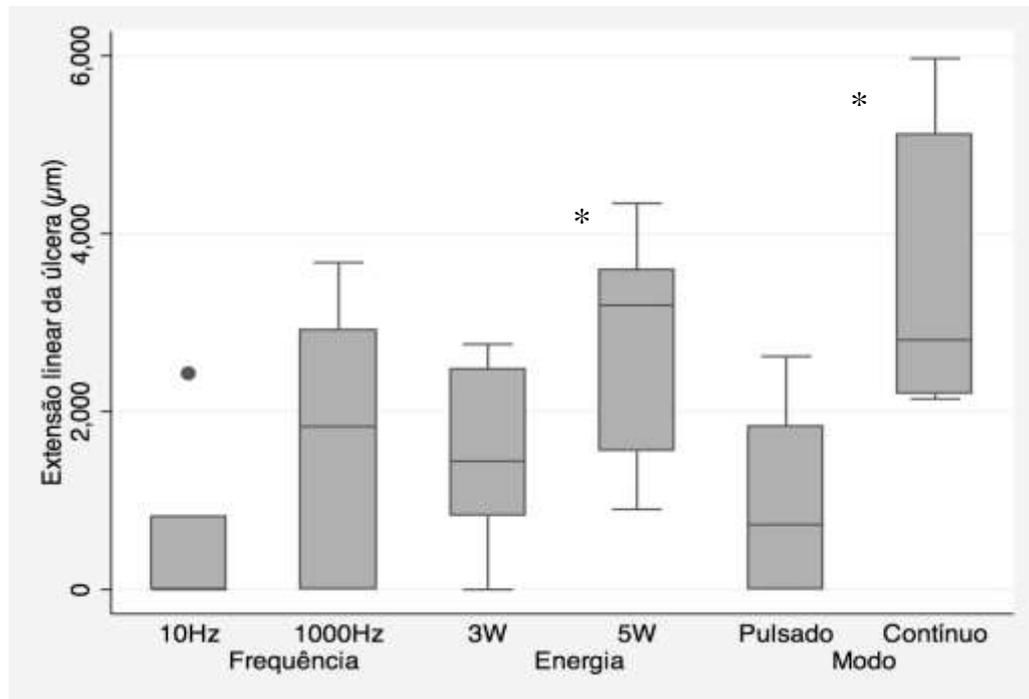


Gráfico 2 – Extensão linear da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado. * $P < 0,05$ para diferenças entre os grupos.

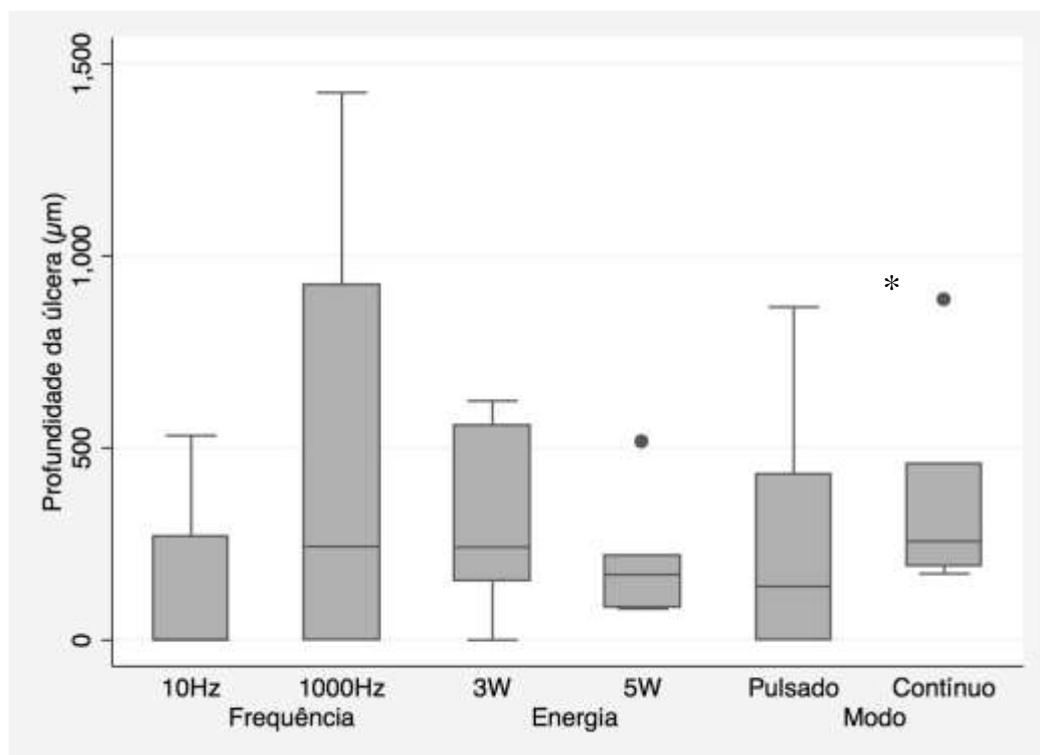


Gráfico 3 – Profundidade da úlcera nas pregas vocais por grupo estudado. * $P < 0,05$ para diferenças entre os grupos.

5.1.2 Densidade e orientação das fibras elásticas e colágenas

As fibras elásticas apresentaram-se fragmentadas, desorganizadas (próxima às úlceras, distribuíram-se verticalmente), com perda da linearidade na camada submucosa e esparsamente distribuídas em todas as camadas das pregas vocais que receberam injúria do laser, independente do grupo analisado (Figura 21). Não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras elásticas nas análises entre coelhos do mesmo grupo.

As fibras colágenas apresentaram-se delgadas e pouco organizadas nas áreas de tecido de granulação em todos os grupos analisados (Figura 21). A densidade de fibras colágenas mostrou-se mais elevada com uso do laser no modo contínuo, quando comparado ao modo pulsado. Não houve diferença estatística quanto à densidade colágenas nas análises nos Grupos I e II.

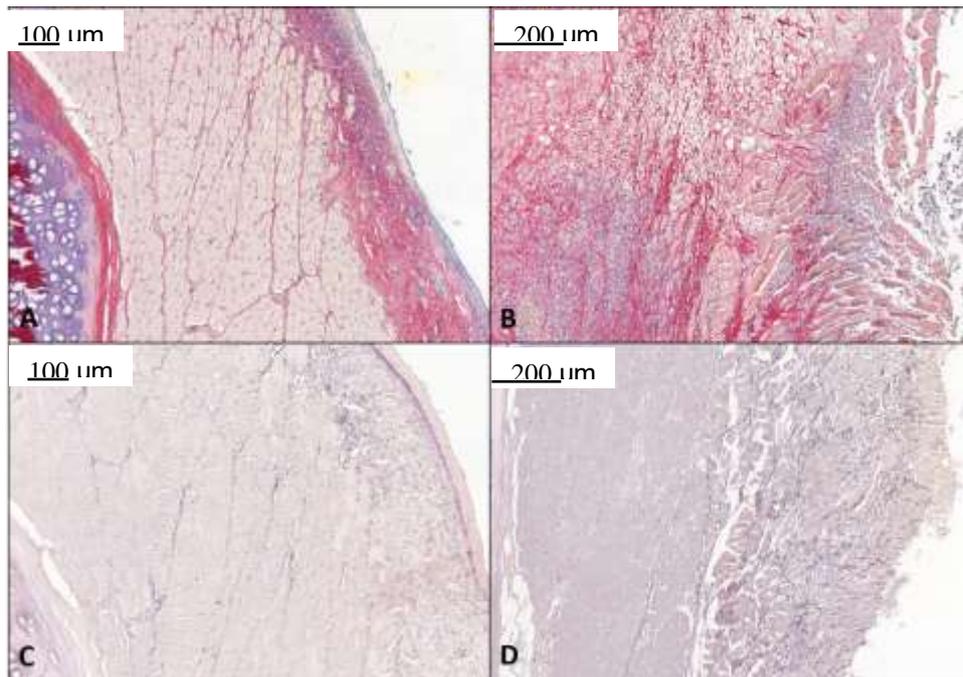


Figura 21 - Cortes histológicos corados: **(A)** Corte histológico corado com picrossírus da PV de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser, que mostra fibras colágenas organizadas e densas na lâmina própria e discretas na camada muscular (Aumento de 150x); **(B)** Corte histológico corado com picrossírus de PV de coelho do Grupo III que recebeu injúria do laser sob modo contínuo, em que se observam fibras colágenas desorganizadas em torno da área ulcerada e abundantes na musculatura em torno da lesão, onde se forma tecido de granulação (Aumento de 100x); **(C)** Corte histológico corado com resorcina-fucsina oxidada (RFO) da PV de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser, evidenciando as fibras elásticas organizadas, com maior densidade na região subepitelial da lâmina própria (Aumento de 200x); **(D)** Corte histológico corado com corado RFO de coelho do Grupo III que recebeu injúria do laser sob modo pulsado e mostra as fibras elásticas desorganizadas, fragmentadas e verticalizadas na área de ulceração (Aumento 140x).

A Tabela 4 mostra a comparação das densidades de fibras colágenas e elásticas dos Grupos I, II e III (Teste de Wilcoxon).

Tabela 4 - Comparação das densidades de fibras colágenas e elásticas dos Grupos I, II e III (Teste de Wilcoxon)

Densidade das fibras	Grupo 1 Média (DP) (%)		p	Grupo 2 Média (DP) (%)		p	Grupo 3 Média (DP) (%)		p
	10Hz	1000Hz		3W	5W		Pulsado	Contínuo	
Colágenas	10,25 (2,62)	10,00 (6,63)	0,311	8,03 (4,99)	4,34 (2,81)	0,237	16,7 (13,03)	21,62 (13,42)	0,018
Elásticas	4,04 (2,19)	2,14 (1,02)	0,063	3,31 (1,94)	2,49 (0,76)	0,866	2,78 (1,40)	1,79 (0,53)	0,128

DP = desvio padrão; p = significância

5.1.3 Imuno-histoquímica para colágeno tipo I e tipo III

A análises das lâminas da imuno-histoquímica para colágenos tipo I e tipo III mostraram marcação de componentes não específicos (especialmente nas lâminas do colágeno tipo III), de modo que poderiam interferir na análise dos resultados (com muitos falso-positivos). Portanto, as mesmas não foram analisadas.

A Figura 22 mostra cortes histológicos das pregas vocais de coelho não submetido ao procedimento com laser de diodo com marcação para colágenos tipo I e III.

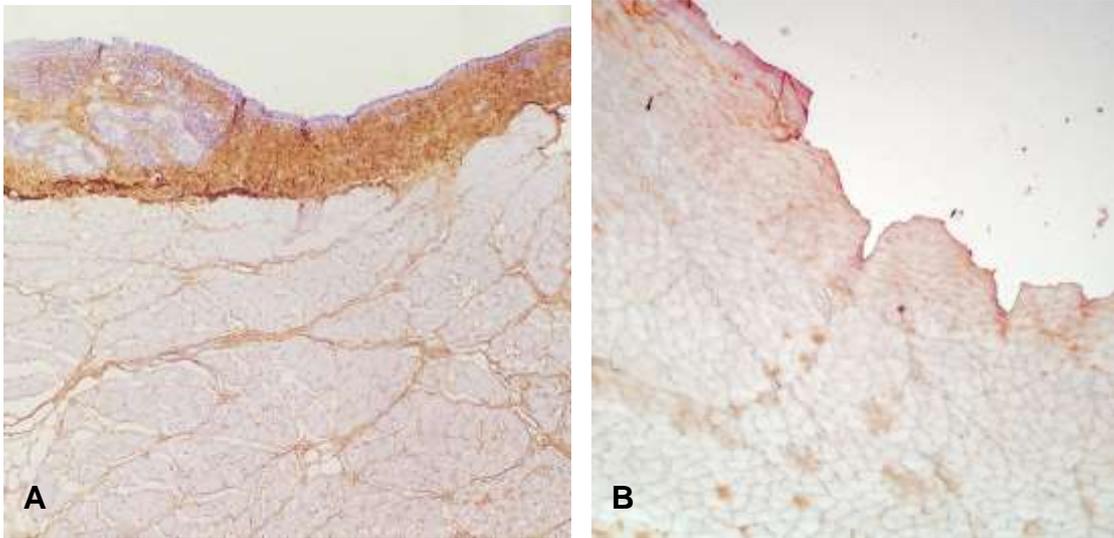


Figura 22 - Cortes histológicos das pregas vocais de coelho que não foi submetido ao procedimento com laser de diodo: **(A)** Corte histológico da PV com marcação para colágeno tipo I (USBiological, MA, USA), titulação 1:1000, peroxidase, aumento 100x; **(B)** Corte histológico da PV com marcação para colágeno tipo III (Santa Crus Biotechnology, CA, USA), titulação 1:50, proteinase K, aumento 100x)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Delineamento do estudo e metodologia

A cicatriz em prega vocal que ocorre após injúria é causa importante de disfonia, uma vez que implica em alteração de sua microestrutura complexa e resulta em piora da qualidade vocal ^(2,3). A fonocirurgia ideal seria aquela em que a lesão fosse efetivamente removida com o menor dano possível ao tecido adjacente, a fim de reestabelecer a função da prega vocal ao mesmo tempo em que é preservada sua ultra estrutura ⁽¹⁾. Tanto o bisturi frio quanto os lasers, em geral, são amplamente aceitos como instrumentos para fonocirurgia, embora nenhum seja isoladamente completo ou ideal. A escolha da técnica deve levar em consideração o tamanho da lesão, sua natureza (benigna ou maligna), a vascularização do tecido e a habilidade do cirurgião. Ao optar pelo uso do laser, deve-se ter em mente que o mesmo implica em danos térmicos ao tecido, porém menores que aqueles causados pela aplicação do eletrocautério ⁽⁷⁾. Tal fato pode ser explicado pela capacidade do laser em remover tecido com maior precisão que o cautério, além de produzir efeito hemostático mais acurado e com dano térmico lateral menor, o que implica em menos edema e menor reação inflamatória. O laser de diodo tem sido utilizado como instrumento para uma série de doenças da prega vocal, no entanto, há dados limitados que abordam o mecanismo pelo

qual este laser pode induzir cicatrização das pregas vocais ⁽²²⁾, o que motivou o presente estudo.

O coelho foi escolhido como modelo animal, pois a microestrutura de sua prega vocal é comparável à do humano ^(35,39). Ainda que composta por apenas duas camadas, a prega vocal de coelho apresenta distribuição e densidade de fibras de colágeno e elastina semelhantes à prega vocal humana ⁽⁴⁰⁾. Além disso, adequa-se bem aos estudos histológicos e tem menor custo comparado às espécies maiores ⁽³⁵⁾. No entanto, o tamanho reduzido da laringe do coelho limita a precisão do procedimento na prega vocal ⁽³⁷⁾. Portanto, foi realizada uma única lesão puntiforme por prega vocal, para evitar interferência no processo de cicatrização por feridas muito próximas, preocupação pertinente por causa do chamado dano térmico lateral em torno da injúria provocada pelo laser ⁽⁸⁷⁾. Ainda, a cordectomia realizada no estudo piloto exigiu o contato da ponta da fibra do laser de diodo com o tecido, diversas vezes durante o procedimento. Como resultado, observou-se que debris teciduais e tecido carbonizado em torno da fibra do laser podem modificar o padrão de irradiação e, conseqüentemente, da lesão. Por estas razões, escolheu-se a técnica de lesão em um único ponto para reduzir o viés, mesmo que essa lesão não exista na prática clínica.

A escolha do tempo de sacrifício dos animais foi baseada em estudos prévios que avaliaram resposta inflamatória aguda e adotaram o mesmo período (sete dias) em algumas de suas análises ^(5,56,84,88-90). Estudos que abordam os efeitos agudos da cicatrização de pregas vocais são relevantes na medida em que esclarecem os eventos que antecedem a formação da

cicatriz madura e fornecem embasamento para que se desenvolvam agentes terapêuticos que permitam melhor regeneração.

Para as análises histológicas, foram utilizadas colorações com hematoxilina-eosina, resorcina-fucsina de Weigert e picrossírus. A técnica H&E é classicamente utilizada em análises histológicas, pois permite a identificação da arquitetura tecidual e celular, identificar e classificar lesões, incluindo os componentes celulares de um infiltrado inflamatório. A coloração com resorcina-fucsina de Weigert fornece resultados excelentes para estudo das fibras do sistema elástico ^(91,92). O sirius red é um corante largamente utilizado para corar o colágeno em cortes de tecidos ⁽⁹³⁾. Tempos atrás, acreditava-se na possibilidade de diferenciar os colágenos I, III e IV por meio das diferentes cores vistas por meio de picrossírus-polarização. No entanto, foi demonstrado que a polarização pode ser influenciada pela espessura das fibras de colágeno e pela densidade de seus feixes ^(94,95). Outras colorações para colágeno, como Van Gieson e os tricrômios, podem falhar ao corar fibras colágenas muito finas, levando a subavaliação da quantidade de colágeno ⁽⁵⁶⁾. O tricrômio de Masson, em especial, tende a não detectar depósitos menores de colágeno e, conseqüentemente, é mais específico para colágeno organizado e espesso do que para colágeno imaturo e fino ^(56,96). Para alcançar a distinção entre os tipos de colágeno I e III, foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica. No entanto, até o presente momento, não foi possível atingir coloração ideal para as análises. A técnica será revista para posterior reavaliação.

6.1.1 Parâmetros de escolha do laser de diodo

Para qualquer tipo de laser, a interação entre o comprimento de onda e os cromóforos teciduais é crucial para controlar a extensão da lesão térmica. A reação do tecido ao estímulo do laser depende da absorção da luz, e cada tecido absorve apenas certos comprimentos de onda com base no seu espectro de absorção ⁽⁹⁷⁾. No presente estudo, o laser de diodo foi escolhido para o comprimento de onda de 980nm por ser mais absorvido pela água que o de 810nm, o que produz menos danos laterais na prega vocal. Comparado com o laser de CO₂ ($\lambda = 10.600\text{nm}$), o laser de diodo de 980nm é menos absorvido pela água, mas é absorvido por outros cromóforos como a melanina e, em particular, a oxihemoglobina (espectro próximo ao infravermelho). Essas características conferem ao laser de diodo precisão cirúrgica ligeiramente inferior ao laser CO₂, mas com capacidade superior de coagulação ⁽⁹⁸⁾. Como resultado, o laser de diodo tem maior penetração em tecido biológico, que o torna ideal para fotocoagulação, enquanto o laser de CO₂ é mais utilizado para a vaporização de tecidos ⁽⁷¹⁾.

O tempo de exposição e a potência são parâmetros com estreito vínculo, de forma que o uso de potência mais alta por período de tempo mais curto resulta em menos danos aos tecidos que o uso de potência mais baixa por um período de tempo longo ⁽⁶⁶⁾. O tempo de exposição de 20s foi padronizado para todos os procedimentos, fundamentado nas observações do estudo piloto. As lesões realizadas com tempo mais curto (5s e 10s) foram mais difíceis de serem identificadas após sete dias. Ademais, a lesão foi pontual, uma vez que qualquer outra incisão seria tecnicamente dependente

do cirurgião, que dificilmente teria a mesma precisão em todos os procedimentos e os realizaria em tempos distintos. Os parâmetros estudados (frequência de pulso, potência e modo de energia pulsado ou contínuo) foram definidos de acordo com a literatura ⁽²²⁾ e sob orientação do fabricante do laser escolhido.

6.2 Efeito do laser de diodo sobre a prega vocal

6.2.1 Processo inflamatório

Em geral, o dano térmico do laser pode variar de um aquecimento transitório até a desnaturação de proteínas e vaporização de água. A absorção de energia em excesso pode induzir necrose e carbonização de tecidos. O comprimento de onda do laser (λ), o tempo de exposição, a configuração de energia, o modo contínuo/pulsado e a frequência de pulso são parâmetros que desempenham um papel importante na intensidade das lesões térmicas nos tecidos ⁽⁸²⁾. Alguns autores consideram a aferição da extensão do processo inflamatório como correspondente ao dano térmico lateral do laser ^(90,99).

No presente estudo, apenas sete das 42 pregas vocais lesionadas (16,66%) apresentaram sinais de reepitelização. Este dado contrasta com o de outros autores que utilizaram instrumento frio e ao final da primeira semana pós injúria já apresentavam sinais de reepitelização ou epitelização quase

completa ^(5,89). Por outro lado, Sinha e Gallagher (2003)⁽¹⁰⁰⁾ compararam uso de bisturi frio e laser de CO₂ (entre outros instrumentos) ao lesionar mucosa oral de *guinea pig* e constataram que, ao final da primeira semana, a mucosa que sofreu lesão com bisturi frio já apresentava reepitelização completa, enquanto a mucosa que sofreu lesão com laser de CO₂ teve reepitelização completa somente em quatro semanas. Knott et al. (2006)⁽¹⁰¹⁾ também avaliaram reepitelização com duas e seis semanas após a cordectomia pelo laser de CO₂ e encontraram reepitelização somente na sexta semana. Nos resultados do presente estudo, que corroboram com os de Knott et al.⁽¹⁰¹⁾, não foi detectada reepitelização na maioria das pregas vocais analisadas sete dias após lesão, que caracterizou atraso na reepitelização ao uso do laser de diodo em pregas vocais de coelhos, conforme já era esperado. As possíveis explicações para a reepitelização mais lenta em feridas causadas por laser incluem a presença de substâncias inibitórias produzidas por tecidos necróticos, impedimento físico causado pela presença de escara ou fixação de células epiteliais adjacentes pelo calor ⁽⁸²⁾.

A extensão do processo inflamatório e a extensão linear da úlcera no sentido crânio caudal na laringe apresentaram-se menores nos tecidos que receberam radiação laser de diodo com potência de 3W, quando comparados aos que receberam radiação com potência de 5W. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que diferentes parâmetros de laser interferem no processo de cicatrização ^(82,102,103). No estudo de Zhang et al. (2011)⁽¹⁰³⁾, os autores compararam diferentes potências do laser de CO₂ (1W, 3W, 5W e 8W) e instrumento frio para realização de cordectomia em

cães. Seus resultados mostraram que as injúrias foram mais brandas nas pregas vocais submetidas à cordectomia com laser de CO₂ em potências de 1W e 3W, e instrumento frio, não havendo diferença significativa entre eles quanto ao processo de cicatrização; enquanto que aquelas cordas vocais que receberam potências de 5W e 8W apresentaram lesões mais graves. D'Arcangelo et al. (2007)⁽⁸²⁾ compararam incisões realizadas pelo laser de diodo com potências ajustadas em 4W e 6W *versus* bisturi frio em mucosa oral de ratos. Observaram que o laser de diodo tende a produzir maior reação inflamatória quando utilizado na potência de 6W.

Diante dessas informações, é possível sugerir, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, que o aumento da potência de 3W para 5W, ao uso do laser de diodo 980nm no modo pulsado em pregas vocais de coelhos é capaz de aumentar, significativamente, a penetração desse laser no referido tecido. O cirurgião deve ter em mente que a ação do laser em potência mais baixa (3W) minimiza o dano térmico ao tecido, mas pode reduzir a efetividade da incisão. A escolha do parâmetro vai depender da doença em questão e da experiência do cirurgião.

No que diz respeito ao modo de entrega de energia, um fator que afeta o nível de lesão térmica é o tempo de relaxamento térmico do tecido individual, que é o tempo necessário para que o tecido aquecido perca 50% do seu calor por difusão ⁽⁹⁷⁾. Haverá transição de dano específico ao tecido para inespecífico se a duração da exposição ao laser for igual e superior ao tempo de relaxamento térmico ⁽¹⁰⁴⁾. No modo contínuo, os níveis de energia e intensidade são emitidos constantemente, pois o laser está sempre ligado. No

modo pulsado, o laser opera por uma fração de segundo, com intuito de otimizar a energia, mas minimizar os danos térmicos. Isso é possível desde que o tempo de relaxamento térmico do tecido permita recuperação térmica, com tempo adequado entre as exposições ^(65,104).

Os resultados aqui apresentados mostram que uso do laser de diodo sob modo contínuo, em pregas vocais de coelhos, tende a ocasionar lesão mais profunda e mais extensa que o modo pulsado (maior extensão do processo inflamatório, maior extensão da úlcera, maior profundidade da úlcera e maior profundidade do processo inflamatório). Este resultado corrobora com o de outros autores que compararam modo contínuo *versus* pulsado do laser de CO₂ em prega vocal de cães ⁽⁹⁹⁾ e em mucosa oral de cães ^(90,102), e encontraram nas lesões menor dano térmico lateral ao uso do laser em modo pulsado. Importante ressaltar que no intraoperatório tal disparidade não era notada, ou seja, o pesquisador não conseguia reconhecer se a prega vocal recebia energia em forma pulsada ou contínua. Analogamente, o aspecto da lesão tecidual causada pelo laser de diodo em modo pulsado ou contínuo no pós-operatório imediato, tampouco era facilmente distinguível por meio do telescópio. No entanto, após ressecção das laringes e análises histológicas, foi possível constatar que as diferenças entre as lesões eram significativas (Figura 23).

Sabe-se que as ressecções a laser podem acarretar atraso na cicatrização, uma vez que as células do tecido levam mais tempo para reabsorver os remanescentes de tecido carbonizado ^(79,105). Quanto maior a energia absorvida, maior o dano. Para escolher as configurações do laser,

deve-se levar em conta as características do tecido e adaptar o parâmetro para que seja eficaz, porém o menos lesivo possível ^(82,106). Nesse sentido, seria razoável que os cirurgiões considerassem o uso do laser de diodo sob modo pulsado em pregas vocais para, ao menos, ressecção de lesões benignas - ao contrário da literatura revisada (Tabela 1). O intuito seria diminuir o dano térmico, que pode lesionar os tecidos contíguos e retardar a cicatrização do epitélio. Historicamente, o laser de CO₂ também foi usado inicialmente em modo contínuo e mediante artigos publicados, que evidenciam as vantagens de seu uso em modo pulsado, a rotina foi sendo modificada ^(90,102,107).

Havia dúvida se diferentes frequências poderiam induzir respostas distintas por causa da diferença no tempo de relaxamento do tecido, uma vez que a energia transferida ao tecido seria a mesma. Por esta razão, as duas frequências de 10Hz *versus* 1.000Hz foram comparadas. A extensão linear da úlcera e a profundidade da úlcera apresentaram-se maiores com uso do laser ajustado na frequência de 1.000Hz, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa quando analisada por meio do teste de Wilcoxon (Tabela 2). É possível que uma quantidade maior de coelhos analisados pudesse mostrar esta diferença. Este dado corrobora com de Fortune et al. (1998)⁽⁹⁰⁾ que compararam o efeito de diferentes tempos de pulsação do laser de CO₂ na realização de incisões em mucosa oral de cães e concluíram que frequências de pulsação mais curtas causam menos dano térmico lateral.

A formação de metaplasia cartilaginosa pode ter ocorrido por causa da ativação de alguns condrócitos em lesões profundas ^(108, 109). Estudos futuros

podem esclarecer melhor se essa formação se mantém e qual sua consequência para a qualidade vocal.

Na Figura 23 observa-se as pregas vocais de coelhos imediatamente após a intervenção e sete dias após o procedimento.



Figura 23 - Imagens de pregas vocais de coelho: **(A)** aspecto final imediatamente após término do procedimento em animal do Grupo III (PVE - recebeu modo contínuo; PVD - recebeu modo pulsado); **(B)** laringe fresca do mesmo animal excisada sete dias após o procedimento. Atenção para o aspecto da lesão mais extensa em PVE.

6.2.2 Fibras elásticas

As fibras elásticas contribuem para as propriedades biomecânicas da prega vocal ⁽³⁰⁾, não apenas relacionada à sua densidade, mas por sua desorganização em tecidos cicatriciais ⁽³⁵⁾. Em prega vocal humana normal, as fibras elásticas são mais abundantes na camada intermediária.

No presente estudo, as fibras elásticas apresentaram-se fragmentadas, desorganizadas (próxima às úlceras, distribuem-se verticalmente), com perda da linearidade na camada submucosa e

esparsamente distribuídas em todas as camadas das pregas vocais que receberam injúria do laser. Estes achados estão em concordância com a literatura ⁽³⁹⁾. Não houve diferença na densidade de fibras elásticas quando foram comparados os parâmetros distintos do laser (pulsação de 10Hz *versus* 1.000Hz; potência de 3W *versus* 5W; modo pulsado *versus* contínuo).

6.2.3 Fibras colágenas

Durante a fase aguda da cicatrização, os fibroblastos migram para o sítio da lesão por influência de fatores de crescimento e iniciam a produção de matriz extracelular, inclusive colágeno. A matriz extracelular passa, então, a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico ⁽¹¹⁰⁾. Neste estudo, as fibras colágenas apresentaram-se delgadas e pouco organizadas nas áreas de tecido de granulação em todos os grupos analisados, conforme seria esperado em cicatriz na fase aguda.

As fibras de colágeno tipo I e tipo III apresentaram-se em quantidade elevada em resposta à injúria. Sabe-se que tecidos com maior concentração de colágeno estão mais propensos à fibrose cicatricial ⁽²⁾. Teteyá et al. (2006)⁽⁶²⁾ distinguiram a deposição dos tipos de colágeno após desnudamento da prega vocal com instrumento frio e observaram que, ao comparar com a prega vocal controle, houve inicialmente elevação de colágeno tipo I seguida de queda do quinto para o sétimo dia de pós-operatório (mas ainda elevado em relação ao controle), enquanto o colágeno tipo III permaneceu elevado e sem alteração desde do terceiro até o décimo quarto dia após a injúria. Mau

et al. (2014)⁽³⁷⁾ compararam a densidade de colágeno tipo I e tipo III em prega vocal de coelho quatro semanas após a injúria por laser Holmium:YAG *versus* prega vocal controle. Encontraram aumento na densidade de colágeno tipo I nas pregas vocais que sofreram lesão com laser, mas não do colágeno tipo III.

No presente estudo, quando comparados modos pulsado *versus* contínuo, este último ocasionou aumento da densidade de colágeno, o que pode predizer uma cicatrização pior. Não houve diferença na densidade de fibras colágenas quando foram comparados os parâmetros de pulsação de 10Hz *versus* 1.000Hz e potência de 3W *versus* 5W. No entanto, não se possuía prega vocal controle (que não tenha sido lesionado) em um mesmo animal que tenha sofrido lesão para comparar as densidades de colágeno.

6.3 Perspectivas futuras

Este estudo foi pioneiro em avaliar as reações histopatológicas após lesão com laser de diodo em pregas vocais. Entretanto, não foi comparada a ação do laser de diodo com outros lasers rotineiramente utilizados para cirurgia laríngea e tampouco foi estudada a evolução temporal da lesão e suas consequências reológicas. Dessa forma, novos estudos que comparem ação do laser de diodo com outros lasers e também com outros tempos de sacrifício dos animais (avaliar reações histológicas em seis semanas e a cicatrização

com dois e seis meses de pós-operatório, por exemplo) são necessários para aprimorar as conclusões acerca do uso deste laser em pregas vocais.

Seguindo-se a linha da patogenia da lesão causada pelo laser, julga-se importante também, no futuro, o estudo da participação de células inflamatórias, de citocinas e de outros mediadores inflamatórios produzidos no local da lesão, no processo de cicatrização e na formação de fibrose.

Sugere-se que a técnica de coloração seja revisada para análises posteriores.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- o aumento da potência do laser de diodo, de 3W para 5W no modo pulsado, foi capaz de aumentar significativamente a extensão do processo inflamatório e a extensão da úlcera;
- o uso do laser de diodo sob modo contínuo, quando comparado com modo pulsado, ocasionou reação inflamatória mais extensa e mais profunda, úlcera mais extensa e mais profunda, além de aumentar a densidade de fibras colágenas;
- recomenda-se considerar o uso de configurações com potência baixa e modo pulsado para alguns procedimentos laríngeos, em contraste com a literatura apresentada até o presente momento.

ANEXO

ANEXO A

TABELAS DE ALEATORIZAÇÃO DOS PARÂMETROS VARIÁVEIS UTILIZADOS EM CADA GRUPO

Grupo I

	PVD (Hz)	PVE (Hz)
Coelho 1	10	1.000
Coelho 2	1.000	10
Coelho 3	10	1.000
Coelho 4	1.000	10
Coelho 5	10	1.000
Coelho 6	1.000	10
Coelho 7	1.000	10

PVD = prega vocal direita; PVE = prega vocal esquerda

Grupo II

	PVD (W)	PVE (W)
Coelho 8	5	3
Coelho 9	3	5
Coelho 10	3	5
Coelho 11	5	3
Coelho 12	3	5
Coelho 13	5	3
Coelho 14	3	5

PVD = prega vocal direita; PVE = prega vocal esquerda

Grupo III

	PVD	PVE
Coelho 15	pulsado	contínuo
Coelho 16	contínuo	pulsado
Coelho 17	contínuo	pulsado
Coelho 18	pulsado	contínuo
Coelho 19	pulsado	contínuo
Coelho 20	contínuo	pulsado
Coelho 21	contínuo	pulsado

PVD = prega vocal direita; PVE = prega vocal esquerda

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Mitchell JR, Kojima T, Wu H, Garrett CG, Rousseau B. Biochemical Basis of Vocal Fold Mobilization After Microflap Surgery in a Rabbit Model. *The Laryngoscope*. 2014;124(2):487–93.
2. Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, et al. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;115(5):474–82.
3. Woo P, Casper J, Colton R, Brewer D. Diagnosis and treatment of persistent dysphonia after laryngeal surgery: a retrospective analysis of 62 patients. *Laryngoscope*. 1994;104(9):1084–91.
4. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509–28.
5. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(1 Pt 1):19–24.
6. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. *J Voice Off J Voice Found*. 2005;19(2):283–9.
7. Liboon J, Funkhouser W, Terris DJ. A comparison of mucosal incisions made by scalpel, CO2 laser, electrocautery, and constant-voltage electrocautery. *Otolaryngol--Head Neck Surg*. 1997;116(3):379–85.
8. Tipton WW, Garrick JG, Riggins RS. Healing of electrosurgical and scalpel wounds in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*. 1975;57(3):377–9.
9. Strong MS, Jako GJ. Laser surgery in the larynx. Early clinical experience with continuous CO 2 laser. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1972;81(6):791–8.
10. Ferri E, Armato E. Diode laser microsurgery for treatment of Tis and T1 glottic carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2008;29(2):101–5.
11. Bajaj Y, Pegg D, Gunasekaran S, Knight LC. Diode laser for paediatric airway procedures: a useful tool. *Int J Clin Pract*. 2010;64(1):51–4.

12. Saetti R, Silvestrini M, Cutrone C, Narne S. Treatment of congenital subglottic hemangiomas: our experience compared with reports in the literature. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(8):848–51.
13. Saetti R, Silvestrini M, Cutrone C, Barion U, Mirri L, Narne S. Endoscopic treatment of upper airway and digestive tract lesions caused by caustic agents. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112(1):29–36.
14. Ferri E, García Purriños FJ. [Diode laser surgery in the endoscopic treatment of laryngeal paralysis]. *Acta Otorrinolaringológica Esp.* 2006;57(6):270–4.
15. Fanjul M, García-Casillas MA, Parente A, Cañizo A, Laín A, Matute JA, et al. Utilización del láser diodo en la vía aérea pediátrica. *Cir Pediatr.* 2008;79–83.
16. Edizer DT, Cansız H. Transoral Laser Microsurgery for Glottic Cancers - Complications and Importance of the Anterior Commissure Involvement. *Istanb Med J.* 2013;14:12–5.
17. Liu S-C, Lin D-S, Su W-F. The role of diode laser in the treatment of ventricular dysphonia. *J Voice.* 2013;27(2):250–4.
18. Tunçel U, Cömert E. Preliminary results of diode laser surgery for early glottic cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;149(3):445–50.
19. Karasu MF, Gundogdu R, Cagli S, Aydin M, Arli T, Aydemir S, et al. Comparison of effects on voice of diode laser and cold knife microlaryngology techniques for vocal fold polyps. *J Voice Off J Voice Found.* 2014;28(3):387–92.
20. Cömert E, Tunçel Ü, Dizman A, Güney YY. Comparison of early oncological results of diode laser surgery with radiotherapy for early glottic carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;150(5):818–23.
21. Karkos PD, Stavrakas M, Markou K. Early glottic cancer and difficult laryngoscopy: flexible endoscopic diode laryngeal laser-assisted surgery - a pilot study of an oncologically safe tool. *Clin Otolaryngol.* 2016;41(6):830
22. Arroyo HH, Neri L, Fussuma CY, Imamura R. Diode Laser for Laryngeal Surgery: a Systematic Review. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2016;20(2):172–9.

23. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1974;26(2):89–94.
24. Hirano M. Structure of vocal fold in normal and disease states: anatomical and physical studies. *ASHA Rep*. 1981;11:11–30.
25. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otol Fukuoka*. 1975;21:239–45.
26. Hirano M. Phonosurgical anatomy of the larynx. New York, NY: Raven Press: Ford CN, Bless DM; 1991. 25-41 p. (Phonosurgery: Assessment and Surgical Management of Voice Disorders).
27. Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: *Speech science: Recent advances*. San Diego, CA: College-Hill Press: R. G. Danoloff; 1985. p. 1–46.
28. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol*. 1996;116(5):778–82.
29. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett*. 1990;268(2):386–93.
30. Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(1):77–85.
31. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999;109(6):845–54.
32. Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105(1):6–11.
33. Noordzij JP, Ossoff RH. Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39(1):1–10.
34. Bless DM, Welham NV. Characterization of vocal fold scar formation, prophylaxis, and treatment using animal models. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;18(6):481–6.
35. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice Off J Voice Found*. 2002;16(1):96–104.

36. Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cirúrgica Bras.* 2009;24(4):325–8.
37. Mau T, Du M, Xu CC. A rabbit vocal fold laser scarring model for testing lamina propria tissue-engineering therapies. *Laryngoscope.* 2014;124(10):2321–6.
38. Maytag AL, Robitaille MJ, Rieves AL, Madsen J, Smith BL, Jiang JJ. Use of the rabbit larynx in an excised larynx setup. *J Voice Off J Voice Found.* 2013;27(1):24–8.
39. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice Off J Voice Found.* 2004;18(1):116–24.
40. Kurita S, Nagata K, Hirano M. A comparative study of the layer structure of the vocal fold. In: *Vocal Fold Physiology: Contemporary Research and Clinical Issues.* San Diego, CA: College-Hill Press: Bless DM, Abbs JH; 1983. p. 3–21.
41. Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today.* 1998;4(2):69–75.
42. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 1999;18(5):417–26.
43. Parsons M, Kessler E, Laurent GJ, Brown RA, Bishop JE. Mechanical load enhances procollagen processing in dermal fibroblasts by regulating levels of procollagen C-proteinase. *Exp Cell Res.* 1999;252(2):319–31.
44. Awan SN, Novaleski CK, Rousseau B. Nonlinear analyses of elicited modal, raised, and pressed rabbit phonation. *J Voice Off J Voice Found.* 2014;28(5):538–47.
45. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9–18.
46. Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, et al. Wound healing: an update. *Regen Med.* 2014;9(6):817–30.
47. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276(5309):75–81.

48. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol.* 1985;121(3):394–403.
49. Todd R, Donoff BR, Chiang T, Chou MY, Elovic A, Gallagher GT, et al. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *Am J Pathol.* 1991;138(6):1307–13.
50. Stephens P, Thomas DW. The cellular proliferative phase of the wound repair process. *J Wound Care.* 2002;11(7):253–61.
51. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg.* 1998;25(3):321–40.
52. Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol.* 1986;119(2):219–34.
53. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200(4):500–3.
54. Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res.* 1985;5(6):481–92.
55. Branski RC, Verdolini K, Sandulache V, Rosen CA, Hebda PA. Vocal fold wound healing: a review for clinicians. *J Voice Off J Voice Found.* 2006;20(3):432–42.
56. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115(4):285–92.
57. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope.* 2003;113(4):620–7.
58. Hansen JK, Thibeault SL. Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring. *J Voice Off J Voice Found.* 2006;20(1):110–20.
59. Bernardo L. O laser, uma fonte de luz diferente. In: *História da Luz e das Cores.* 1a. edição. Porto: Luís Miguel Bernardo e Universidade do Porto; 2010. p. 261–92. (Série do Saber; vol. III).

60. Ossoff RH, Coleman JA, Courey MS, Duncavage JA, Werkhaven JA, Reinisch L. Clinical applications of lasers in otolaryngology--head and neck surgery. *Lasers Surg Med.* 1994;15(3):217–48.
61. Ossoff RH, Matar SA. The advantages of laser treatment of tumors of the larynx. *Oncol Williston Park N.* 1988;2(9):58–61, 64–5.
62. Patel C. Continuous-Wave Laser Action on Vibrational-Rotational Transitions of CO₂. *Phys Rev.* 1964;136(5A):A1187–93.
63. Ion JC. Evolution of laser material processing. In: *Laser processing of engineering materials.* Oxford, UK: John C. Ion; 2005. p. 12–40.
64. Strong MS. Laser excision of carcinoma of the larynx. *Laryngoscope.* 1975;85(8):1286–9.
65. Dhar P, Malik A. Anesthesia for laser surgery in ENT and the various ventilatory techniques. *Trends Anaesth Crit Care.* 2011;1(2):60–6.
66. Yan Y, Olszewski AE, Hoffman MR, Zhuang P, Ford CN, Dailey SH, et al. Use of lasers in laryngeal surgery. *J Voice Off J Voice Found.* 2010;24(1):102–9.
67. Angiero F, Benedicenti S, Romanos GE, Crippa R. Treatment of hemangioma of the head and neck with diode laser and forced dehydration with induced photocoagulation. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(2):113–8.
68. Lopes LA. Introdução [Internet]. [citado 17 de outubro de 2015]. Disponível em: http://www.nupen.com.br/Revista_port/introducao.php
69. Nobel Lectures. Nicolai G. Basov. In: *Nobel Lectures in Physics (1963-1970).* Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 1998. p. 89–109.
70. Wang Z, Pankratov MM, Rebeiz EE, Perrault DF, Shapshay SM. Endoscopic diode laser welding of mucosal grafts on the larynx: a new technique. *Laryngoscope.* 1995;105(1):49–52.
71. Newman J, Anand V. Applications of the diode laser in otolaryngology. *Ear Nose Throat J.* 2002;81(12):850–1.

72. Fernández A, A M, Fernández A, J F, Martínez Fernández A, Cárdenas Lara M, et al. Dacriocistorrinostomía endonasal y endocanalicular con láser diodo. Resultados preliminares. *Acta Otorrinolaringológica Esp.* 2004;55(4):171–6.
73. Dilkes MG, Cameron I, Quinn SJ, Kenyon GS. Preliminary experience with an 810 nm wavelength diode laser in ENT surgery. *Lasers Med Sci.* 1994;9(4):261–4.
74. D'Eredità R, Shah UK. Contact diode laser myringotomy for medium-duration middle ear ventilation in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(6):1077–80.
75. D'Eredità R, Lens MB. Contact-diode laser repair of bony choanal atresia: a preliminary report. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008;72(5):625–8.
76. Luers JC, Petry-Schmelzer JN, Hein WG, Gostian A-O, Hüttenbrink K-B, Beutner D. Fragmentation of salivary stones with a 980nm diode laser. *Auris Nasus Larynx.* 2014;41(1):76–80.
77. Lee J-C, Lai W-S, Ju D-T, Chu Y-H, Yang J-M. Diode laser assisted minimal invasive sphenoidotomy for endoscopic transphenoidal pituitary surgery: our technique and results. *Lasers Surg Med.* 2015;47(3):239–42.
78. Jameson JJ, Moses RD, Vellayappan U, Lathi KG. Use of the laryngeal mask airway for laser treatment of the subglottis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;123(1 Pt 1):101–2.
79. Divi V, Benninger M, Kiupel M, Dobbie A. Coblation of the canine vocal fold: a histologic study. *J Voice Off J Voice Found.* 2012;26(6):811.e9–13.
80. Lin Y, Yamashita M, Zhang J, Ling C, Welham NV. Pulsed dye laser-induced inflammatory response and extracellular matrix turnover in rat vocal folds and vocal fold fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2009;41(8):585–94.
81. Janda P, Sroka R, Betz CS, Baumgartner R, Leunig A. Comparison of laser induced effects on hyperplastic inferior nasal turbinates by means of scanning electron microscopy. *Lasers Surg Med.* 2002;30(1):31–9.

82. D’Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(6):764–73.
83. Miziara ID, Magalhães AT de M, Santos M d’Aparecida, Gomes EF, Oliveira RA de. Research ethics in animal models. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(2):128–31.
84. Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PHN. Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010;119(2):133–9.
85. Dias Garcia RI, Tsuji DH, Imamura R, Mauad T, Ferraz da Silva LF. Effects of hepatocyte growth factor injection and reinjection on healing in the rabbit vocal fold. *J Voice.* 2012;26(5):667.e7-12.
86. Takahashi-Ramos MT. Estudo histomorfométrico do efeito da injeção de dexametasona na fase tardia de cicatrização de prega vocal de coelho [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2014 [citado 17 de outubro de 2015]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5143/tde-04082014-102151/>
87. Wilder-Smith P, Arrastia AM, Liaw LH, Berns M. Incision properties and thermal effects of three CO2 lasers in soft tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(6):685–91.
88. Yamashita M, Bless DM, Welham NV. Surgical method to create vocal fold injuries in mice. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009;118(2):131–8.
89. Ling C, Yamashita M, Waselchuk EA, Raasch JL, Bless DM, Welham NV. Alteration in cellular morphology, density and distribution in rat vocal fold mucosa following injury. *Wound Repair Regen.* 2010;18(1):89–97.
90. Fortune DS, Huang S, Soto J, Pennington B, Ossoff RH, Reinisch L. Effect of pulse duration on wound healing using a CO2 laser. *Laryngoscope.* 1998;108(6):843–8.
91. Paulsen F, Kimpel M, Lockemann U, Tillmann B. Effects of ageing on the insertion zones of the human vocal fold. *J Anat.* 2000;196(Pt 1):41–54.

92. Nita LM, Battlehner CN, Ferreira MA, Imamura R, Sennes LU, Caldini EG, et al. The presence of a vocal ligament in fetuses: a histochemical and ultrastructural study. *J Anat.* 2009;215(6):692–7.
93. Montes GS, Bezerra MSF, Junqueira LCU. Collagen distribution in tissues. In: *Ultrastructure of the connective tissue matrix.* The Hague: Martinus Nijhoff: Ruggeri A; Motta, PM; 1984. p. 65–88.
94. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153–6.
95. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry.* 1989;93(1):27–9.
96. Bateman ED, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax.* 1981;36(9):645–53.
97. Benninger MS. Microdissection or microspot CO2 laser for limited vocal fold benign lesions: a prospective randomized trial. *Laryngoscope.* 2000;110(2 Pt 2 Suppl 92):1–17.
98. Rubinstein M, Armstrong WB. Transoral laser microsurgery for laryngeal cancer: a primer and review of laser dosimetry. *Lasers Med Sci.* 2011;26(1):113–24.
99. Garrett CG, Reinisch L. New-generation pulsed carbon dioxide laser: comparative effects on vocal fold wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111(6):471–6.
100. Sinha UK, Gallagher LA. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope.* 2003;113(2):228–36.
101. Knott PD, Byrd MC, Hicks DG, Strome M. Vocal fold healing after laser cordectomy with adjuvant cryotherapy. *Laryngoscope.* 2006;116(9):1580–4.
102. Bryant GL, Davidson JM, Ossoff RH, Garrett CG, Reinisch L. Histologic study of oral mucosa wound healing: a comparison of a 6.0- to 6.8-micrometer pulsed laser and a carbon dioxide laser. *Laryngoscope.* 1998;108(1 Pt 1):13–7.

103. Zhang Y, Cao L, Chen Q, Chen X, Xu W, Fang Q, et al. [Experimental study on different power CO2 laser for vocal cord injury]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2011;46(12):1039–41.
104. Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*. 1983;220(4596):524–7.
105. Zeinoun T, Aftimos G, Bou Saba S, Nammour S. Eosinophils and mastocytes in healing laser excision wounds. *Lasers Med Sci*. 2009;24(3):307–12.
106. Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, Remacle M, Hess M, Giovanni A, et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(9):2491–507.
107. Walsh JT, Flotte TJ, Anderson RR, Deutsch TF. Pulsed CO2 laser tissue ablation: effect of tissue type and pulse duration on thermal damage. *Lasers Surg Med*. 1988;8(2):108–18.
108. Adriaansen FC, Verwoerd-Verhoef HL, Van der Heul RO, Verwoerd CD. A histologic study of the growth of the subglottis after endolaryngeal trauma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1986;12(2):205–15.
109. Adriaansen FC, Hoeve LJ, Verwoerd-Verhoef HL, van der Heul RO, Verwoerd CD. Ectopic cartilage in subglottic stenosis: hamartoma or reaction to trauma? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1992;23(3):221–7.
110. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2004;114(3):548–56.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **26/06/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **177/13** intitulado: **“ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE PREGAS VOCAIS PELO USO DO LASER DIODO EM COELHOS”** que utilizará **20** animais da espécie **Coelhos brancos da Nova Zelândia (Orytolagus ciniculus)**, apresentado pelo **Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**

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

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Rui Imamura

Pesquisador (a) Executante: Helena Hotz Arroyo

CEP-FMUSP, 01 de Julho de 2013.



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



Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa