

Andrea Maria Campagnolo

**Estudo histológico da ação do corticosteróide
injetável no processo agudo de cicatrização das
pregas vocais de coelhos**

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

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campagnolo, Andrea Maria

Estudo histológico da ação do corticosteróide injetável no processo agudo de cicatrização das pregas vocais de coelhos / Andrea Maria Campagnolo. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Orientador: Domingos Hiroshi Tsuji.

Descritores: 1.Corticosteróides 2.Cicatriz 3.Cordas

vocais 4.Colágeno 5.Inflamação

USP/FM/SBD-340/09

*“Se você não mudar a direção,
terminará exatamente onde
partiu.”*

Antigo provérbio chinês

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ivo e Umbelina pela dedicação,
exemplo e amor incondicional.

Aos meus irmãos Marcelo e Paulo pelo amor e
amizade eterna.

Ao meu querido Marcelino pelo amor, paciência,
companheirismo e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Domingos Tsuji, orientador desta tese, meu amigo e mestre que desde o início me apoiou na realização deste trabalho, com seus conhecimentos e paciência, tornou possível a concretização deste sonho. É meu exemplo profissional e pessoal que admiro profundamente. Seus conselhos me ajudaram muito e sempre serão bem-vindos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, Coordenador do programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da USP, com grande respeito e admiração, pelas contribuições indispensáveis a esse projeto, pelo incentivo e principalmente pelo carinho e amizade que você dispensa aos pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Professor Titular do Departamento de Patologia da FMUSP, pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste projeto, pelo altruísmo e amor à pesquisa.

Ao Dr. Bruno Ctenas, médico do Departamento de Patologia da FMUSP, pela realização das análises histológicas deste estudo.

Ao Dr. Rui Imamura, pelas críticas e sugestões valiosas que auxiliaram muito na elaboração desta tese.

Aos Dr. Ronaldo Frizzarini e Prof. Dr. Ivan Dieb Mizziara pelas observações pertinentes e fundamentais por ocasião do exame de qualificação.

Ao Dr. Flávio Sakae pela ajuda solidária e amizade.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo privilégio do convívio, em especial Adriana Hachya e Roberta Garcia pela amizade e ajuda.

Às secretárias do Departamento de Otorrinolaringologia: Marilede, Márcia e Luci pelo auxílio sempre que necessário.

À funcionária do LIM, Melissa, pela ajuda durante a pesquisa.

Às funcionárias da patologia da FMUSP pela elaboração das lâminas histológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	ix
Lista de figuras	x
Lista de gráficos	xi
Lista de tabelas	xii
Resumo	xiii
<i>Summary</i>	xiv
<i>Instructions to authors</i>	xv
Artigo	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Histologia da prega vocal, inflamação aguda e cicatrização	7
3.2 Corticosteróide	9
3.3 Uso dos corticosteróides em fonocirurgia	13
3.4 Processo cicatricial em fonocirurgia	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Aspecto ético	22
4.2 Material	22
4.3 Métodos	27
4.3.1 Técnica cirúrgica	27
4.3.2 Preparo da laringe	28
4.4 Estudo histológico da prega vocal	29
4.4.1 Análise microscópica.....	29
4.4.2 Método da Picrossirius-Polarização	29
4.5 Análise morfométrica	32

4.5.1 Células inflamatórias e fibroblastos	32
4.5.2 Fibras colágenas	33
4.6 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Reação inflamatória	36
5.2 Fibras colágenas	40
6 DISCUSSÃO	46
6.1 Considerações finais	54
7 CONCLUSÃO	56
8 ANEXOS	58
Anexo 1 - Média da densidade numérica de cada célula (MRI2) (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos) em relação à intervenção (corticóide x controle)	59
Anexo 2 - Média geral da densidade numérica de todas as células (MRI3) em função do tempo (3 dias) e da intervenção (corticóide x controle)	60
Anexo 3 - Média geral da densidade numérica de todas as células (MRI3) em função do tempo (7 dias) e da intervenção (corticóide x controle)	61
Anexo 4 - Média da área do colágeno do controle e da intervenção em 3 e 7 dias. (Área de colágeno dividida pela área total X 100)	62
Anexo 5 - Média da área do colágeno de 3 dias em relação à intervenção ...	63
Anexo 6 - Média da área do colágeno de 7 dias em relação à intervenção ...	64
9 REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
°C	Grau Celsius
ed	edição
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Estado de Illinois, Estados Unidos da América
Inc	do inglês <i>Incorporation</i> , empresa
LIM	Laboratório de Investigação Médica
µm	micrometro
µm ²	micrometro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
MD	Estado de Maryland, Estados Unidos da América
p	significância estatística
p.	página
%	porcentagem, por cento
®	marca registrada
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Laringoscópio: (A) esquema; (B) foto	24
Figura 2	Fonocirurgia com uso do telescópio	25
Figura 3	Imagem visualizada no monitor de vídeo das pregas vocais do coelho	25
Figura 4	Bisturi utilizado para realização da lesão	26
Figura 5	Agulha para infiltração	27
Figura 6	Prega vocal após coloração com picrossírius após 7 dias com corticóide: (A) luz não-polarizada (100X); (B) luz polarizada (100X)	31
Figura 7	Imagem do retículo utilizado para quantificação das células inflamatórias	33
Figura 8	Reação inflamatória na lesão da prega vocal após o 3 ^o dia: (A) controle. HE (400x); (B) corticosteróide. HE (400x) (HE = hematoxilina-eosina)	36
Figura 9	Reação inflamatória na lesão da prega vocal após o 7 ^o dia: (A) controle, HE (400x); (B) corticosteróide, HE (400x). (HE = hematoxilina-eosina)	37
Figura 10	Fibras colágenas (picrossírius) da prega vocal com corticóide: (A) 3 dias; (B) 7 dias	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Média da densidade numérica de cada célula (MRI2) (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos) em relação à intervenção (corticóide x controle)	39
Gráfico 2	Média geral da densidade numérica de todas (MRI3) as células em função do tempo (3 e 7 dias) e da intervenção (corticóide x controle)	40
Gráfico 3	Média da área do colágeno, em valores percentuais, medido do controle e da intervenção em 3 e 7 dias	42
Gráfico 4	Média da área do colágeno aos 3 e 7 dias em relação à intervenção ($p =$ significância)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média da densidade numérica de todas as células (MRI1) em relação à intervenção (corticóide <i>x</i> controle)	38
Tabela 2	Média da área total analisada <i>versus</i> intervenção	41
Tabela 3	Média da medida do colágeno em função do tempo	42
Tabela 4	Média da área do colágeno total em relação à intervenção (3 e 7 dias)	44

RESUMO

Campagnolo AM. Estudo histológico da ação do corticosteróide injetável no processo agudo de cicatrização das pregas vocais de coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 119p.

Corticosteróides injetáveis têm sido usados em fonocirurgia com o intuito de se prevenir fibrose da prega vocal pelos seus efeitos na cicatrização e assegurar uma melhor qualidade vocal. O objetivo deste estudo é avaliar histologicamente os efeitos da infiltração de dexametasona no processo agudo de cicatrização, 3 e 7 dias após uma lesão induzida cirurgicamente na prega vocal de coelhos, através da análise quantitativa da reação inflamatória e da deposição de colágeno. Uma incisão cirúrgica foi realizada nas pregas vocais de 12 coelhos, seguido da injeção de 0,1ml de dexametasona na prega vocal esquerda. A prega vocal direita não recebeu nenhuma injeção e serviu como grupo controle. As laringes foram coletadas 3 e 7 dias após a cirurgia. As pregas vocais foram histologicamente analisadas com hematoxilina-eosina para quantificar a resposta inflamatória e picrossírius-red para quantificar a deposição de colágeno. Quantitativamente, não houve diferença significativa na resposta inflamatória das pregas vocais com corticosteróide em relação ao controle. A deposição de colágeno no grupo com corticóide foi estatisticamente menor em 3 dias e permaneceu menor em 7 dias após a lesão cirúrgica ($p=0,002$). Esses resultados sugerem que os corticosteróides diminuem a deposição do colágeno no processo agudo da cicatrização.

Descritores: Corticosteróides injetáveis, cicatriz pregas vocais, colágeno pregas vocais, reação inflamatória pregas vocais.

SUMMARY

Campagnolo AM. Histologic study of corticosteroid injection in the acute vocal fold wound healing in a rabbit model. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 119p.

Injectable corticosteroids have been used in phonosurgery to prevent scarring of the vocal fold due to their effects on wound healing, and to assure better voice quality. The aim of this study is to evaluate histologically the effects of dexamethasone infiltration on acute vocal fold wound healing in rabbits 3 and 7 days after surgically-induced injury, by quantification of the inflammatory reaction and collagen deposition. A standardized surgical incision was made in the vocal folds of 12 rabbits, and 0.1 ml dexamethasone (4 mg/ml) was injected into the left vocal fold. The right vocal fold was not injected and served as the control. The larynges were collected 3 and 7 days after surgery. For histological analysis, the vocal folds were stained with hematoxylin-eosin for quantification of the inflammatory response and with picrosirius red for quantification of collagen deposition. There was no quantitative difference in the inflammatory response between vocal folds injected with the corticosteroid and the control folds. However, collagen deposition was significantly lower in the corticosteroid-treated group at 3 and 7 days after the injury ($p = 0.002$). The present results suggest that dexamethasone reduces collagen deposition during acute vocal fold wound healing.

Descriptors: Injectable corticosteroids, vocal fold scar, collagen, inflammatory reaction.



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SUBMISSION

Send manuscripts to Richard J. H. Smith, MD, Editor, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, The University of Iowa Hospitals and Clinics, 200 Hawkins Dr, Iowa City, IA 52242. Original manuscripts dealing with clinical or scientific aspects of otolaryngology, bronchoesophagology, head and neck medicine and surgery, maxillofacial and plastic surgery, audiology, speech pathology, or related specialties are considered for publication. All materials submitted for publication undergo peer review. Submit 3 complete copies (including figures) and an electronic version with a signed copyright transfer statement (see “Copyright,” below). Include an e-mail address for notification of receipt of manuscript. All submitted manuscripts **must** be accompanied by a cover letter. This letter should disclose any financial interests the authors have in relation to the work, or any financial support provided by companies toward the completion of the work. The letter should also indicate whether the manuscript has been presented before any professional otolaryngological association and the place and year of presentation. **Manuscripts submitted without this letter will not be reviewed and will be returned to the author.**

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

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

Title page must include 1) a concise but informative title, worded to facilitate indexing; 2) an abbreviated form of the title to be used as a running head; 3) authors’ full names (**inclusion of more than five authors requires written explanation to the Editor at time of submission**) and no more than two academic degrees per author; 4) department(s) and

institution(s) to which the work is attributed, with authors' present affiliations and addresses, if different, separately noted; 5) statement of grant or other support; 6) name and address of author to whom reprint requests should be sent; and 7) name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of corresponding author. Manuscripts that report animal research performed in the United States must carry the following statement on the title page: "This study was performed in accordance with the PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, the NIH **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, and the Animal Welfare Act (7 U.S.C. et seq.); the animal use protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of _____ University (or institution)."

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

Key Words, chosen as far as possible from the National Library of Medicine medical subject headings, are listed after the abstract. A maximum of 6 are permitted. References, double-spaced, are numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. Primary references should be used whenever possible. The author is charged \$2.00 for each reference over 30. Use the style of references given in the **Uniform Requirements** or a current issue of the **Annals**. Include the names of all authors and the inclusive page numbers of an article. If a manuscript accepted but not yet published is included in the reference list, give the accepting journal's name, followed by "in press." Manuscripts still in review or not yet accepted formally should be cited within the text as "unpublished observations." A reference to a personal communication is also placed in the text, accompanied by a date (year). Papers presented at scholarly meetings but not published are considered "unpublished observations." Papers published only in abstract form are listed as references with "[Abstract]" after the title.

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

ELECTRONIC SUBMISSION

Software and format must be Microsoft Word. Do not use complex formatting or desktop publishing software. Do not deliver files that contain hidden text. For example, do not use your word processor's automated features to create footnotes and reference lists. Submit text, tables, and figure legends as a single file. Do not include illustrations in this file. Illustrations should be in TIFF, EPS, JPEG, or PSD formats. Do not submit illustrations in Powerpoint. Do not submit native application formats. Journalquality reproduction will require grayscale and color files at resolutions of at least 300 dpi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions of at least 600 dpi. (These resolutions refer to the output size of the file.)

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

REPRINTS

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

COPYRIGHT

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

SUPPLEMENTS

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

REVIEWS OF SOFTWARE AND COMPUTER APPLICATIONS

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

February 2008

September 2, 2009

MS: 09-4357; Histological study of acute vocal fold wound healing after
corticosteroid injection in a rabbit model

Dear Dr. Campagnolo:

I am pleased to inform you that the Editorial Board of the Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology has found your manuscript titled "Histological study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model" suitable for publication. Editorial preparations will now begin in the Managing Editor's office in St. Louis.

Only a small fraction of the manuscripts submitted to the Annals are accepted for publication, and I congratulate you on your accomplishment.

With kind regards,

Richard JH Smith, MD

Editor

**Histological study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid
injection in a rabbit model**

Acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection

Andréa M Campagnolo¹, Domingos Hiroshi Tsuji², Luiz Ubirajara Sennes³, Rui Imamura⁴, Paulo H. N. Saldiva⁵

- (1) Otorhinolaryngologist, PhD Student, São Paulo University School of Medicine.
- (2) Associate Professor, Discipline of Otorhinolaryngology, São Paulo University School of Medicine.
- (3) Associate Professor, Discipline of Otorhinolaryngology, São Paulo University School of Medicine.
- (4) Collaborating Professor, Discipline of Otorhinolaryngology, São Paulo University School of Medicine.
- (5) Full Professor, Department of Pathology, São Paulo University School of Medicine.

From the Department of Otolaryngology (a.m.c., d.h.t., l.u.s., r.i.) and Department of Pathology (p.h.n.s.), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Send correspondence to Andrea M Campagnolo. R. Alceu Amoroso Lima 105/1802, Barra da Tijuca, 22631010, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. E-mail: amcampag@ig.com.br. Phone: +552194214122, fax: +552124955044.

Abstract

Introduction: Injectable corticosteroids have been used in phonosurgery to prevent scarring of the vocal fold due to their effects on wound healing, and to assure better voice quality.

Objective: To histologically evaluate the effects of dexamethasone infiltration on acute vocal fold wound healing in rabbits 3 and 7 days after surgically-induced injury by quantification of the inflammatory reaction and collagen deposition.

Study design: Experimental study in rabbits.

Material and Methods: A standardized surgical incision was made in the vocal folds of 12 rabbits, and 0.1 ml dexamethasone (4 mg/ml) was injected into the left vocal fold. The right vocal fold was not injected and served as the control. The larynges were collected 3 and 7 days after surgery. For histological analysis, the vocal folds were stained with hematoxylin-eosin for quantification of the inflammatory response and with picrosirius red for quantification of collagen deposition.

Results: There was no quantitative difference in the inflammatory response between vocal folds injected with the corticosteroid and control folds. However, collagen deposition was significantly lower in the corticosteroid-treated group at 3 and 7 days after injury ($p = 0.002$).

Conclusion: The present results suggest that dexamethasone reduces collagen deposition during acute vocal fold wound healing.

Key words: Injectable corticosteroids, vocal fold scar, collagen, inflammatory reaction.

Introduction

Phonosurgery techniques and instruments have been improved over the years and now permit the removal of benign vocal fold lesions with maximum preservation of adjacent normal tissue. Understanding of the body-cover theory of the vocal fold is fundamental for phonosurgery. The mucosal wave is generated by sliding the mucosal cover over the vocal ligament and muscle. This cover can be divided into different layers with distinct mechanical properties that can be distinguished by their concentration of collagen and elastin fibers.¹ Most benign vocal fold lesions occur in the superficial layer of the lamina propria, and surgery should therefore be confined to this layer. According to Schweinfurth and Ossoff,² damage to the deep layers of the lamina propria and to the vocal ligament is associated with a more intense formation of scar tissue. This scarring causes the adhesion of the mucosal cover to deep tissues, impairing the mucosal wave and consequently causing dysphonia. Vocal fold scarring is the most common cause of dysphonia (35%) after phonosurgery.³

Studies have shown that an increase in collagen provides the basis of fibrosis and scar resistance, which mainly depends on collagen content.⁴⁻⁷ Scar formation resulting from the replacement of healthy tissue by fibrous tissue may permanently alter vocal fold function and may lead to a decrease or loss of the mucosal wave.⁸ In an attempt to obtain data that would contribute to the development of a treatment method that minimizes fibrosis in the vocal fold after injury, many studies are aimed at a better understanding and manipulation of the vocal fold wound healing process.^{9,10,11-15}

Systemic corticosteroids, especially injectable corticosteroids, are frequently used in laryngeal microsurgery of the vocal folds in order to prevent scar formation and, consequently, to assure better voice quality.^{2,16,17} Corticosteroids delay the healing process, permitting a better organization of scar tissue. However, the effects of these drugs on the vocal folds have not been well established.^{18,19}

The objective of the present study was to histologically evaluate the effects of dexamethasone infiltration on acute vocal fold wound healing in rabbits 3 and 7 days after surgically-induced injury by quantitative analysis of the inflammatory reaction and collagen deposition. The results were compared to control vocal folds that were submitted to similar surgery.

Materials and Methods

Animals and Surgery

The study was approved by the Ethics Committee for the Analysis of Research Projects (CAPPesq) of the Clinical Board of the University Hospital and São Paulo University School of Medicine. The study was conducted according to guidelines for the care and use of laboratory animals following the norms of Federal Law No. 6.638 (enacted May 8, 1979), and the ethical principles of the Brazilian College on Animal Experimentation (COBEA).

New Zealand albino rabbits (n = 12) of both sexes, weighing 2.5 to 3.5 kg, were used. A laryngoscope was developed by Ferrari Medical (São Paulo, SP, Brazil) to adapt the direct laryngoscopy technique to the anatomy of the rabbit. The instrument used to produce the surgical injury was fabricated by the same

manufacturer and consisted of a spear-shaped knife (2 mm wide, 2 mm deep at its central end and 1 mm deep at its borders) with a transverse shield, which restricted the depth of penetration into the vocal fold to 2 mm in the center of the lesion. The needle used for dexamethasone infiltration was also fabricated for this study and contained a pin that permitted the standardization of injection at a depth of 2 mm. The caliber of the needle corresponded to the diameter of the needle used for insulin injection (0.4 x 12 mm), and the needle was coupled to an insulin syringe to permit standardization of the injection volume.

Laryngeal microsurgery was performed on 12 rabbits. The animals were anesthetized by intramuscular injection of xylazine (5 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg) and maintained under spontaneous ventilation. Adequate exposure of the glottis was obtained for all animals.

Surgery was performed under endoscopic vision using a 4-mm diameter telescope with an angle of 30 degrees (Karl Storz[®]). A puncture wound was made with the knife in the upper surface of the vocal folds in the midpoint of its membranous portion (both in the anteroposterior and lateromedial direction), resulting in a longitudinal lesion parallel to the free border and in the center of the vocal folds. The dimensions of the injury were standardized and were similar to that of the tip of the knife. Next, 0.1 ml (0.4 mg) dexamethasone was injected into the left vocal fold of each rabbit lateral to the incision. The right vocal fold was not injected and served as control.

Half of the animals were sacrificed 3 days after injury; the remaining rabbits were sacrificed at 7 days post-injury. Larynges were removed en bloc from the base of the tongue to the fourth tracheal ring by cervical incision. An anterior longitudinal

incision was made in the larynx and the right and left wings of the thyroid cartilage were separated. Each hemi-larynx was identified for subsequent blind assessment.

Histological study of the vocal fold

The excised larynges were fixed in 10% formaldehyde and processed at the Pathological Anatomy Laboratory of the institution (University Hospital and São Paulo University School of Medicine). The vocal folds were cut into three parts (anterior, middle and posterior) and the middle third containing the injury was selected for the study. Specimens were gradually dehydrated in progressive alcohol concentrations and embedded in paraffin melted in an oven at 60°C. The specimens were then oriented, cut into 4- μ m coronal sections with a microtome, deparaffinized, and stained. For standardization, specimens were prepared by a single experienced technician who carried out the whole staining procedure.

Hematoxylin-eosin staining was used for the identification of cell nuclei of the inflammatory infiltrate surrounding the injury. Picrosirius staining was used for the visualization and analysis of collagen fibers. This method consists of staining with Sirius red dissolved in saturated aqueous picric acid. The slides were analyzed by polarized light microscopy.²⁰ The picrosirius polarization method permits the differentiation between collagen and non-collagen tissue. A non-collagen substance is stained black and collagen is stained red (thicker), orange, yellow or green (thinner) according to its thickness and maturity (Figure 1 A and B).

The specimens were analyzed histologically with a Zeiss Axiostar Plus 1169-151 microscope at 400X magnification. Analysis of individual images showed that the surgical injury was captured in all rabbits. The injury was histologically defined as an epithelium-denuded area at 3 days or thin epithelium at 7 days associated with

an inflammatory reaction and signs of wound healing. A single blinded pathologist determined the number of inflammatory cells and collagen in all vocal folds, examining three to five fields per histological slide containing the injured vocal folds. An eyepiece grid with 50 horizontal lines connecting 100 points was used for the counting of inflammatory cells.²¹ Cells associated with inflammation and mucosa remodeling were counted (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages, fibroblasts, and plasma cells). The results are expressed as numerical density, which corresponds to the relative frequency of these cells (number of cells in $62,500 \mu\text{m}^2$) in each field at 400X magnification. Collagen fibers were quantified with a digital image analysis system using the Image Pro Plus software, version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD). In the image capture system used, the camera was set to capture images of higher birefringence and to calculate the results in μm^2 . The concentration of collagen fibers was determined by the number of collagen fibers of higher birefringence per area unit measured (area of collagen fibers divided by total area x 100).

The measurements were transferred to the SPSS® program (version 14.0) for statistical analysis.

Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney test was used for statistical analysis of the inflammatory response and collagen deposition to determine possible differences between study times. Possible differences between the intervention and control groups were evaluated by the nonparametric Wilcoxon test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Inflammatory reaction

Figures 2 (A and B) and 3 (A and B) show the inflammatory reaction in control and corticosteroid-treated vocal folds, respectively, at 3 and 7 days after injury.

The mean overall numerical density of all cells was 3.16 (\pm 1.12) in the corticosteroid-treated group and 2.48 (\pm 0.98) in the control group, with no significant difference between groups ($p = 0.099$). The mean numerical density of each cell type (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages, fibroblasts, and plasma cells) did not differ between the corticosteroid-treated and control groups (Figure 4). The mean overall numerical density of all cells as a function of time (3 and 7 days after injury) was similar in the corticosteroid-treated and control groups (Figure 5).

Collagen

The mean total area per vocal fold analyzed was 48,478.42 μm^2 in the corticosteroid-treated group and 47,608.82 μm^2 in the control group, with no significant difference between groups ($p = 0.386$).

The concentration of collagen fibers in each vocal fold was calculated per μm^2 (Figure 6).

The collagen fiber concentration showed a significant increase at 7 days in both corticosteroid-treated and control vocal folds ($p = 0.037$) (Table 1).

With respect to collagen deposition, the mean total collagen area (12 rabbits, 3 and 7 days) was 0.18 (86.23111 μm^2) in corticosteroid-treated vocal folds and 0.56

(273.6686 μm^2) in the control group. This difference was statistically significant ($p = 0.002$), demonstrating that corticosteroid treatment promoted a reduction in the quantity of collagen during wound healing .

Collagen deposition was significantly lower in the corticosteroid-treated group at 3 and 7 days after injury (Figure 7).

Figure 8 shows the number of fibroblasts and quantity of collagen in the corticosteroid-treated and control groups at 3 and 7 days. The number of fibroblasts was higher in the corticosteroid-injected group compared to control, but the difference was not significant ($p = 0.463$ in 3 days and $p = 0.916$ in 7 days), whereas the quantity of collagen was significantly lower in the corticosteroid-treated group ($p = 0.028$ in 3 days and $p = 0.028$ in 7 days).

Discussion

No currently available therapeutic method is effective in the treatment of vocal fold scarring.²² Injection of corticosteroids is widely used for vocal fold wound healing and has been associated with a reduction of stiffness and improvement of glottic closure and voice quality.^{16,23} However, according to these authors, some degree of fibrosis always persists.

Local injection of corticosteroids is an effective method to achieve a high concentration only in the target organ, such as the larynx, and has a low frequency of adverse effects, since these agents are rapidly inactivated after absorption (with the result that only inactive metabolites enter the bloodstream).²⁴ Bouchayer and Cornut¹⁶ used injectable hydrocortisone to reduce the post-traumatic inflammatory

response. We chose dexamethasone because of its high long-term efficacy and low cost.

Corticosteroids affect the synthesis and maturation of collagen, alter wound strength, inhibit the function of fibroblasts and suppress the antibacterial and phagocytic action of some defense cells, thus changing the pattern and delay of wound healing.²⁵ The effect of corticosteroids is more apparent during the first four days after injury. After this period, the corticosteroid effect is minimal, except for the inhibition of normal resistance to infection.²⁶ According to Branski et al.¹⁵ and Tateya et al.,¹³ the acute healing process is a critical period during which therapeutic intervention may reduce stiffness of the vocal fold scar, with inflammatory cells and fibroblasts starting to synthesize extracellular matrix components within 2 to 3 days after injury. Also in the study of Tateya et al.,¹³ extracellular matrix components such as hyaluronic acid, collagen and fibronectin were found to be produced immediately after surgical incision in the vocal fold and were more prominent between the third and fifth day. The authors concluded that this period might be important for therapeutic investigations whose objective is the prevention of fibrous scars after vocal fold injury. Thus, if the objective is the prevention of fibrosis formation, the ideal time for the application of a long-term corticosteroid is the beginning of the inflammatory process, i.e., the end of surgery. On the basis of these studies, we chose the initial phase of this inflammatory process, i.e., immediately after injury, for corticosteroid injection in order to evaluate the possible modulatory effect of the drug on the healing process. The decision to evaluate the healing process on the third day was based on the study conducted by Branski et al.,¹⁵ which demonstrated massive proliferation of inflammatory cells and fibroblasts around the surgically-

induced vocal fold wound during this period. Evaluation of vocal fold wound healing on day 7 was based on the fact that new collagen is deposited by day 5, with fibroblasts being the predominant cells at that time.¹⁵ More mature collagen is detected by day 7.²⁷ However, it should be emphasized that the results of the present study and of other investigations using rabbit and rat models^{13,15} should be evaluated with caution since these animals present a shorter healing period than humans.

In the present study, the number of inflammatory cells was not affected by corticosteroid injection ($p > 0.05$). Coleman et al.¹⁸ evaluated the effects of triamcinolone injected into the vocal folds of dogs after the introduction of a lateral microflap (surgical injury). The contralateral vocal fold, which was submitted to the same type of surgery and not injected with the corticosteroid, served as the control. Paired analysis revealed an increase in the inflammatory infiltrate around the microflap in corticosteroid-treated vocal folds at 2, 4 and 6 weeks. In that study, triamcinolone caused a delay in the corticosteroid-treated vocal fold tissue response of 12 days for the inflammatory infiltrate. No delay in the inflammatory response was observed in the present study. The difference between our results and the findings of Coleman et al.¹⁸ might be due to methodological differences, such as the type of injury and period studied.

The finding that corticosteroid treatment apparently did not affect the number of inflammatory cells should be interpreted with caution and some considerations can be made. In contrast to what the result shows, the presence of the corticosteroid inside the tissue might have had an effectively inhibitory action on the migration of inflammatory cells. However, the fact that the test vocal fold suffered traumas caused by the incision, introduction of the needle and tissue expansion due to the injected

volume may have resulted in a greater migration of inflammatory cells than observed in the control fold, apparently abolishing the inhibitory effect of the corticosteroid. Another consideration is that, since the volume of the injected drug is relatively large when compared to the small dimensions of the rabbit vocal fold, the possibility that drug diffusion by contiguity to the control fold might have exerted an anti-inflammatory effect cannot be completely ruled out. However, this hypothesis does not seem to be very likely since, if this would have really occurred, no significant differences in collagen fiber concentration can be expected. Finally, another possibility is that the injected corticosteroid acts on the control fold through its systemic effect, i.e., bloodstream diffusion. However, this hypothesis seems unlikely since, according to Wannmacher and Ferreira,²⁴ local injection of corticosteroids results in a high concentration of the drug in the target tissue, which is rapidly inactivated after its absorption so that only inactivated metabolites enter the bloodstream.

In the present study, a significantly lower collagen deposition at the site of injury was observed in corticosteroid-treated vocal folds ($p = 0.002$). Only one study in the literature has compared the deposition of collagen in injured vocal folds after corticosteroid injection. In that study, Alencar et al.¹⁹ injected corticosteroid immediately before the excision of a mucosal fragment from the border of the vocal folds of six pigs. Comparison with the control (the same injury without injection of the corticosteroid) after 30 days showed a nonsignificant reduction of collagen deposition in the vocal fold lamina propria. However, in that study, collagen deposition was evaluated 30 days after the procedure, whereas in the present

investigation collagen deposition was analyzed on the third and seventh day, a fact impairing technically precise comparison between studies.

We observed a larger number of fibroblasts in the corticosteroid-treated group compared to the control vocal fold, but the difference was not significant. One explanation for this apparently unexpected result is the fact mentioned earlier that injection of the corticosteroid into the vocal fold might have caused greater damage and tissue distension. On the other hand, despite the lack of a significant difference in the number of fibroblasts, the quantity of collagen was significantly lower in the corticosteroid-treated group. This finding might be explained by the fact that fibroblasts produced less collagen in the corticosteroid-treated fold. According to Kloth and McCulloch,²⁵ corticosteroids may interfere with the mechanisms of collagen production by these cells.

We believe that a better understanding of the physiopathological mechanisms underlying collagen deposition during wound healing is important for the treatment and prevention of vocal fold scars after phonosurgery. The present results suggest that corticosteroids, frequently used in phonosurgery to prevent fibrosis, influence collagen deposition during acute wound healing. However, further studies are necessary to determine whether these alterations persist into the late phase of collagen remodeling.

Conclusion

In the present study, corticosteroid injection into the vocal fold of rabbits after a surgical procedure reduced collagen deposition at the site of injury during the acute inflammatory response. The number of inflammatory cells at the site of injury was not affected by corticosteroid treatment.

References

1. Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, eds. *Vocal Fold Physiology: Frontiers of Basic Science*. San Diego: Singular Publishing; 1993:1-34.
2. Schweinfurth JM, Ossoff RH. Surgery for dysphonia. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 7(6): 357-64.
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: 1084-91.
4. Ehrlich HP. Collagen considerations in scarring and regenerative repair. In Garg HG, Longaker MT eds. *Scarless Wound Healing*. New York, NY: Marcel Dekker Inc.; 2000, p. 99-113.
5. Hirano M, Phonosurgery. Basic and clinical investigation. *Otologia (Fukuoka)* 1975; 21(suppl 1): 299-303.
6. Rogerson AR, Clark KF, Bandi SR, et al. Voice and healing after vocal fold epithelium removal by CO₂ laser vs. microlaryngeal stripping. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115: 352-9.
7. Blakeslee DB, Banks RE, Eusterman V, et al. Analysis of vocal fold function in the miniswine model. *J Invest Surg* 1995; 8: 409-24.
8. Benninger MS, Alessi D, Archer S. Vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope* 2003; 113: 620-7.
9. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope* 2003; 113:620-7.

10. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002; 16:96-104.
11. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice* 2004; 18: 116-24.
12. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless D. Histologic characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114(3): 183-91.
13. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless D. Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115(4): 285-92.
14. Lim X, Tateya I, Tateya T, Muñoz-Del-Rio A, Bless D. Immediate inflammatory response and scar formation in wounded vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115(12): 921-9.
15. Branski RC, Verdolini K, Rosen CA, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114: 19-24.
16. Bouchayer M, Cornut G. Microsurgery for benign lesions of the vocal fold. *Ear Nose Throat J* 1998; 67: 446-66.
17. Courey MS, Gardner GM, Stone RE, Ossoff RH. Endoscopic vocal fold microflap: a three-year experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 267-73.
18. Coleman JR, Smith S, Reinisch L, Billante CR, Ossoff J, Deriso W, Garret CG. Histomorphometric and laryngeal videostroboscopic analysis of the effects of corticosteroids on microflap healing in the dog larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108: 119-27.
19. Alencar BLF, Baptistella E, Malafaia O, Czezko NG, Scopel TF, Trotta F, Costa AFCB, Watanabe SS, Silva TP. Estudo experimental de corticóide

- injetável em microcirurgia laríngea. *Arq Int Otorrinolaringol* 2007; 11(4): 438-43.
20. Mello ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes UL, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003, 113: 2187-91.
 21. Mallik MK, Kapila K, Das DK, Haji BE, Anim JT. Cytomorphology of hyaline-vascular Castleman's disease: a diagnostic challenge. *Cytopathology* 2007; 18: 168-174.
 22. Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13(3): 143-7.
 23. Mortensen M, Woo P. Office steroid injections of the larynx. *Laryngoscope* 2006; 116(10): 1735-39.
 24. Wannmacher L, Ferreira MBC. Antiinflamatórios esteróides. In Fuchs D, Wannmacher L, eds. *Farmacologia Clínica*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998, p. 194-202.
 25. Kloth LC, McCulloch JM. The inflammatory response to wounding. In McCulloch JC, Kloth LC, Feedar JA eds. *Wound healing alternatives in management*. Philadelphia: CPR F. A. Company; 1998, p. 3-15.
 26. Piccinato CE, Netto JC, Cherri J. Cicatrização. In Campos CAH, Costa HOO, eds. *Tratado de Otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca 2002, p. 189-200.
 27. Leibovich SJ. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975, 78(1): 71-100.

Table 1: Mean collagen content as a function of time.

Vocal fold	Day	Mean collagen (%)	SD	Significance (p)
Corticosteroid (n = 6)	3	0.02	0.02	0.037
	7	0.35	0.26	
Control (n = 6)	3	0.31	0.36	0.037
	7	0.80	0.31	

n = number of rabbits; SD: standard deviation.

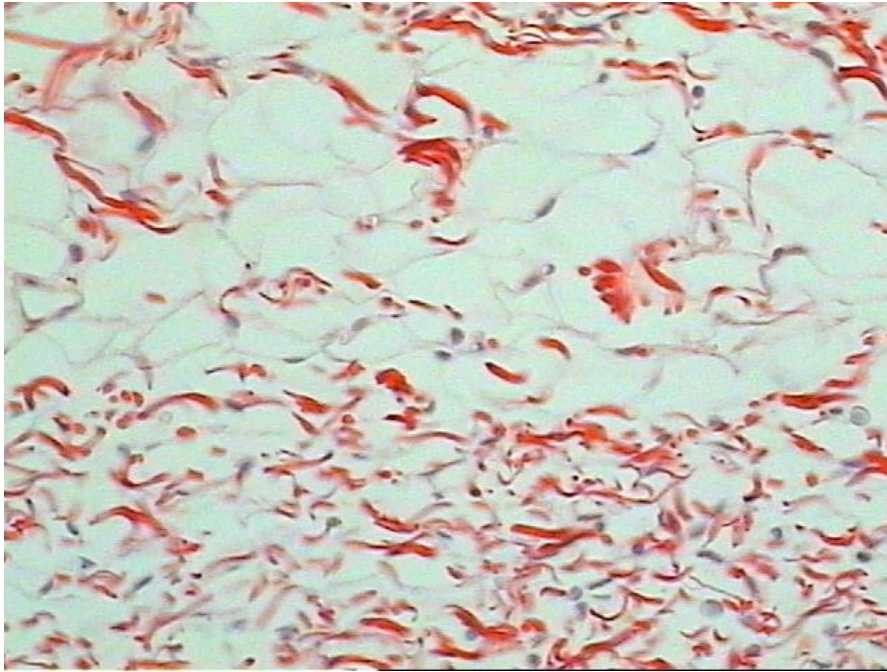


Figure 1A

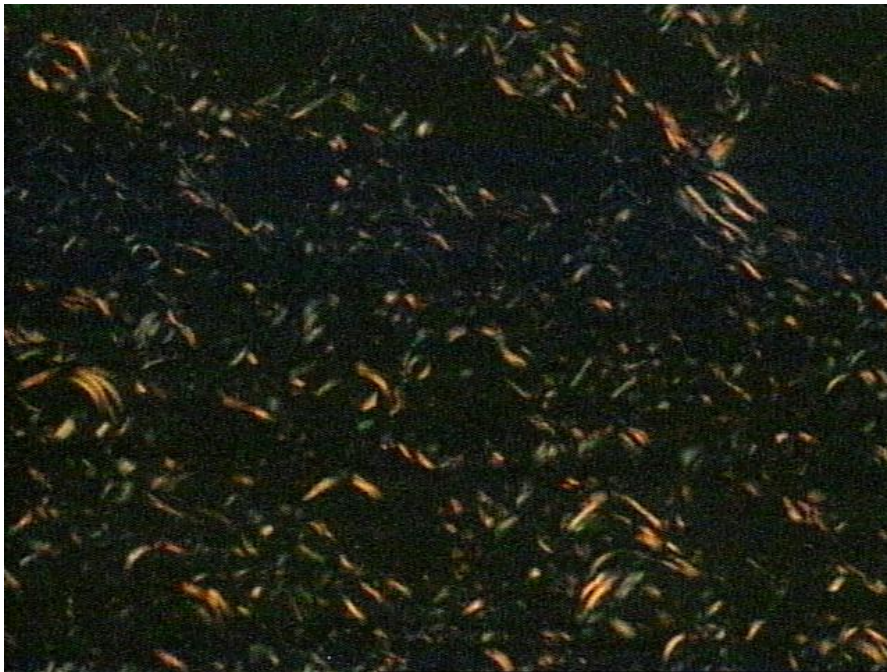


Figure 1B

Figure 1: Coronal sections of a surgically-injured vocal fold 7 days after corticosteroid infiltration (100X, picosirius staining). (A) non-polarized light; (B) polarized light.

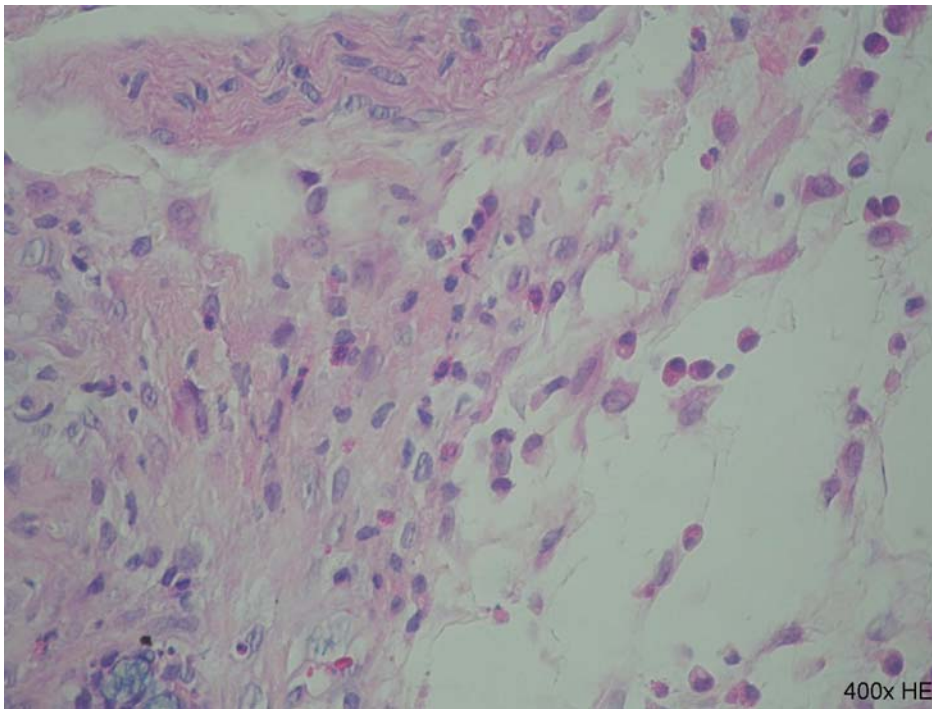


Figure 2A

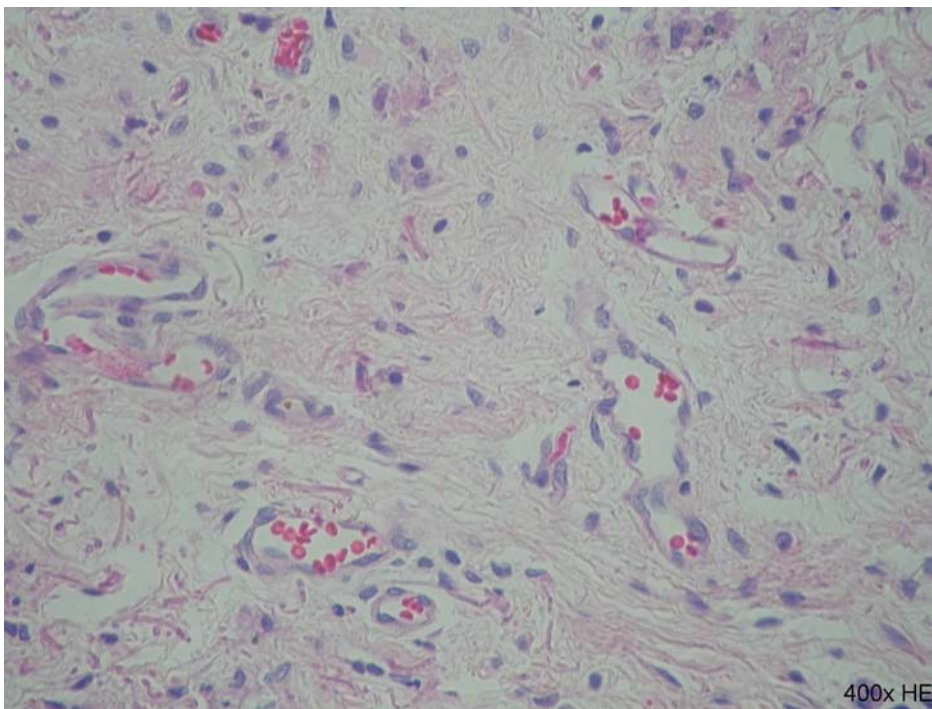


Figure 2B

Figure 2: Coronal sections of a control (A) and corticosteroid-treated vocal fold (B) showing the inflammatory reaction on day 3 after injury (400X, HE).

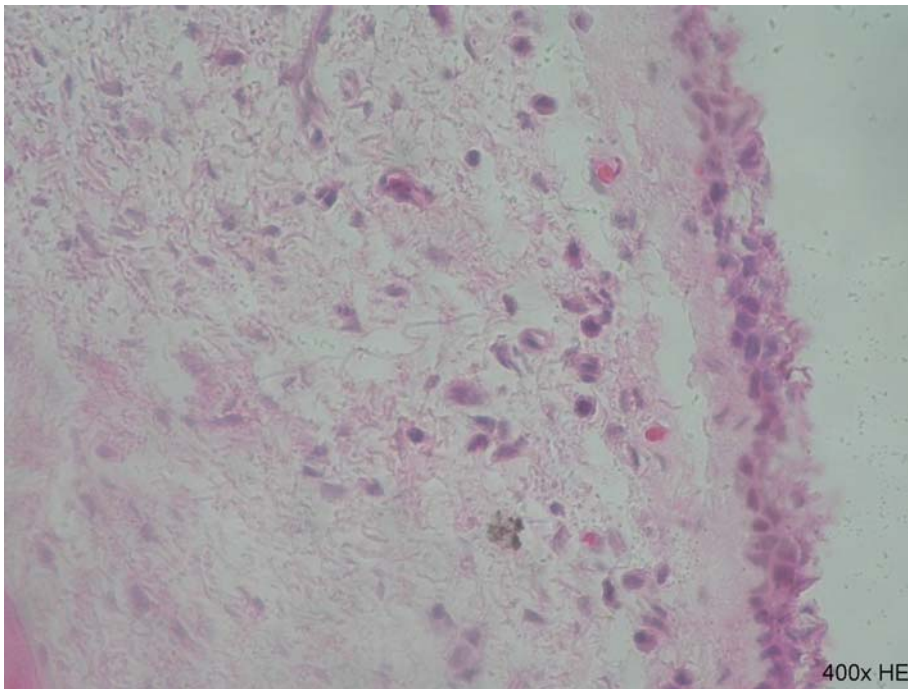


Figure 3A

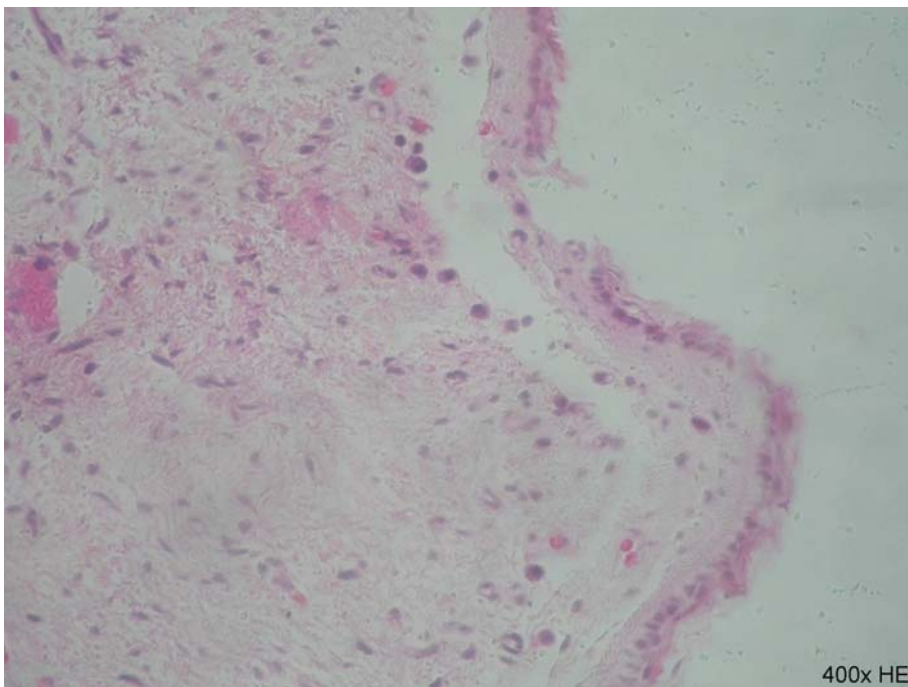


Figure 3B

Figure 3: Coronal sections of a control (A) and corticosteroid-treated vocal fold (B) showing the inflammatory reaction on day 7 after injury (400X, HE).

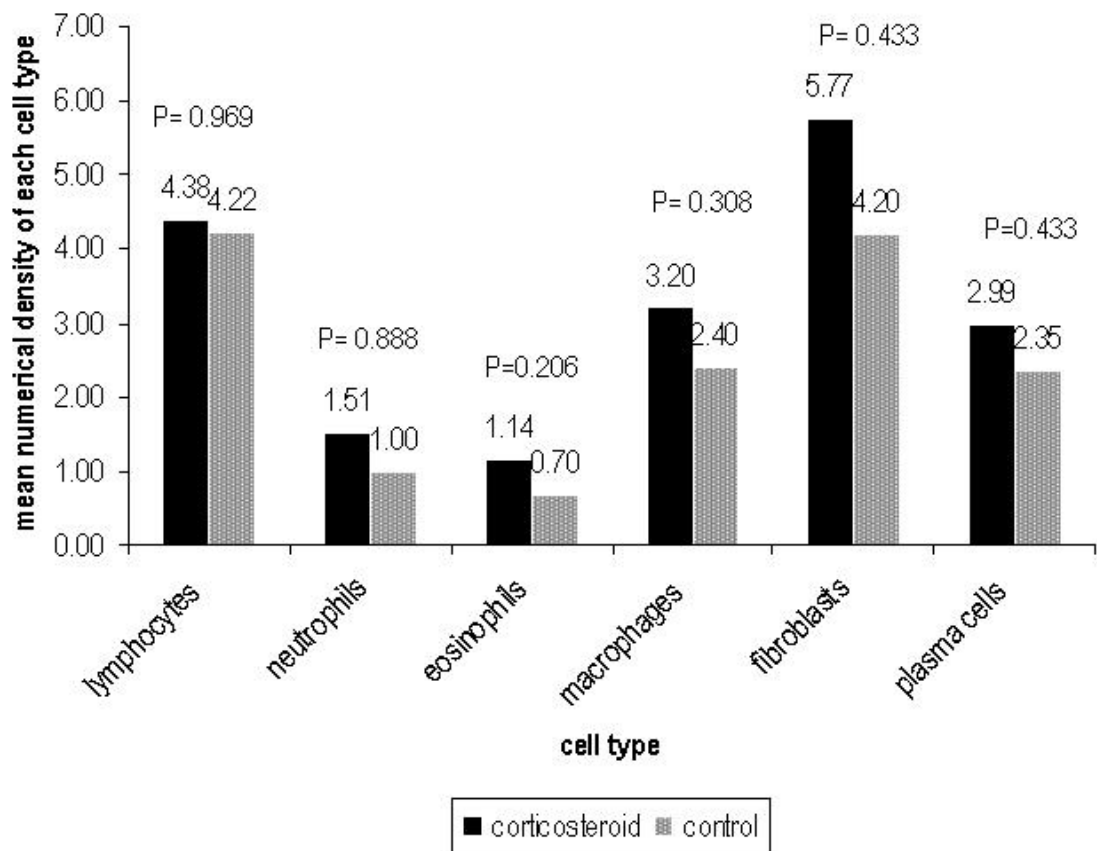


Figure 4: Comparison of mean numerical density of each cell type (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages, fibroblasts, and plasma cells) between corticosteroid-treated and control vocal folds, combining the results obtained at 3 and 7 days. SD = Standard deviation. (SD corticosteroid-treated group: lymphocytes = 2.02; neutrophils = 2.40; eosinophils = 1.50; macrophages = 1.68; fibroblasts = 4.51; plasma cells = 2.11; SD control group: lymphocytes = 2.86; neutrophils = 1.42; eosinophils = 1.30; macrophages = 2.37; fibroblasts = 2.87; plasma cells = 1.77).

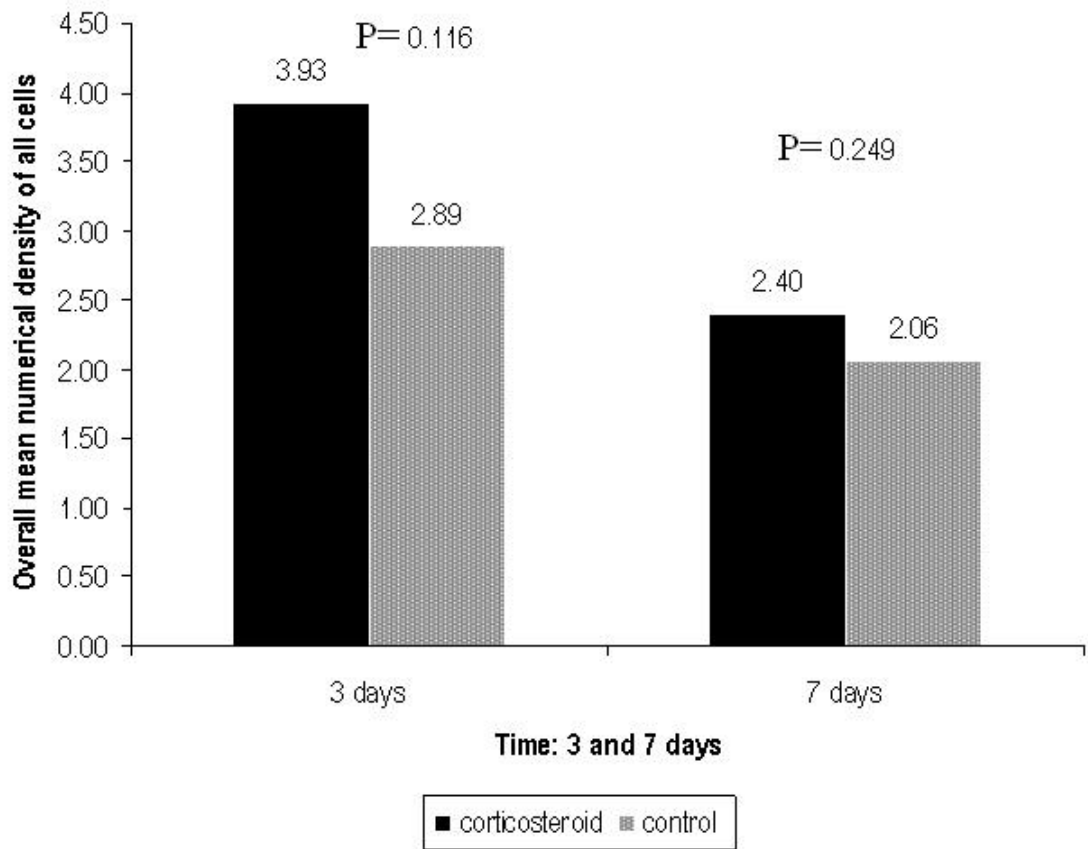


Figure 5: Comparison of overall mean numerical density of all cells 3 and 7 days after injury between corticosteroid-treated and control vocal folds. SD = Standard deviation. (SD 3 days corticosteroid-treated group = 0.89; SD 3 days control group = 1.09; SD 7 days corticosteroid-treated group = 0.74; SD 7 days control group = 0.72).

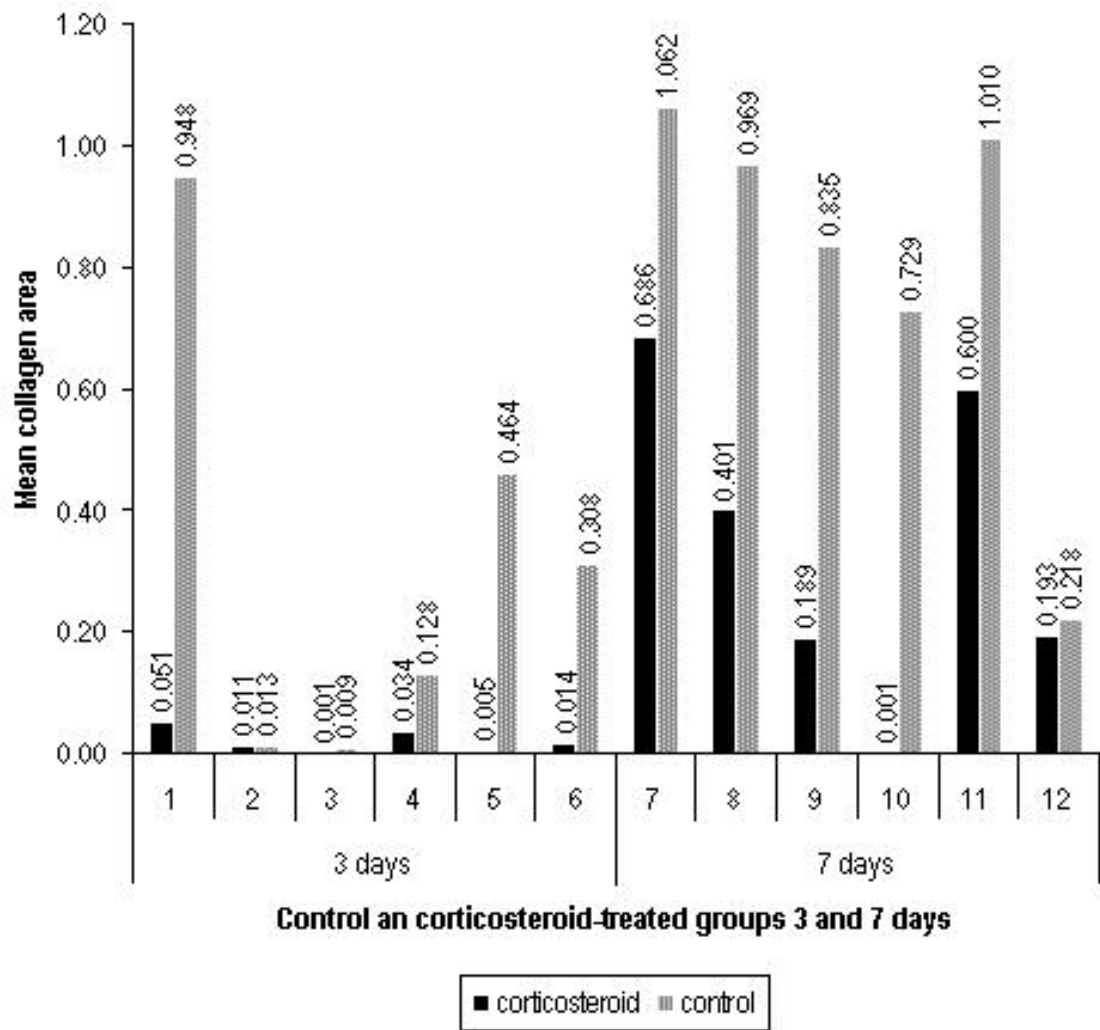


Figure 6: Mean collagen area ($\mu\text{m}^2 \times 100$) in the control and corticosteroid-treated groups 3 and 7 days after injury.

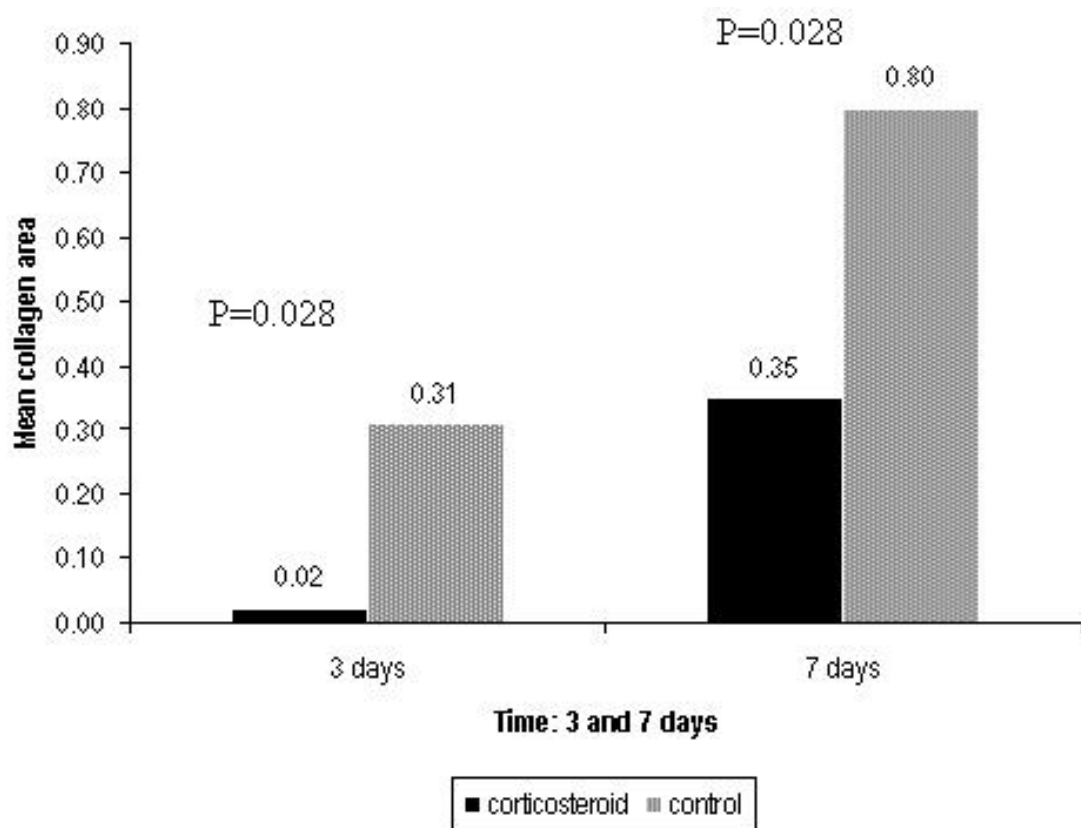


Figure 7: Comparison of mean collagen area ($\mu\text{m}^2 \times 100$) 3 and 7 days after injury between the corticosteroid-treated and control groups. SD = Standard deviation. (SD 3 days corticosteroid-treated group = 0.02; SD 3 days control group = 0.36; SD 7 days corticosteroid-treated group = 0.26; SD 7 days control group = 0.31).

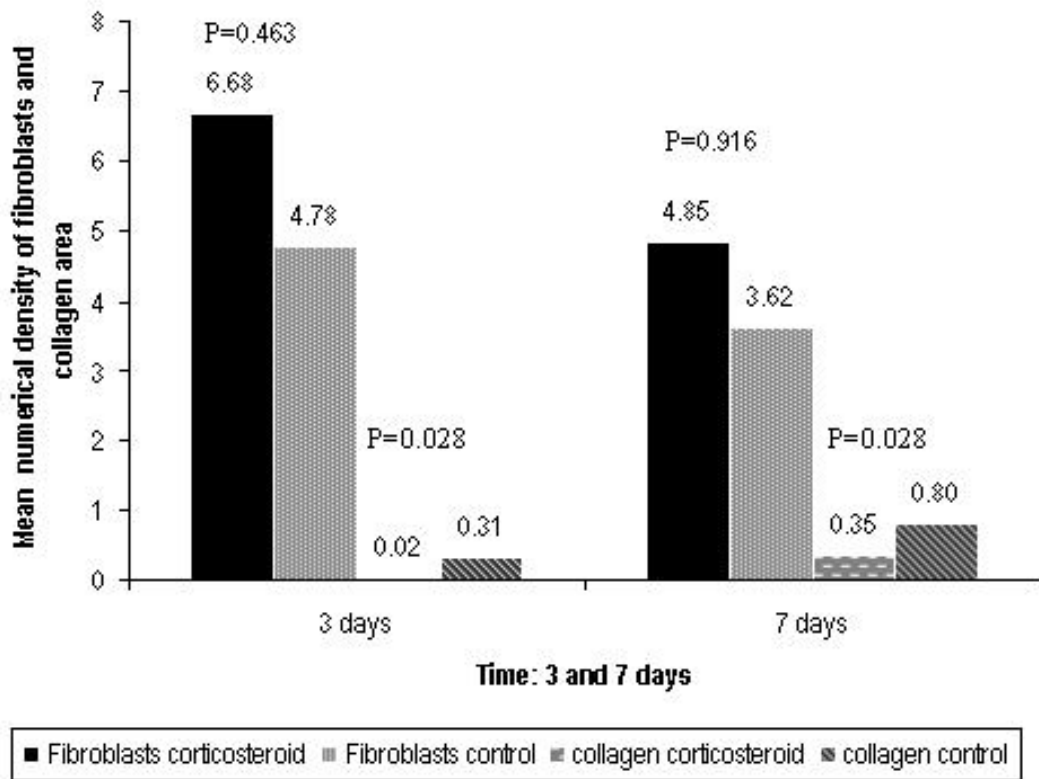


Figure 8: Comparison of the number of fibroblasts and collagen area ($\mu\text{m}^2 \times 100$) between corticosteroid-treated and control vocal folds 3 and 7 days after injury. SD = Standard deviation. (SD 3 days corticosteroid-treated group: fibroblasts = 5.2, collagen= 0.02; SD 3 days control group: fibroblasts = 3.34, collagen = 0.36; SD 7 days corticosteroid-treated group: fibroblasts = 3.97, collagen = 0.26; SD 7 days control group fibroblasts = 2.49, collagen = 0.31).

1 INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos as técnicas e os instrumentos em fonocirurgia têm sido aprimoradas no intuito de remover as lesões benignas das pregas vocais com o máximo possível de preservação dos tecidos normais adjacentes. O entendimento do princípio de corpo-cobertura da prega vocal é fundamental em uma abordagem cirúrgica. A onda mucosa é gerada pelo deslizamento da cobertura mucosa sobre o ligamento vocal e o músculo vocal. Essa cobertura pode ser dividida em camadas com propriedades mecânicas distintas e podem ser distinguidas pela concentração de fibras colágenas e elastina (Gray et al., 1993). A maioria das lesões benignas ocorre na camada superficial da lâmina própria, portanto as abordagens cirúrgicas devem idealmente ser confinadas nessa camada. A violação das camadas profundas da lâmina própria está associada com formação de tecido cicatricial. Essa cicatriz causa fixação da cobertura mucosa aos tecidos profundos, prejudicando a onda mucosa e causando disфония (Schweinfurth, Ossoff, 1999). Uma cicatriz na prega vocal é considerada a causa mais comum de disфония (35%) após fonocirurgia (Woo et al., 1994).

Em geral, uma cicatriz está relacionada com o tecido fibroso. Estudos têm demonstrado que um aumento do colágeno é a base da fibrose e que a resistência da cicatriz depende principalmente do conteúdo de colágeno (Hirano, 1975; Blakeslee et al., 1995; Rogerson et al., 1996; Ehrlich, 2000).

A cicatriz resultante da substituição do tecido normal por tecido fibroso pode alterar de forma permanente a função da prega vocal e levar à diminuição ou perda

da onda mucosa da prega vocal (Benninger et al., 2003). Em busca de conhecimentos que contribuam para o desenvolvimento de um método de tratamento que minimize a formação de fibrose na prega vocal após uma lesão, muitas pesquisas estão sendo direcionadas para o entendimento e manipulação do processo cicatricial na prega vocal (Thibeault et al., 2002; Rosseau et al., 2003; Rosseau et al., 2004; Branski et al., 2005; Tateya et al., 2005; Tateya et al., 2006; Lim et al., 2006).

Os corticosteróides sistêmicos, principalmente os injetáveis, são usados com frequência em microcirurgia de laringe nas pregas vocais, operadas com intuito de prevenir a formação de cicatriz e assim assegurar uma melhor qualidade vocal. (Courey et al., 1995; Bouchayer; Cornut, 1998; Schweinfurth, Ossoff, 1999).

Este tipo de medicação altera a cicatrização, e resulta em menor depósito de colágeno, menor quantidade de tecido de granulação e menor quantidade de células inflamatórias (Carlson et al., 1997; Mulder et al., 1998), no entanto, seus efeitos sobre as pregas vocais não estão bem esclarecidos (Coleman et al., 1999; Alencar et al., 2007).

2 OBJETIVO

Avaliar histologicamente os efeitos da infiltração de dexametasona no processo agudo de cicatrização três e sete dias após uma lesão cirurgicamente induzida na prega vocal de coelhos, por meio da análise quantitativa da reação inflamatória e da deposição de colágeno, e comparar com pregas controles com o mesmo tipo de lesão.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histologia da prega vocal, inflamação aguda e cicatrização

Uma cicatriz iatrogênica na prega vocal pode resultar em disfonia pela diminuição de suas propriedades vibratórias (Rousseau et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado que essas alterações são decorrentes da desorganização do sistema de colágeno (Thibeault et al., 2002).

Na histologia, a prega vocal é composta por cinco camadas: o epitélio de revestimento; a lâmina própria com suas camadas superficial, intermediária e profunda; e, o músculo vocal (Hirano, 1974). A lâmina própria é composta principalmente pela matriz extracelular, que tem propriedades biomecânicas determinantes na fonação e é composta por dois grupos de macromoléculas: as proteínas fibrosas (fibras elásticas e colágenas) e as proteínas intersticiais (glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas). O colágeno e as fibras elásticas conferem, respectivamente, resistência e elasticidade à lâmina própria, enquanto que as glicosaminoglicanas e os proteoglicanos formam géis que preenchem os espaços, retêm água e controlam a viscosidade (Gray et al., 2000; Mello et al., 2003).

O processo de cicatrização de uma lesão das pregas vocais é similar àquele classicamente descrito para derme, embora algumas diferenças tenham sido citadas, como uma reepitalização mais prolongada na subglote (Goldstein et al., 1998) e na estabilização do colágeno, que se processa em 21 dias na derme (Lawrence, 1998) e pode levar até seis meses na prega vocal (Rousseau et al., 2003).

A seqüência de eventos durante os quais um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo cicatricial pode ser dividida em três fases distintas, mas

superpostas: inflamatória, proliferativa e de formação e remodelamento da matriz, e essa última caracterizará a resistência da cicatriz (Piccinato et al., 2002).

A resposta inflamatória começa pelo sangue extravasado pela lesão que forma um coágulo que ocupa o espaço entre as margens da ferida. A partir do coágulo e do tecido lesado, surgem fatores quimiotáticos e vasoativos que promovem o exudato de neutrófilos, macrófagos e monócitos do sangue para as margens da lesão. Por volta de 24 horas o coágulo é invadido por essas células, em 48 horas os macrófagos passam a predominar e passam a liberar citocinas adicionais, tais como: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento dos fibroblastos, fator β transformador de crescimento (TGF- β) e fator ativador das plaquetas (PAF), que ativam e estimulam a proliferação de fibroblastos que migram em direção ao coágulo e atuam na sua reabsorção e começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular (Piccinato et al., 2002). Nesse intervalo, as células da camada basal da epiderme entram em mitose e migram sobre a superfície do coágulo, recompondo o epitélio. Desse modo, após a exsudação dos macrófagos, um tecido conjuntivo vascularizado cresce, preenchendo o espaço antes ocupado pelo coágulo. Esse tecido conjuntivo frouxo, rico em capilares sangüíneos, leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (colágeno tipo III), ácido hialurônico e proteoglicanos recebe o nome de tecido de granulação (Pereira et al., 1994). Cerca de cinco dias após, o tecido de granulação preenche todo o espaço da ferida e o epitélio da epiderme já adquire sua espessura normal iniciando a queratinização (Lawrence, 1998).

O remodelamento é o estágio final no processo de cicatrização. A quantidade de colágeno aumenta, e por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar

na matriz extracelular. Ao mesmo tempo, diminui a síntese de glicosaminoglicano, especialmente do ácido hialurônico. O colágeno tipo I, com fibras mais grossas e compactas passa a predominar em relação ao tipo III. Nas semanas seguintes, o colágeno vai sendo remodelado, com aumento de ligações transversais, tornando-se mais resistente e estável (Pereira et al., 1994).

3.2 Corticosteróides

Os corticóides são amplamente empregados por suas propriedades: antiinflamatória e imunomoduladora. Eles têm um mecanismo de ação muito original que é essencialmente genômico (transcriptacional) e caracterizado pela ativação (transativação) ou inibição (transrepressão) de numerosos genes alvo. Essas moléculas agem em muitas células, envolvendo a imunidade inata (macrófagos, granulócitos, mastócitos) e a imunidade adaptativa (linfócitos), também em outras células (fibroblastos, células epiteliais e endoteliais). A eficácia antiinflamatória dos corticóides relaciona-se com a inibição da síntese de numerosas citocinas, enzimas e mediadores da inflamação, e pela indução de citocinas e moléculas antiinflamatórias como a lipocortina que inibe a liberação de substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos. (Wannmacher, Ferreira, 1998; Sibila, 2003; Campagnolo et al., 2008)

Enzimas lipo e proteolíticas são também diminuídas por estabilização dos lisossomos, assim como o extravasamento de leucócitos para zona de lesão. Há alteração em número de linfócitos e em grau de fibrose. Essas ações, nitidamente,

afetam elementos e etapas da reação inflamatória (Quadro 1). (Wannmacher, Ferreira, 1998; Sibila, 2003)

Quadro 1 - Sítios e mecanismos de atuação de glicocorticóides em reações inflamatórias e imunitárias.

Células	Elemento afetado	Resposta induzida
Macrófagos e monócitos	ácido araquidônico e seus produtos (prostaglandinas e leucotrienos)	Diminuição de vasodilatação, permeabilidade vascular, hipersensibilização de nociceptor, resposta imune
	Citocinas (interleucina-1 e -6, TNF- α)	Diminuição de ativação de linfócitos T e fibroblastos
Células endoteliais	ELAM-1 e ICAM-1	Diminuição da adesão de leucócitos
	Citocinas (interleucina-1) Derivados do ácido araquidônico	Mesmo efeito acima Mesmo efeitos acima
Basófilos	Histamina; leucotrieno C4	inibição de IgE
Fibroblastos	Derivados do ácido araquidônico	Inibição de proliferação
Linfócitos	Citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , GM-CSF, interferon gama)	Inibição de proliferação

Fonte: Adaptado de Wannmacher e Ferreira (1998)

Os corticosteróides inibem múltiplos sítios do sistema imunitário. Interferem tanto na imunidade humoral quanto celular. Pesquisas sugerem que seus efeitos em doenças da imunidade devam-se mais ao bloqueio da resposta inflamatória do que à inibição da reação imunitária (Wannmacher, Ferreira, 1998). São agentes

antiinflamatórios potentes que podem atuar sub-regulando a expressão de genes alvos específicos, incluindo o COX2 (resulta na geração de prostaglandinas), genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (como a IL-1 e FNT- α : induzem a síntese e expressão superficial das moléculas das moléculas de aderência endotelial, como a E-selectina que não está presente no endotélio normal e medeiam a aderência de neutrófilos, monócitos e certos linfócitos por ligação a seus receptores) e a óxido nítrico sintetase (iNOS). Os corticosteróides também supra-regulam genes que codificam proteínas antiinflamatórias potentes, como a lipocortina 1. A lipocortina 1 inibe a liberação de ácido araquidônico (seus metabólitos, os eucosanóides podem mediar praticamente todas as etapas da inflamação) dos fosfolípídeos de membrana (Collins, 2000).

No processo cicatricial, a ação dos corticosteróides ocorre nas duas primeiras fases do processo cicatricial. Inicialmente a ação ocorre sobre a fase inflamatória, inibindo a ação dos macrófagos e dos fibroblastos, bem como sua proliferação pela diminuição da atividade mitótica. Em seguida ocorre uma diminuição na síntese do colágeno. O efeito resultante é uma cicatrização com menos depósito de colágeno, menor quantidade de tecido de granulação e menor quantidade de células inflamatórias (Carlson et al., 1997; Mulder et al., 1998).

A ação dos corticosteróides sobre a cicatrização ocorre pela ação antiinflamatória e por uma depressão geral na síntese de proteínas e inibição da síntese de colágeno. No entanto, seus efeitos podem ser causados mais por sua regulação da condição metabólica geral do que à modificação específica do processo de cicatrização (Martinez-Hernandez, 1990; Collins, 2000).

Os derivados sintéticos diferem entre si quanto à potência glicocorticóide, por

isso são geralmente dosificados em doses eqüipotentes. Apresentam atividade mineralocorticóide diversificada. Classificam-se em função da sua duração de efeito. (Quadro 2)

Quadro 2 - Equivalência dos glicocorticóides para administração sistêmica

Fármaco	Potência anti-inflamatória¹	Dose equivalente (mg)	Retenção relativa de sódio²	Meia-vida plasmática (min)	Meia-vida biológica (h)
Hidrocortisona	1	20	1	90	8 a 12
Cortisona	0,8	25	0,8	30	8 a 12
Prednisona	4	5	0,2	60	12 a 36
Prednisolona	5	4	0	180	12 a 36
Metilprednisolona	5	4	0	180	12 a 36
Triancinolona	5	4	0	300	12 a 36
Betametasona	25	0,5	0	100 a 300	24 a 72
Dexametasona	25	0,75	0	100 a 300	24 a 72

Fonte: Adaptado de Louzada e Sarti (2002); ¹ Efeito glicocorticóide; ² Efeito ineralocorticóide; mg = miligramas; min = minutos; h = horas

O Quadro 2 se refere à administração por via sistêmica (intramuscular, endovenosa ou subcutânea). É importante enfatizar a diferença entre meia-vida plasmática e a meia vida biológica. A primeira corresponde aos níveis hormonais no sangue, a segunda refere-se ao tempo de disponibilidade do fármaco nos tecidos, e a presença tecidual do glicocorticóide é que determina a duração de seu efeito terapêutico. Essa duração pode ser rápida ou mais lenta, dependendo do tipo de sal

com o qual o glicocorticóide é formulado. Por exemplo, se o corticosteróide estiver preparado com sais que formam ésteres livremente solúveis (fosfato, mono e dissódico, succinato sódico) ele será rapidamente absorvido. Por outro lado, se o glicocorticóide estiver complexado com outros sais que formam derivados pouco solúveis (acetato, dipropionato, acetonido, diacetato, hexcetonido) a absorção será mais lenta (Louzada, Sarti, 2002; Campagnolo et al., 2008).

Os glicocorticóides são os mais eficazes antiinflamatórios disponíveis, promovendo melhora sintomática de uma série de manifestações clínicas. No entanto, apresentam o risco de potenciais efeitos adversos, que afetam diversos órgãos e estão relacionados às doses empregadas e principalmente à duração do tratamento. Por curtos períodos (até duas semanas), mesmo em altas doses, tem baixa probabilidade de ocasionar efeitos adversos. Em tratamento prolongado, surgem efeitos adversos graves, limitantes da efetividade nas doenças crônicas (Wannmacher, Ferreira, 1998; Campagnolo et al., 2008).

Injeção local de corticosteróides tem sido utilizada como uma maneira de racionalizar seu uso. Essa via de administração permite uma alta concentração local do fármaco com menor risco de efeitos adversos sistêmicos. (Wannmacher, Ferreira, 1998; Louzada, Sarti, 2002; Campagnolo et al., 2008)

3.3 Usos dos corticosteróides em fonocirurgia

Os esteróides têm sido usados clinicamente em fonocirurgia com o objetivo de reduzir a formação de cicatriz. Seu uso pode ser profilático, visando a prevenção da formação de cicatriz ou terapêutico em uma cicatriz já formada.

Bouchayer e Cornut (1998) relatam o uso de hidrocortisona injetável na prega vocal ao final das microcirurgias de lesões benignas como nódulos, cistos, sulcos e pontes, principalmente, se houver sinais inflamatórios presentes. No tratamento de cicatriz iatrogênica os autores injetaram hidrocortisona na prega vocal, fizeram uma incisão na superfície superior da prega vocal e elevaram o *microflap* separando-o do ligamento vocal. Os autores relatam melhora da maleabilidade da prega vocal, do fechamento glótico e da qualidade vocal. Courey et al. (1995) também descrevem o uso de esteróide sob o *microflap* após excisão de lesões benignas no intuito de reduzir a cicatriz decorrente do *microflap*.

Mortensen e Woo (2006) injetaram metilprednisolona, na prega vocal com fibrose iatrogênica pós-fonocirúrgica de 12 pacientes, por laringoscopia indireta, sob anestesia local. Descrevem melhora significativa da voz medida de acordo com a escala GRABS ($p < 0,01$). Na estroboscopia houve melhora da amplitude de vibração ($p < 0,05$) e da onda mucosa ($p < 0,05$). Esse estudo também avaliou 18 pacientes com nódulos ou pólipos nas pregas vocais e 4 pacientes com sarcoidose ou granuloma. Dos 34 pacientes estudados, 28 (82%) apresentaram melhora. Os autores descrevem que a injeção de corticosteróide nas lesões apresenta três indicações principais: 1) redução do tecido de granulação e promoção da cicatrização primária; 2) redução da formação de cicatriz hipertrófica; e, 3) redução da inflamação para evitar cirurgia.

Um estudo, que analisa histológica e funcionalmente o efeito do corticosteróide injetado nas pregas vocais de cães, foi realizado por Coleman et al. (1999). Nesse estudo, foi realizado um *microflap* lateral nas pregas vocais de 15 cães e através dele foi injetada triancinolona em uma das pregas vocais, a outra serviu como controle. A cada intervalo de 2, 4 e 6 semanas, cinco dos 15 cães foram

sacrificados e foram realizados cortes histológicos das pregas vocais para análise do infiltrado inflamatório e neovascularização. Análises pareadas demonstraram aumento do infiltrado inflamatório em volta do *microflap* na prega vocal tratada com esteróide em 2, 4 e 6 semanas ($p < 0,02$). A resposta neovascular na prega vocal tratada com esteróide foi menor em 2 semanas ($p < 0,005$), mas maior em 4 e 6 semanas ($p < 0,005$). Para a avaliação funcional qualitativa e quantitativa foi realizada videostroboscopia pré-operatória e na data do sacrifício. Não foram identificadas diferenças significativas na aparência, amplitude, onda mucosa ou maleabilidade entre as duas pregas vocais. Nesse estudo, embora o corticosteróide tenha causado um atraso no processo cicatricial, os parâmetros avaliados na videostroboscopia não demonstraram diferenças entre a prega vocal tratada com corticosteróide e a prega vocal controle em 2, 4 e 6 semanas.

Em um estudo recente, Alencar et al. (2007) avaliaram a presença de sinéquia e a quantificação da deposição de fibras colágenas em pregas vocais de porcos, 30 dias após a exérese de um fragmento de mucosa. Doze porcos foram divididos em dois grupos: controle e experimento. No grupo controle (6 porcos), em uma das pregas vocais nada foi feito, a outra foi submetida ao procedimento cirúrgico com retirada de um fragmento da mucosa e sem injeção de corticóide. No grupo do experimento (6 porcos), uma prega vocal foi submetida ao mesmo procedimento cirúrgico, porém com injeção pré-procedimento de dexametasona na prega vocal operada. Na outra prega vocal, a lesão não foi realizada, sendo efetuada apenas a injeção do corticóide. Após 30 dias, na comparação dos dois grupos, não foram observadas sinéquias em ambos os grupos e não foi constatada diminuição significativa da deposição de colágeno nas pregas vocais injetadas com

corticóides ($p=0,1320$).

3.4 Processo cicatricial em fonocirurgia

Em geral, uma cicatriz está relacionada a tecido fibroso. Estudos têm demonstrado que um aumento do colágeno, especialmente do colágeno tipo I, é a base da fibrose e que a resistência da cicatriz depende do conteúdo do colágeno (Ehrlich, 2000). No caso de fibrose da prega vocal, também tem sido encontrado depósito de colágeno denso na lâmina própria lesada da prega vocal de animais (Hirano, 1975; Blakeslee et al., 1995; Rogerson et al., 1996). Entretanto, pesquisas recentes têm sugerido que outros componentes da matriz extracelular como o ácido hialurônico, fibronectina e decorina também podem afetar o tecido fibroso (Hirano et al., 2003b) O colágeno, apesar de ser a principal molécula, não é a única que determina as propriedades viscoelásticas do tecido (Hirano, 2005).

A organização e a composição desses componentes são importantes para assegurar a integridade das propriedades biomecânicas necessárias para uma boa vibração das pregas vocais (Gray et al., 1999; Gray et al., 2000). A cicatriz resultante da substituição do tecido normal por tecido fibroso pode alterar permanentemente a função da prega vocal e levar a uma diminuição ou perda da onda mucosa da prega vocal (Benninger et al., 2003). Em busca de conhecimentos que contribuam para o desenvolvimento de um método de tratamento que minimize a formação de fibrose na prega vocal após uma lesão, muitas pesquisas estão sendo direcionadas para o entendimento e manipulação do processo cicatricial na prega vocal (Thibeault et al.,

2002; Rousseau et al., 2003; Rousseau et al., 2004a; Branski et al., 2005; Tateya et al., 2005; Tateya et al., 2006; Lim et al., 2006).

No tecido normal da prega vocal, o colágeno é organizado em feixes, formando uma rede, que corre paralela à mucosa epitelial citada acima (Mello et al., 2003).

Segundo Thibeault et al. (2002), o aumento da rigidez e da viscosidade do tecido cicatricial da prega vocal aparentemente não resulta de um aumento do colágeno e sim da presença de um colágeno novo e com estrutura desorganizada. Os autores avaliaram histologicamente o colágeno, procolágeno (precursor do colágeno), elastina e ácido hialurônico da lâmina própria de pregas vocais normais e com tecido cicatricial de coelhos, dois meses após o procedimento cirúrgico. A lâmina própria com cicatriz apresentou redução significativa de colágeno e elastina, mas um aumento no pró-colágeno. Outro estudo, também sobre a fase madura do remodelamento em pregas vocais de coelhos, porém seis meses após uma lesão da lâmina própria, demonstrou que o colágeno apresentava uma densidade significativamente maior que nas pregas vocais normais (Rousseau et al., 2004).

Em um modelo canino de cicatrização das pregas vocais, os níveis de procolágeno, colágeno e elastina foram similares aos do modelo com coelhos. Os níveis de colágeno não foram significativamente diferentes em dois meses, porém, em seis meses eles estavam acima do encontrado em pregas vocais normais e ainda mostraram marcada desorganização e feixes densos. Também aqui o tecido cicatricial é caracterizado por elevados níveis de procolágeno nos primeiros dois meses de cicatrização, e é substituído por feixes de colágeno denso e desorganizado (Rousseau et al., 2003).

No estudo controlado feito por Tateya et al. (2005) com ratos após lesão nas pregas vocais e avaliações pós-operatórias de 2, 4, 8 e 12 semanas, foi demonstrado que o padrão de remodelamento do colágeno na prega vocal é o oposto da cicatrização cutânea, isto é: o colágeno tipo III não diminui, mas ocorre diminuição do colágeno tipo I. Além disso, o processo de remodelamento da prega vocal é lento nos primeiros dois meses.

Os mesmos autores, Tateya et al. (2006), em um estudo subsequente, também em ratos, estudaram o padrão de expressão dos componentes da matriz extracelular na lâmina própria da prega vocal. Assim como no estudo anterior, as lesões cirúrgicas foram realizadas em uma prega vocal de cada rato e a outra foi o controle. No intervalo de 1, 3, 5, 7 e 14 dias foram realizadas análises histológicas dos componentes ácido hialurônico, colágeno e fibronectina. Os dados sugeriram que apenas a expressão do colágeno difere da cutânea, ou seja, no processo de cicatrização das pregas vocais, a fase inflamatória e a proliferativa são análogas ao da cicatrização cutânea, diferindo na fase de remodelamento.

Visando uma futura manipulação do processo cicatricial, Lim et al. (2006) descreveram a fase aguda da inflamação (4, 8, 16, 24 e 72 horas) e a produção da matriz extracelular em pregas vocais lesadas de ratos. Os resultados mostraram um claro perfil da inflamação da prega vocal com mudanças correspondentes na produção da matriz extracelular. Outro estudo, também com o objetivo de facilitar pesquisas futuras no desenvolvimento de uma intervenção terapêutica na fase aguda da inflamação, a fim de limitar a formação de fibrose na prega vocal, descreveu qualitativamente a formação de tecido conectivo novo em coelhos nos primeiros 21 dias seguidos de uma incisão cirúrgica na prega vocal. Esses dois estudos sugerem a

fase de proliferação da cicatrização, que ocorre em torno de três dias após uma lesão, como um período crítico para uma intervenção (Branski et al., 2005).

Garret et al. (2001) avaliaram o efeito da mitomicina-C tópica na cicatrização de pregas de cães. Seis cães foram submetidos à microlaringoscopia de suspensão para excisão de *microflap* em ambas as pregas vocais. Mitomicina-C tópica, um agente quimioterápico e inibidor fibroblástico, foi aplicado randomicamente em um lado, e o lado contralateral era o controle. Em cada animal foi realizada a videoestroboscopia antes da cirurgia, em duas semanas e antes do sacrifício em quatro semanas. A videoestroboscopia mostrou diminuição da vibração da onda mucosa nas pregas vocais tratadas com mitomicina-C, assim como uma aparência mais atrófica da superfície vibratória. Na análise histológica, as pregas vocais com mitomicina-C mostraram menos fibroblastos e menos colágeno do que o controle ($p < 0.05$). O infiltrado inflamatório não foi significativamente diferente entre os dois lados. Por causa da supressão da proliferação de fibroblastos pela mitomicina-C, as pregas vocais tratadas mostraram menos tecido conectivo. O uso de mitomicina-C diminuiu a resposta cicatricial e nesse estudo apresentou efeitos negativos no padrão vibratório das pregas vocais. No estudo de Socher (2009), a aplicação tópica de mitomicina-C antes da enxertia de gordura nas pregas vocais reduziu significativamente a deposição de colágeno em relação ao controle ($p = 0,05$). Vinte e oito coelhos foram submetidos à enxertia de gordura em ambas as pregas vocais. As pregas vocais direitas receberam previamente a aplicação tópica de mitomicina-C, enquanto as pregas vocais esquerdas formavam o grupo controle. Quatro grupos com seis coelhos cada foram sacrificados aos 7, 14, 30 e 90 dias após a cirurgia de enxertia. As pregas vocais submetidas à análise histológica para quantificar a

deposição de colágeno mediante a coloração com Picrossírius Red sob microscopia polarizada. A deposição de colágeno foi menor em todos os grupos de pregas vocais que receberam aplicação tópica de mitomicina-C quando comparada com as pregas vocais do grupo controle.

Hirano et al. (2003a) utilizaram fator do crescimento hepatócito (HGF) em pregas vocais de cães. Cinco cães foram submetidos à laringoscopia para remoção do epitélio e da lâmina própria das pregas vocais. O uso de fator do crescimento hepatócito (HGF) reduziu a produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos e aumentou o ácido hialurônico. Esses efeitos demonstraram que o HGF tem um potencial terapêutico na prevenção e tratamento da fibrose das pregas vocais. Em outro estudo do mesmo grupo, foi utilizado HGF em 20 coelhos. Os coelhos foram submetidos à laringoscopia para decorticação das pregas vocais e após injeção de HGF em uma delas e solução salina na outra que serviu de controle. Após seis meses do procedimento foram realizados exames histológico, reológico e fisiológico das pregas vocais. O exame histológico revelou deposição excessiva de colágeno e elastina desorganizada no grupo controle ao passo que a deposição de colágeno foi menor nas pregas vocais tratadas com HGF. Os dados reológicos indicaram que as pregas vocais tratadas com HGF estavam menos rígidas que o grupo controle. A vibração mucosa também foi melhor nas pregas vocais tratadas com HGF do que o controle quanto ao limiar de pressão de fonação, eficiência vocal, amplitude da onda mucosa e fechamento glótico (Hirano et al., 2004).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aspecto Ético

O projeto de pesquisa foi aprovado sob o protocolo de número 329/06, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. (Apêndice)

4.2 Material

Foram utilizados 14 coelhos albinos da raça New Zeland, de ambos os sexos, com massa corporal entre 2,5kg e 3,5 kg. Os coelhos foram operados no LIM-32 (Laboratório de Investigação Médica em Otorrinolaringologia da FMUSP) e mantidos, alimentados, vacinados e cuidados em ambiente adequado no centro de bioterismo da Granja RG, localizada na cidade de Suzano – São Paulo, sob supervisão de zootecnistas e veterinários. O sacrifício dos animais e a coleta da laringe para preparo das lâminas também foram realizados no LIM-32.

Este estudo foi realizado de acordo com o “Guia e cuidados e usos de animais de laboratório”, obedecendo às normas da Lei Federal nº 6.638 de 8 de maio de 1979, e aos princípios éticos na experimentação, postulados pelo Código Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA).

Foi desenvolvido um laringoscópio para adaptar à anatomia do coelho a técnica de laringoscopia direta (Confecionado por Ferrari Medical - São Paulo, SP).

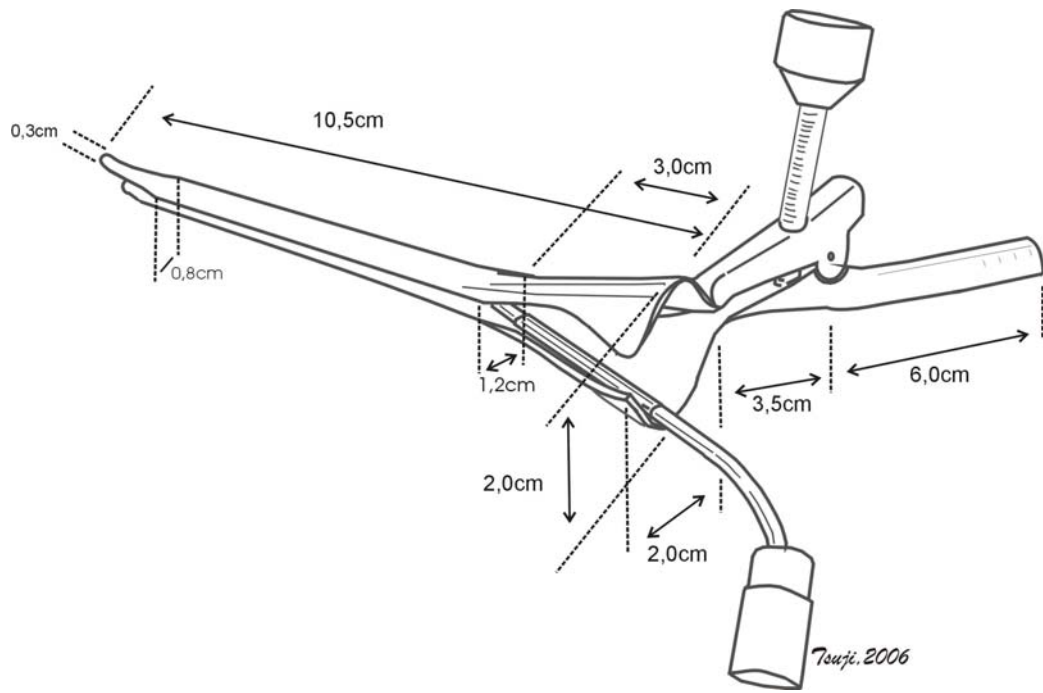
O laringoscópio (Figuras 1A e B) foi desenvolvido a partir de um modelo baseado em um espéculo nasal de Killian que foi adaptado nos aspectos seguintes:

- As lâminas foram afinadas próximo à base, à esquerda, para se encaixar ao lado dos dentes incisivos centrais do coelho e alongadas até chegarem a 10,5cm, de modo a expor a glote.

- Na base lateral do espéculo foi colocada uma articulação que se fixa na abertura desejada, mantendo-se assim o espéculo aberto. Essa articulação se conecta a uma outra que possibilita que o espéculo permaneça parado na posição desejada para que o pesquisador fique com as mãos livres para segurar com uma das mãos o telescópio e com a outra o instrumento cirúrgico (Figura 2). O telescópio que utilizamos foi o de 30 graus e 4mm.

- Na base inferior do espéculo foi adaptado um canal para introdução de um guia de luz de fibra óptica, que conectado a uma fonte de luz, permite a visualização e colocação do laringoscópio na posição de melhor exposição da glote. Esse guia de luz é removível.

- A articulação que fixa o espéculo é fixa a uma placa de metal sobre a qual o coelho é posicionado em decúbito dorsal e em hiper-extensão do pescoço (Figura 2).



(A)



(B)

Figura 1 – Laringoscópio: (A) esquema; (B) foto



Figura 2 - Fonocirurgia com uso do telescópio.

O telescópio é conectado a uma microcâmara e as imagens visualizadas em um monitor de vídeo (Figuras 3).

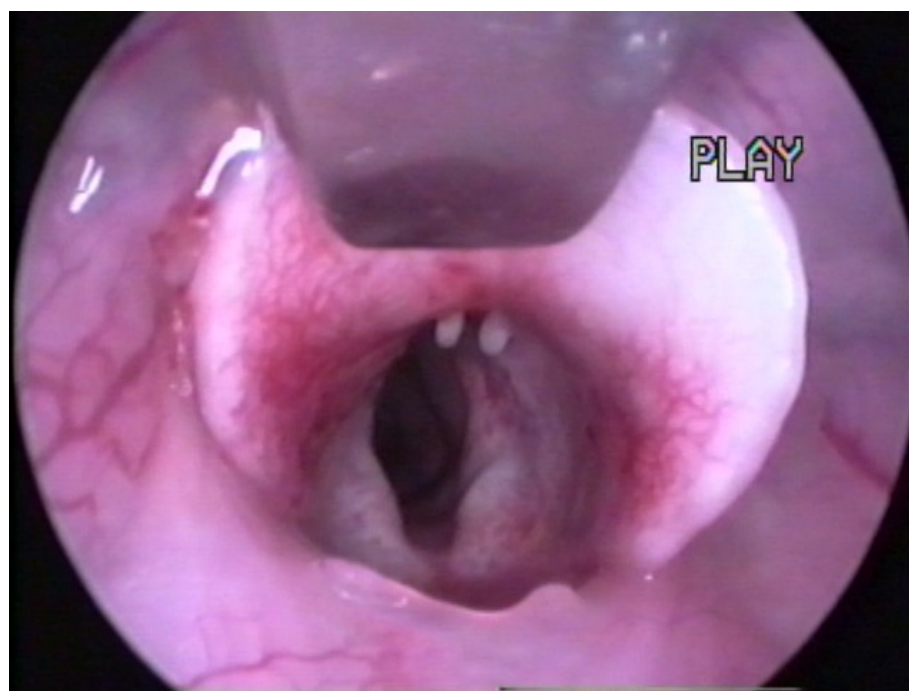


Figura 3 - Imagem visualizada no monitor de vídeo das pregas vocais do coelho.

Além do laringoscópio, também foram desenvolvidos um bisturi para realização das lesões nas pregas vocais e uma agulha para infiltração de dexametasona. O instrumento utilizado para produzir a lesão cirúrgica, também fabricado pela mesma companhia, correspondeu a um bisturi em forma de ponta de lança (com 2mm de largura, 2mm de profundidade na sua extremidade central e 1mm de profundidade nas suas bordas) com um reparo transversal que delimitava sua penetração na prega vocal a 2mm de profundidade no centro da lesão (Figura 4). A agulha para infiltração de dexametasona, também fabricada para este estudo e foi confeccionada com um reparo que permitiu a padronização da injeção a uma profundidade de 2mm. O calibre da agulha foi o mais delgado possível e correspondeu ao diâmetro da agulha utilizada na injeção de insulina, com as dimensões de 0,4mmx12mm, que era acoplada em uma seringa com insulina para permitir a padronização da quantidade injetada (Figura 5).

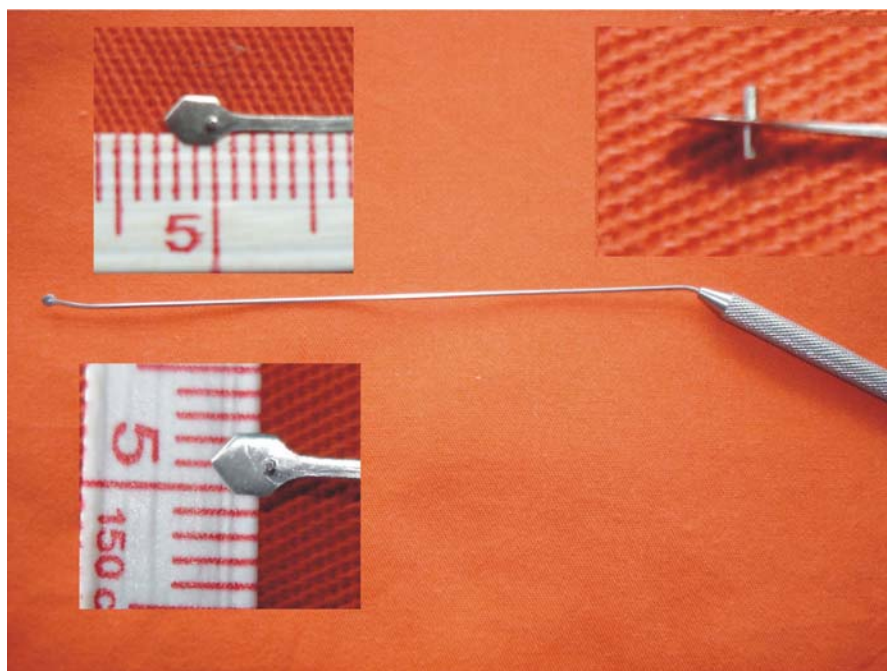


Figura 4 - Bisturi utilizado para realização da lesão. Detalhe: reparo transversal que prevenia a sua entrada na prega vocal além de 2mm de profundidade.

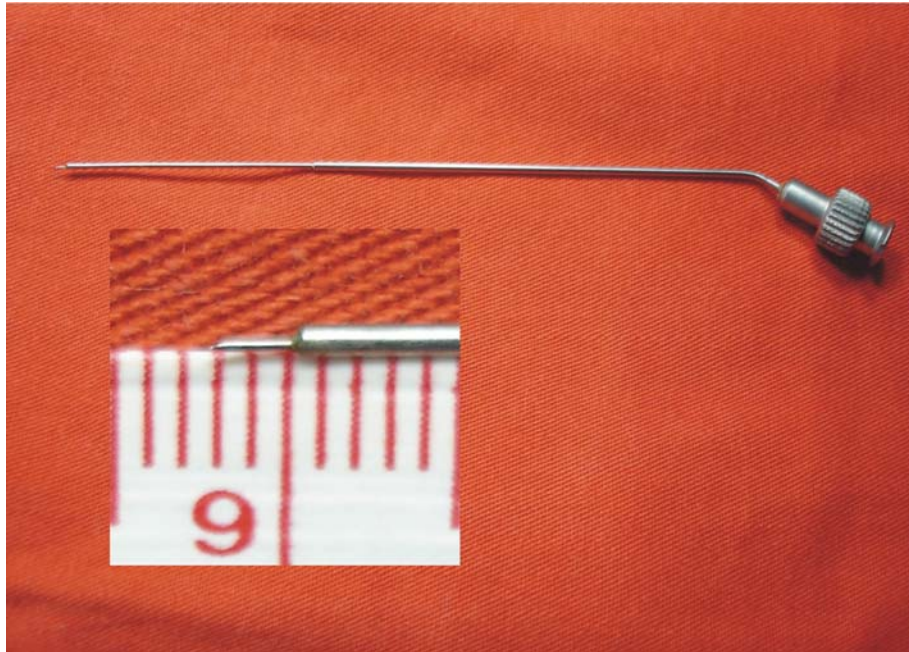


Figura 5 - Agulha para infiltração. Detalhe: reparo que permitiu a padronização da injeção a uma profundidade de 2mm.

4.3 Métodos

4.3.1 Técnica cirúrgica

Os 14 coelhos foram anestesiados com xylazina (5mg/kg) associado à quetamina (50mg/kg) por via intramuscular e mantidos sob ventilação espontânea. Em todos os coelhos obtivemos uma exposição da glote adequada.

Em seguida, foram submetidos à cirurgia em ambas as pregas vocais, sob visualização endoscópica com endoscópio de 30 graus (Karl Storz[®], 4mm, Alemanha). Foi realizada uma punção com o bisturi, na superfície superior das pregas vocais, no ponto médio da sua porção membranosa (tanto no sentido antero-posterior, quanto no sentido lateromedial) resultando em uma lesão longitudinal,

paralela a borda livre e no centro das pregas vocais, com dimensões padronizadas semelhante às da ponta do bisturi.

Na prega vocal esquerda de cada coelho após a lesão foi injetado de 0,1mL (0,4mg) de dexametasona lateralmente à lesão. Na prega vocal direita foi realizada apenas a lesão. Essa quantidade de dexametasona foi definida em estudo piloto no qual se mediu a quantidade de dexametasona necessária para abaular a prega vocal de um coelho.

Dois coelhos morreram após a cirurgia, provavelmente por problemas anestésicos no primeiro dia pós-operatório.

Os animais foram anestesiados e sacrificados sem sofrimento 3 dias (6 coelhos) e 7 dias (6 coelhos) decorridos após a cirurgia.

Os coelhos não sofreram ferimentos desnecessários e todos toleraram bem os procedimentos.

4.3.2 Preparo da laringe

Uma vez sacrificados, a laringe dos coelhos foi retirada em bloco, da base da língua ao quarto anel traqueal. Realizou-se incisão longitudinal anterior na laringe, com separação das alas direita e esquerda da cartilagem tireóide. Cada hemilaringe foi codificada para avaliação cega posterior e colocada em formaldeído a 10%. Após 10 dias, cada metade foi cortada no plano coronal em três partes: anterior, média e posterior, com intuito de selecionar apenas a área da lesão. Apenas a parte média de cada prega vocal que continha a lesão foi enviada ao Laboratório de Anatomia Patológica da FMUSP onde foram processadas.

Os animais sacrificados foram reencaminhados ao Centro de Bioterismo para o descarte dos mesmos

4.4 Estudo histológico da prega vocal

4.4.1 Análise microscópica

No Laboratório de Anatomia Patológica da FMUSP as peças passaram pela desidratação gradativa em álcool (foram cinco alcoóis, uma hora em cada um, dois alcoóis a 95% e três absolutos), diafanização em xilol, com três trocas de uma hora cada, impregnação e inclusão em parafinas (três parafinas, uma hora em cada) fundida em estufa a 60°C. A seguir foram cortadas em micrótomo com espessura de 4µm, no plano coronal, desparafinados e corados.

Para manter a padronização, as peças foram preparadas por um único técnico experiente, que realizou todo o processo de coloração.

A hematoxilina-eosina foi utilizada para identificação dos núcleos celulares do infiltrado inflamatório em volta da lesão. O corante picrossírius foi utilizado para visualização e análise das fibras colágenas. A análise das lâminas foi realizada sob microscopia de luz, sob polarização óptica (Montes, Junqueira, 1988; Mello et al., 2003).

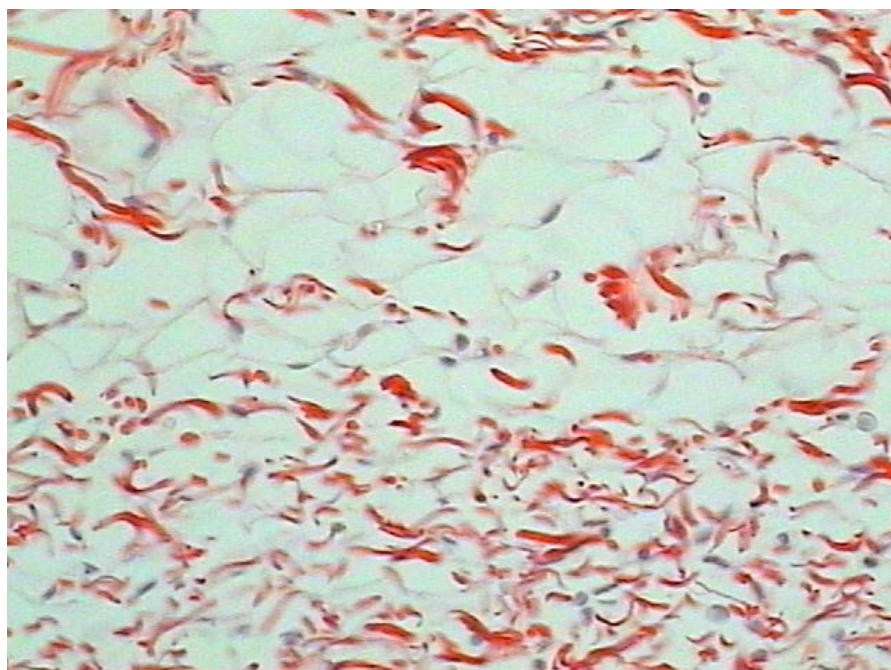
4.4.2 Método da Picrossírius-Polarização

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora em solução de Sirius Red a 1% dissolvido em ácido pícrico aquoso

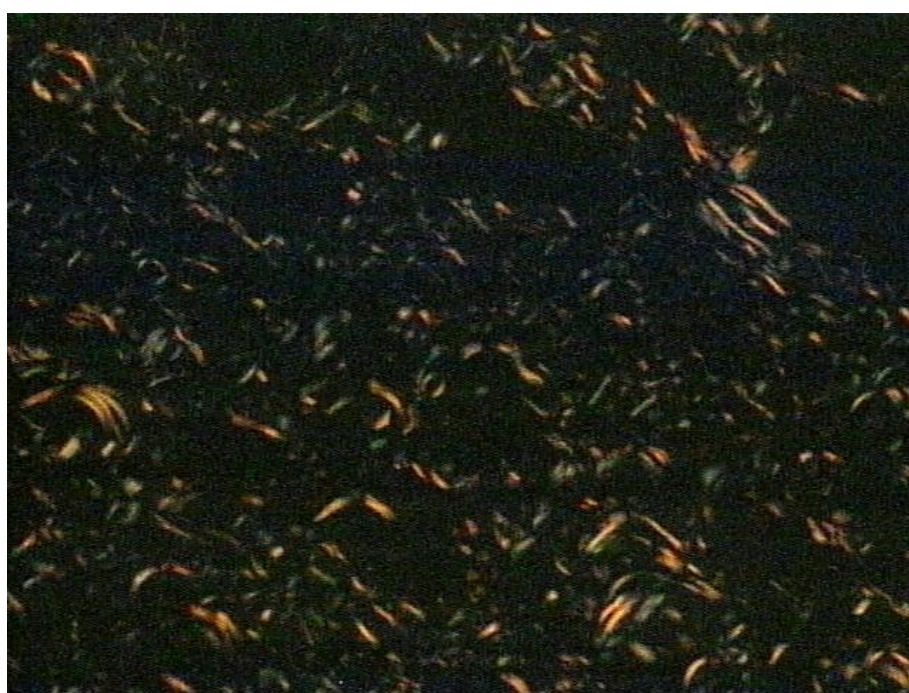
saturado. Os cortes foram rapidamente lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por cinco minutos. Em seguida, foram lavados e montados.

O Sirius Red é um corante bem ácido que tem sido muito utilizado para corar o colágeno em cortes de tecidos (Montes et al., 1984). As moléculas de colágeno, ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente com corantes ácidos. O Sirius Red é uma molécula alongada que reage com o colágeno e promove o aumento de sua birrefringência natural, pois as moléculas do corante se alinham paralelamente ao eixo longo de cada molécula de colágeno. Quando analisados sob luz polarizada, além de se mostrarem fortemente birrefringentes, as fibras que contém colágeno assumem cores e intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno (Montes, Junqueira, 1988).

Ao microscópio de polarização, o colágeno tipo I mostra-se como fibras grossas, muito birrefringentes, de cor amarela ou vermelha; o colágeno tipo III aparece sob a forma de fibras finas, fracamente birrefringentes, de coloração esverdeada. O colágeno tipo II não forma fibras e mostra uma fraca birrefringência de cor variável (Junqueira et al., 1978; Montes et al., 1980; Zambrano et al., 1982) (Figura 6A e B).



(A)



(B)

Figura 6 – Prega vocal após coloração com picrossírius após 7 dias - com corticóide (A) luz não-polarizada (100X); (B) luz polarizada (100X)

4.5 Análise morfométrica

4.5.1 Células inflamatórias e fibroblastos

A análise histológica foi quantificada com o microscópio Zeiss (modelo Axiostar plus 1169-151, Alemanha). Uma magnificação de 400X foi usada no estudo na região da lesão. Imagens individuais demonstraram que a lesão foi capturada em todos os coelhos. Na análise histológica a lesão foi definida pela área de epitélio desnudo em 3 dias ou um epitélio fino em 7 dias com presença de reação inflamatória e processo cicatricial. Um único patologista de maneira cega realizou a contagem das células da reação inflamatória e dos colágenos. Três a cinco campos de cada peça histológica que continha a lesão foram analisados por coelho. Para a contagem das células inflamatórias foi usada uma ocular com retículo que apresentava 50 linhas horizontais que ligavam cem pontos. Foram contabilizadas as células associadas à inflamação e ao remodelamento da mucosa (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos). O valor foi expresso em densidade numérica, que representa a porcentagem de frequência relativa destas células (número de células em $62.500\mu\text{m}^2$), em cada campo, com aumento de 400X de aumento da lesão (Das et al., 2007; Mallik et al., 2007) (Figura 7).

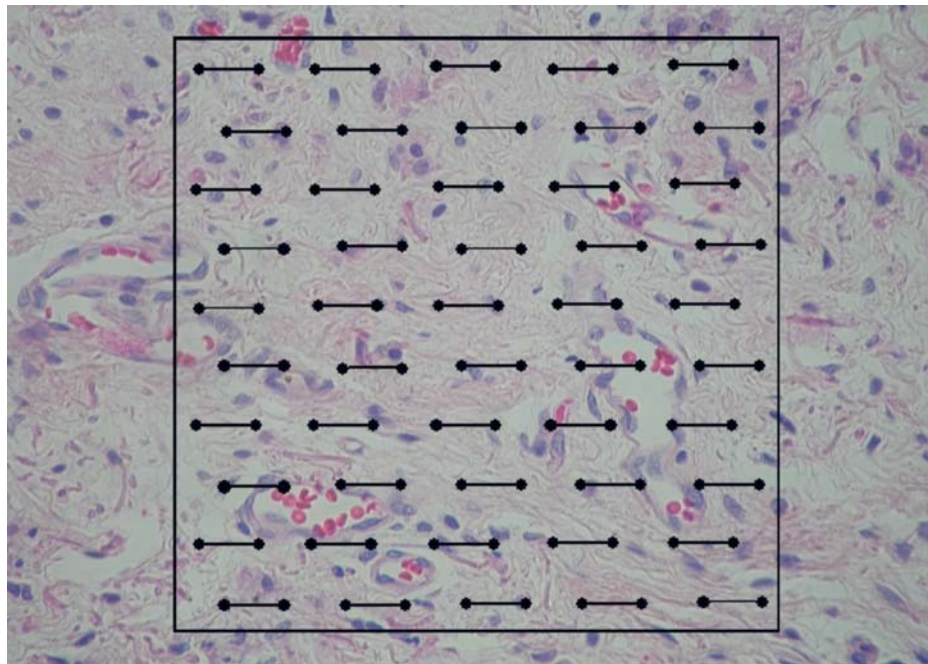


Figura 7 - Imagem do retículo utilizado para quantificação das células inflamatórias.

4.5.2 Fibras colágenas

A quantificação das fibras colágenas foi feita por meio de um sistema digital de imagens com auxílio do software *Image Pro Plus* versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA), instalado em um microcomputador ligado a uma câmera digital (JVC, TK- C1380 Color Vídeo Camara, Victor Company of Japan Limited, Japão) acoplado a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha) que pode ser usado com sistema de polarização. Neste sistema de captura de imagens, a câmera estava configurada para capturar as imagens de maior birrefringência e calculá-las em micrômetros quadrados. A concentração de fibras colágenas foi determinada pela quantidade de fibras colágenas de maior birrefringência por unidade de área medida (área de fibras colágenas dividida pela área total x100).

As medidas morfométricas da inflamação e do colágeno foram transferidas para o programa SPSS 14.0 (*Statistical Package for Social Sciences*, Chicago, IL) para análise estatística.

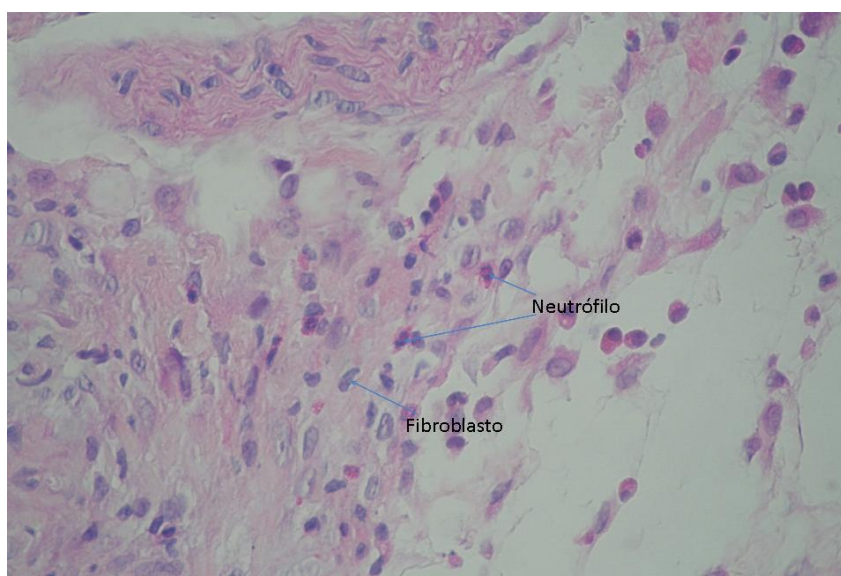
4.6 Análise estatística

Para avaliação estatística da reação inflamatória e do colágeno utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre ambos os tempos considerados. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi aplicado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos, intervenção e controle. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

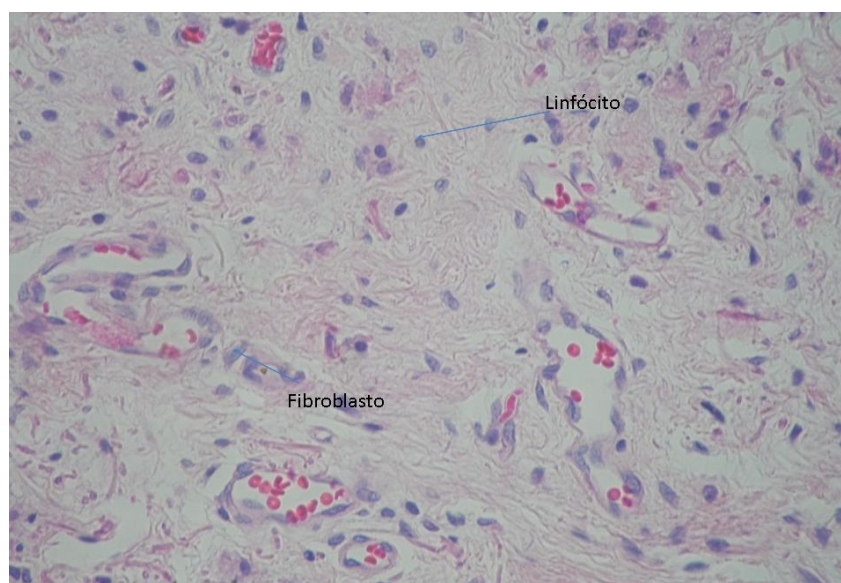
5 RESULTADOS

5.1 Reação inflamatória

As figuras 8 (A e B) e 9 (A e B) mostram a reação inflamatória na lesão das pregas vocais no terceiro e sétimo dia do controle e da intervenção (corticosteróide), lâminas coradas com hematoxilina-eosina.

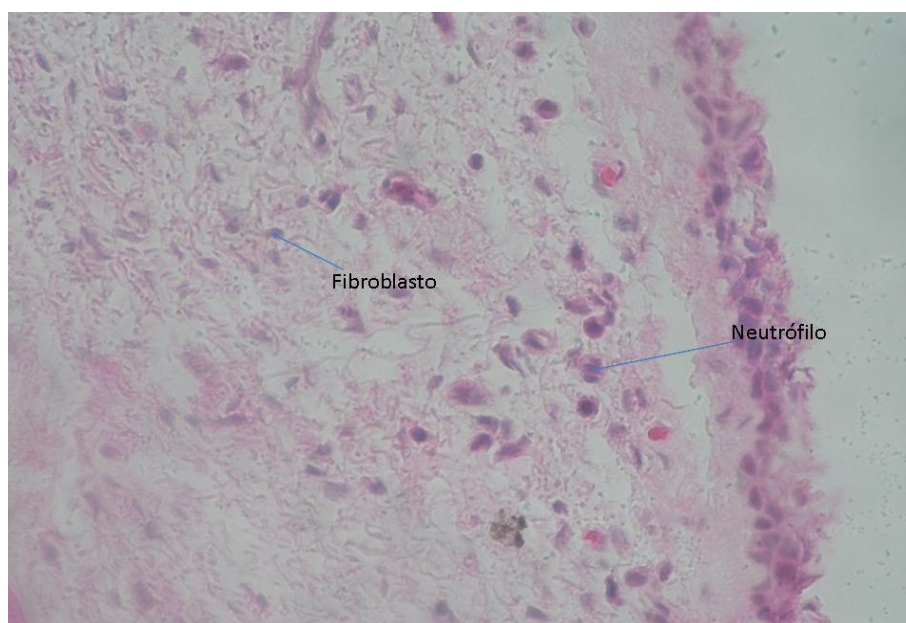


(A)



(B)

Figura 8 – Reação inflamatória na lesão da prega vocal após o 3^o dia (A) controle, HE (400X); (B) intervenção com corticosteróide, HE (400X) (HE = hematoxilina-eosina)



(A)



(B)

Figura 9 – Reação inflamatória na lesão da prega vocal após o 7^o dia: (A) controle, HE (400X); (B) intervenção com corticosteróide, HE (400X). (HE = hematoxilina-eosina)

Com relação à reação inflamatória os resultados foram apresentados em forma de média de reação inflamatória (MRI):

1) MRI1: A média geral da densidade numérica de todas as células em relação à intervenção foi $3,16 \pm 1,12$ células/ μm^2 no grupo com corticóide e $2,48 \pm 0,98$ células/ μm^2 no grupo controle, e não foi observada diferença significativa ($p=0,099$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média da densidade numérica de todas as células (MRI1) em relação à intervenção (corticóide x controle)

Par de variáveis	n	Média da densidade numérica de todas células inflamatórias (células/ μm^2)	Desvio-padrão (células/ μm^2)	Mínimo	Máximo	Mediana	Significância (p)
				(células/ μm^2)			
corticóide	12	3,16	1,12	1,52	4,83	3,10	0,099
controle	12	2,48	0,98	1,18	4,63	2,17	

n = quantidade de coelhos

2) MRI2: A média da densidade numérica de cada célula (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos) em relação à intervenção pode ser vista no Gráfico 1 (Anexo 1). Não houve diferença significativa para nenhum parâmetro entre os grupos corticóide e controle.

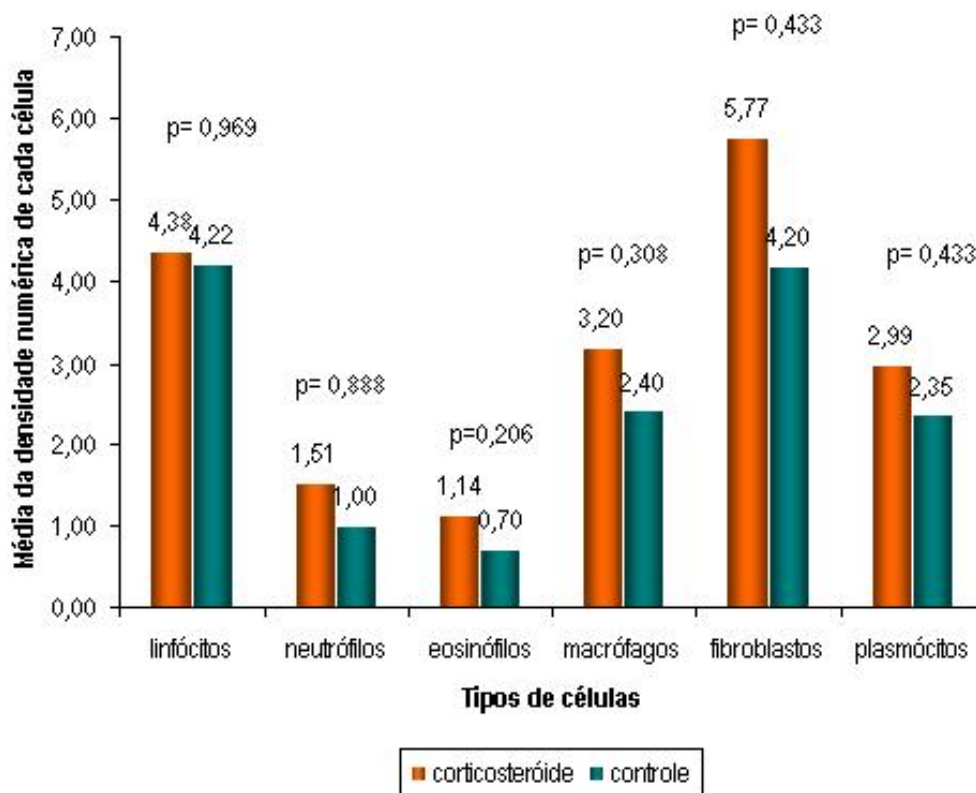


Gráfico 1 - Média da densidade numérica de cada célula (MRI2) (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos) em relação à intervenção (corticóide x controle). (p = significância)

3) MRI3: Média geral da densidade numérica de todas as células em função do tempo (3 e 7 dias) e da intervenção também foi semelhante entre os grupos corticóide e controle (Gráfico 2) (Anexos 2 e 3).

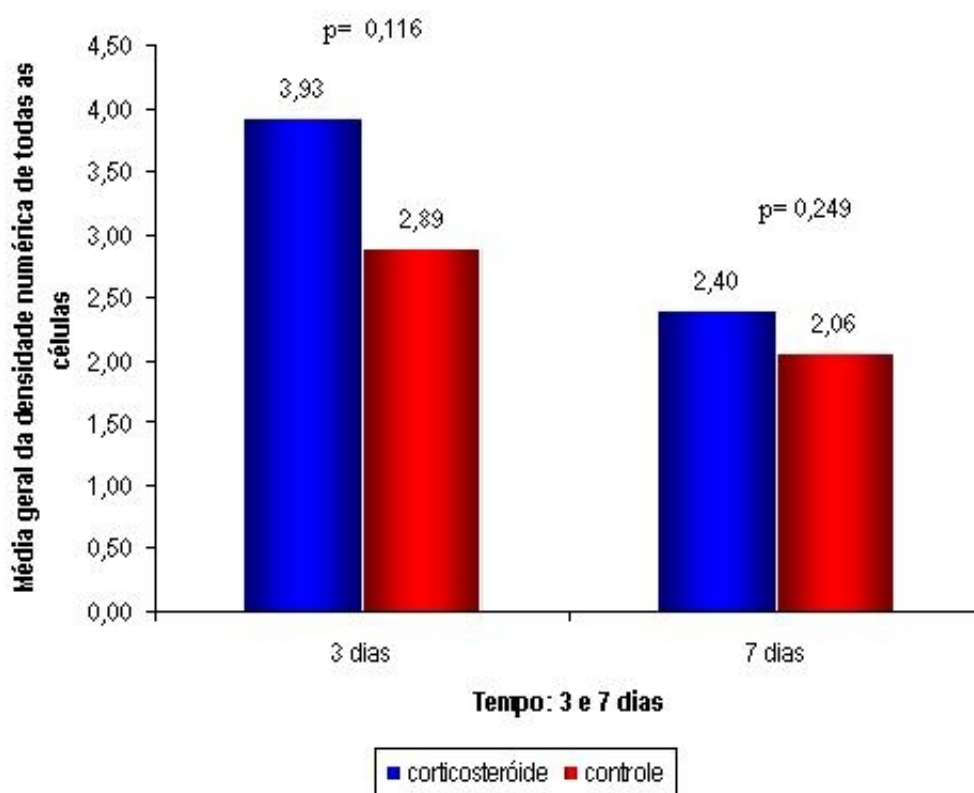


Gráfico 2 - Média geral da densidade numérica de todas as células (MRI3) em função do tempo (3 e 7 dias) e da intervenção (corticóide x controle). (p = significância)

5.2 Fibras colágenas

A média do total de área analisada no estudo, para cada prega vocal, foi de $48.478\mu\text{m}^2$ para o grupo das pregas com corticóide e de $47.609\mu\text{m}^2$ para o grupo controle, não havendo diferença significativa entre as mesmas ($p=0,386$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média da área total analisada *versus* intervenção.

Par de variáveis	n	Média da área total analisada (μm^2)	Desvio-padrão (μm^2)	Mínimo (μm^2)	Máximo (μm^2)	Significância (p)
Colágeno corticóide	12	48.478	11.210	17.151	53.780	0,386
Colágeno controle	12	47.609	6.048	34.302	53.780	

n = quantidade de coelhos

A concentração das fibras colágenas de cada prega vocal foi calculada em micrometros quadrados (área de colágeno medida dividida pela área total x100) (Gráfico 3) (Anexo 4).

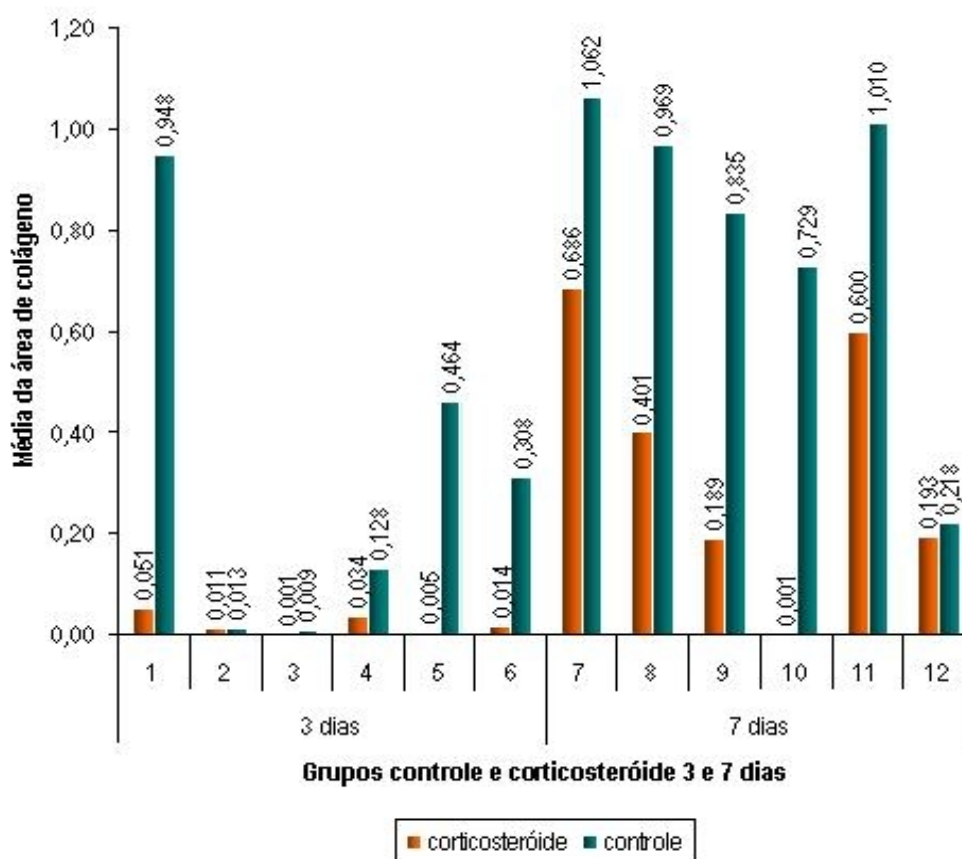


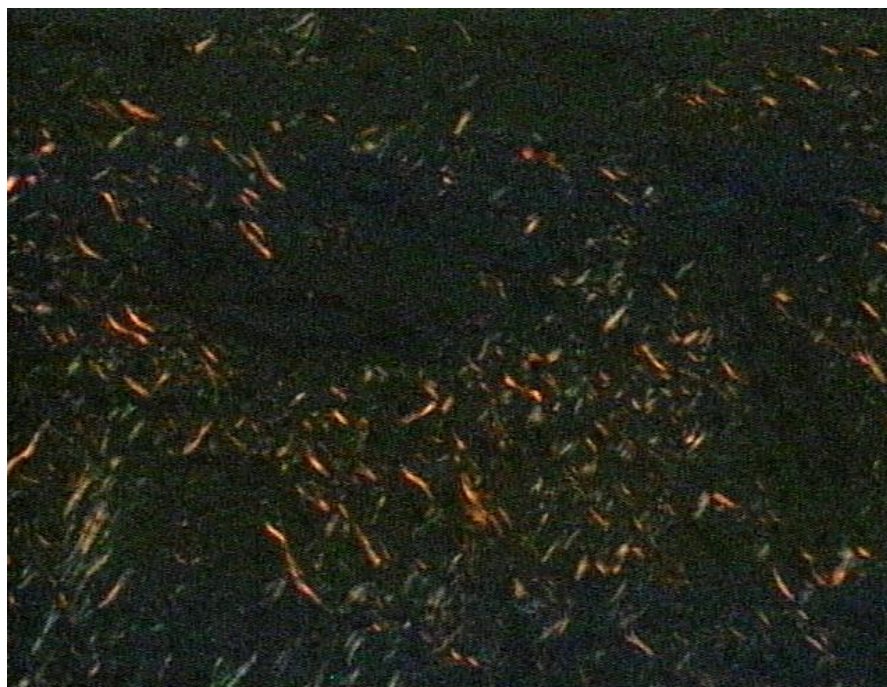
Gráfico 3 - Média da área do colágeno, em valores percentuais, medido do controle e da intervenção em 3 e 7 dias.

A concentração das fibras colágenas aumentou significativamente em 7 dias, tanto nas pregas vocais que receberam corticóides quanto nas pregas vocais que não receberam medicamento. ($p=0,037$) (Tabela 3 e Figuras 10A e B).

Tabela 3 - Média da medida do colágeno em função do tempo.

Par de variáveis	dia	n	Média da medida de colágeno (%)	Desvio-padrão (%)	Significância (p)
Colágeno corticóide	3	6	0,02	0,02	0,037
	7	6	0,35	0,26	
Colágeno controle	3	6	0,31	0,36	0,037
	7	6	0,80	0,31	

n = quantidade de coelhos



(A)



(B)

Figura 10 - Fibras colágenas (picrossírius) da prega vocal com corticosteróide (A) 3 dias; (B) 7 dias

Quanto à deposição de colágeno, a média da área em porcentagem do colágeno total das pregas vocais (para 12 coelhos aos 3 e 7 dias da cirurgia) com injeção de corticóide foi de 0,18 (Área de colágeno medida: $86,231\mu\text{m}^2$ dividida pela área total considerada: $48.478\mu\text{m}^2 \times 100$), enquanto no grupo controle foi de 0,57 (Área de colágeno medida: $273,668\mu\text{m}^2$ dividida pela área total considerada: $47.609\mu\text{m}^2 \times 100$).

Essa comparação foi estatisticamente significativa com o valor de p igual a 0,002, demonstrando que a intervenção medicamentosa (corticóide) promoveu a redução da quantidade de colágeno durante a cicatrização (Tabela 4).

Tabela 4 – Média da área do colágeno total em relação à intervenção (3 e 7 dias).

Par de Variáveis	n	Média da área medida de colágeno (%)	Desvio-padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Significância (p)
Colágeno corticóide	12	0,18	0,25	0,001	0,69	0,002
Colágeno controle	12	0,57	0,41	0,01	1,06	

n = quantidade de coelhos

A deposição de colágeno no grupo com corticóide foi estatisticamente menor em 3 dias e permaneceu menor em 7 dias após a lesão cirúrgica (Gráfico 4) (Anexos 5 e 6).

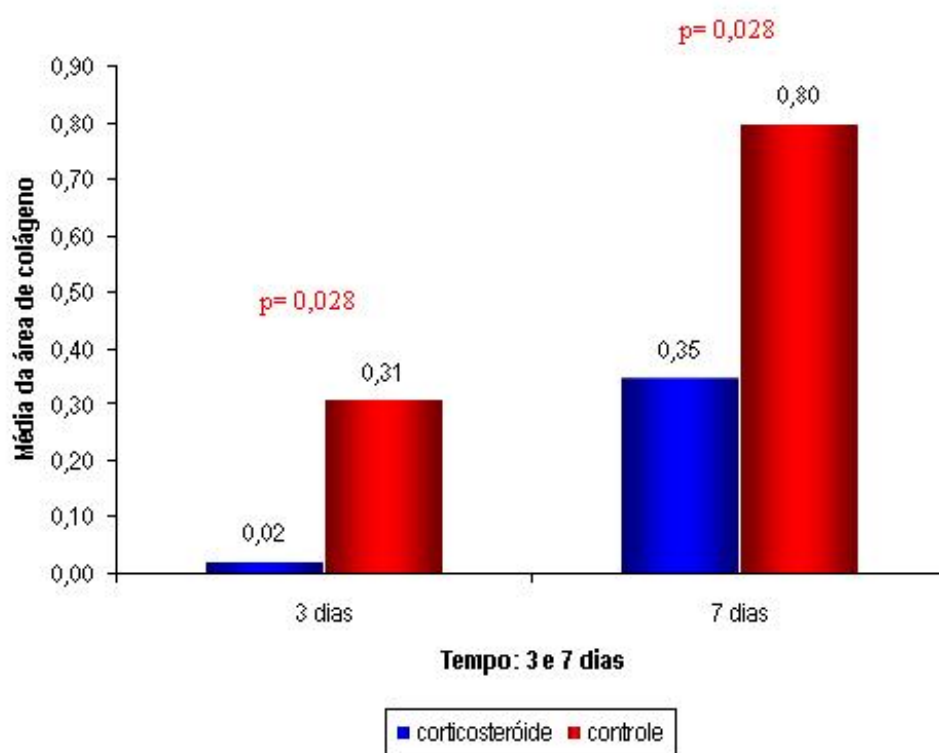


Gráfico 4 - Média da área do colágeno aos 3 e 7 dias em relação à intervenção. (p = significância)

6 DISCUSSÃO

Por causa das dificuldades de estudar as características fisiopatológicas das pregas vocais em humanos, as pesquisas necessitam utilizar modelos animais com frequência. Um dos modelos animais mais utilizados é o coelho (Hirano et al., 2004, Rousseau et al., 2004a; Branski et al., 2005) pois, embora este não seja um modelo perfeito, a sua prega vocal apresenta estrutura complexa, semelhante à encontrada na prega vocal humana (Valente et al., 2005).

A fibrose na prega vocal é causada por lesão e inflamação. Procedimentos fono-cirúrgicos inapropriados causam cicatriz fibrosa na prega vocal com facilidade. Essa cicatriz desorganiza a lâmina própria da mucosa da prega vocal e modifica as propriedades biomecânicas das pregas vocais com aumento da resistência viscoelástica da mucosa. Isso reduz a vibração das pregas vocais e causa disfonia, geralmente, difícil de ser tratada (Hirano, 2005).

Atualmente, nenhum método terapêutico pode ser considerado efetivo no tratamento ou prevenção da cicatriz fibrótica (Hirano et al., 2004). Injeção de corticosteróides é um dos métodos mais utilizados e está associado com a diminuição da rigidez, melhora do fechamento glótico e da qualidade vocal, conforme os resultados de Bouchayer e Cornut (1998), e Mortensen e Woo (2006), porém algum grau de fibrose sempre permanece. Além da injeção de esteróides, outras substâncias têm sido utilizadas com intuito preventivo, como a mitomicina C, porém, no estudo de Garret et al. (2001), não demonstrou benefício na prevenção de fibrose. No estudo de Socher (2009), no entanto, houve menor deposição de colágeno até 90 dias após a

cirurgia de enxertia de gordura nas pregas vocais que receberam mitomicina C. Mais recentemente, alguns resultados encorajadores foram descritos com a injeção de fator do crescimento hepatócito que apresenta atividade antifibrótica potente (Hirano et al., 2004).

Vários outros materiais injetáveis têm sido também testados para flexibilizar a prega vocal já cicatrizada como o colágeno bovino (Ford, Bless, 1987), colágeno autólogo (Ford et al., 1995) e gordura autóloga (Brandenburg et al., 1992). No entanto, nenhum desses materiais é capaz de restaurar as alterações fibróticas da lâmina própria e conseguir uma viscoelasticidade ideal idêntica à da prega vocal normal.

A injeção local de corticosteróide é eficaz para atingir concentração elevada em apenas um órgão alvo, como na laringe, com menor ocorrência de efeitos adversos, pois são rapidamente inativados após a absorção, de modo que só metabólitos inativos passam à corrente circulatória (Wannmacher, Ferreira, 1998). Para administração local injetável, utilizam-se, de preferência, corticóides de longa ação, como triancinolona, acetato de metilprednisolona e dexametasona. A triancinolona é largamente utilizada para infiltrações intra-articulares em ortopedia, e seus efeitos e segurança têm sido confirmados (Boehnke et al., 1994; Caldwell, 1996). Bouchayer e Cornut (1998) utilizaram hidrocortisona injetável na prega vocal que pode diminuir os sinais inflamatórios presentes, mas por causa de sua meia-vida curta, provavelmente, interfere menos na cicatrização. Teoricamente, para prevenir formação de tecido fibroso, os corticosteróides de longa duração seriam mais eficazes, o que nos fez optar pela injeção de dexametasona, que além de apresentar alta potência e longa duração tem baixo custo.

Como referido anteriormente, o tratamento da fibrose da prega vocal é muito limitado e algumas pesquisas têm sido feitas no intuito de prevenir sua formação. Muitos fonocirurgiões utilizam esteróides injetáveis na lesão cirúrgica da prega vocal por causa de seus efeitos na cicatrização (Bouchayer, Cornut, 1998; Mortensen, Woo, 2006). Eles afetam a síntese e maturação do colágeno, alteram a força de tensão nas feridas, inibem a função do fibroblasto e deprimem a ação antibacteriana e fagocitária de algumas células de defesa, resultando na alteração do padrão e retardo da cicatrização das feridas (Kloth, McCulloch, 1998). Seu efeito é mais marcante durante os primeiros quatro dias após a lesão. Após esse período, eles têm pouco efeito, exceto para inibir a resistência normal à infecção (Piccinato et al., 2002). Segundo os estudos de Branski et al. (2005) e de Tateya et al. (2006), o processo cicatricial agudo representa o período crítico no qual uma intervenção terapêutica pode diminuir a rigidez da cicatriz da prega vocal, pois as células inflamatórias e os fibroblastos começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular a partir do segundo e terceiro dias após a lesão. Assim, se o objetivo é a prevenção da formação da fibrose, o momento ideal da aplicação de um corticosteróide de longa duração é no início do processo inflamatório, ou seja, ao final da cirurgia. Foi com o intuito de avaliar a possibilidade de modular o processo de cicatrização que escolhemos a fase inicial do processo cicatricial para a injeção do corticosteróide nesse estudo. A decisão de avaliar o processo de cicatrização no terceiro dia foi baseada na descrição de Branski et al. (2005) que demonstraram que nesse período ocorre uma maciça proliferação de células inflamatórias e fibroblastos em torno de uma ferida cirúrgica realizada na prega vocal. A deposição de colágeno novo se inicia em torno do quinto dia, e nesse momento, os fibroblastos são as células predominantes. No sétimo dia,

um colágeno mais maduro já pode ser notado (Leibovich, 1975). Também no estudo de Tateya et al. (2006) foi demonstrado que os componentes da matriz extracelular como o ácido hialurônico, o colágeno e a fibronectina são produzidos logo após uma incisão cirúrgica na prega vocal. Eles são mais proeminentes entre o terceiro e quinto dia. Os autores concluem que esse pode ser o período mais importante em pesquisa terapêutica feita com o objetivo de prevenir cicatriz fibrosa após lesão da prega vocal.

Coleman et al. (1999) avaliaram os efeitos da triancinolona injetada em pregas vocais de cães após realização de um *microflap* lateral (lesão cirúrgica). O mesmo tipo de lesão, sem infiltração de corticosteróide, foi provocada na prega contra-lateral que serviu como controle. Análises pareadas revelaram, um aumento significativo do infiltrado inflamatório em torno do *microflap* nas pregas vocais com corticosteróide injetado e analisadas em 2, 4 e 6 semanas. No nosso estudo, a quantidade de células inflamatórias foi também maior do lado injetado, porém não estatisticamente significativa ($3,16 \times 2,48$), ou seja, aparentemente a quantidade de células inflamatórias não foi afetada pela injeção de corticosteróide ($p > 0,05$). A diferença observada entre o nosso resultado e os de Coleman et al. (1999) pode ser em razão de diferenças metodológicas como o tipo de lesão e o tempo avaliado.

Ainda em relação aos nossos resultados nos quais o corticóide, aparentemente, não influenciou na quantidade de células inflamatórias, o achado deve ser interpretado com cautela e algumas considerações devem ser feitas:

- 1- Ao contrário do que mostra o resultado, a presença do corticóide intratecidual pode ter tido uma ação efetivamente inibidora sobre a migração de células inflamatórias. Entretanto, o fato da corda-estudo ter sofrido, além

da incisão, os traumas causados pela introdução da agulha e pela expansão do tecido decorrente do volume injetado, pode ter induzido a uma migração maior de células inflamatórias do que na prega controle “anulando”, aparentemente, o efeito inibidor do corticosteróide.

2- Considerando que o volume da medicação injetada é relativamente grande se comparada às reduzidas dimensões da corda vocal do coelho, a possibilidade de difusão da droga por contiguidade para a prega controle ter tido um efeito anti-inflamatório não pode ser totalmente afastada. Todavia, esta hipótese nos parece pouco provável, pois caso isso tenha realmente ocorrido, seria de se esperar que não houvesse diferenças significativas nas concentrações de fibras colágenas.

3- Finalmente, pode-se ainda questionar se não haveria a possibilidade do corticóide injetado ter ação na prega controle mediante seu efeito sistêmico, ou seja, por difusão via-sangüínea. Essa hipótese, entretanto, nos parece muito pouco provável, pois, como citado anteriormente (Wannmacher, Ferreira, 1998), a injeção local do corticosteróide permite uma elevada concentração no tecido alvo, mas é rapidamente inativado após sua absorção, de forma que somente metabólitos inativados passam para a corrente circulatória.

Na literatura, a ação dos corticosteróides sobre as células inflamatórias é principalmente estudada após administração sistêmica de corticosteróides em lesões da pele. Segundo os estudos de Leibovich e Ross (1975), após administração sistêmica de hidrocortisona em porcos da índia, que foram submetidos a uma ferida cirúrgica na pele, o número de neutrófilos e fibroblastos ao redor da lesão de pele

não foi afetado na resposta inflamatória aguda, mas ocorreu redução do nível de macrófagos na ferida de aproximadamente um terço. Apesar de comparado com controle (porcos da índia com a mesma lesão, mas sem injeção de hidrocortisona), esse estudo não apresenta teste estatístico.

Injeção de corticosteróide de depósito, como a triancinolona, têm sido utilizados em cicatrizes hipertróficas e quelóides. No estudo *in vitro* de Carroll et al., (2002), foi demonstrado que a diminuição da proliferação celular e do colágeno pela triancinolona é mediada por alterações na secreção de citocinas.

Em nosso estudo, a metodologia empregada não nos permitiu também chegar a uma conclusão definitiva a respeito do impacto da injeção local do corticóide sobre a proliferação de células inflamatórias. Sendo assim, indubitavelmente, novos estudos sobre o infiltrado inflamatório são necessários pois essas células têm papel importante na deposição e reabsorção de colágeno e fibrina abaixo do epitélio. A distribuição, qualidade e quantidade de colágeno e fibrina podem levar a diferenças no tecido cicatricial (Tateya et al., 2005).

As pregas vocais injetadas com corticosteróide tiveram uma significativa menor deposição de colágeno no sítio da lesão. Apenas um estudo na literatura comparou a deposição de colágeno em lesão de prega vocal após injeção de corticosteróide. No estudo de Alencar et al. (2007), o corticosteróide foi injetado imediatamente antes da exérese de um fragmento de mucosa da borda livre das pregas vocais de seis porcos. Na comparação com o controle (mesma lesão sem a injeção de corticóide), trinta dias após, houve diminuição não significativa do depósito de colágeno na lâmina própria das pregas vocais. Esse estudo avaliou o colágeno trinta dias após o procedimento, enquanto que no nosso, a avaliação foi

realizada no terceiro e no sétimo dia, fato esse, que não nos permite realizar uma comparação tecnicamente precisa entre os estudos.

Coleman et al. (1999) realizaram a avaliação funcional por estroboscopia e não encontraram diferença na vibração das pregas vocais em seguimento de até seis semanas de pós-operatório. A análise histológica desse estudo não considerou, entretanto, os componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina, ácido hialurônico, fibronectina,...) que têm sido considerados os responsáveis pelas propriedades vibratórias da mucosa das pregas vocais, mas apenas o infiltrado inflamatório e a neovascularização. Em nosso estudo, apesar de apenas um único componente da matriz extracelular, o colágeno, ter sido estudado, sabemos que este é um componente importante da fibrose e que tem um papel muito relevante na resistência da cicatriz. Tendo em vista que uma das metas mais importantes da fonocirurgia é minimizar a área cicatricial e a sua rigidez, acreditamos que a redução na deposição de fibras colágenas obtida com injeção local do corticosteróide seja uma providência interessante do ponto de vista funcional pós-operatório.

No nosso estudo, o colágeno foi encontrado na lesão três dias após a incisão cirúrgica na prega vocal e teve um crescimento significativo entre três e sete dias, o que está de acordo com a literatura. No trabalho de Rousseau et al. (2004b), foi encontrada deposição de colágeno em estágios bem iniciais da cicatrização das pregas vocais de porcos. Entre três e 10 dias pós-operatório ele era mais frouxo e desorganizado em relação ao controle (prega vocal contra-lateral sem lesão). Após 15 dias havia maior deposição de colágeno e foram observadas bandas espessas na cicatriz.

No estudo de Tateya et al. (2006), em ratos, foi encontrado colágeno na

incisão cirúrgica desde o primeiro dia após a lesão, mas principalmente a partir do terceiro dia. O pico foi em torno de cinco dias. O colágeno tipo I diminuiu após cinco dias, mas o colágeno tipo III não diminuiu até o final do estudo (14 dias). Ambos os tipos de colágenos foram mais elevados que os controles (prega vocal contralateral que foi mantida intacta) em 2, 4, 8 e 12 semanas. Em outro estudo dos mesmos autores, o colágeno tipo I declinou após oito semanas da cirurgia das pregas vocais de ratos, embora tenha permanecido acima dos controles, o que sugere uma lenta remodelação nos dois primeiros meses pós-operatório. Os níveis de colágeno tipo III permaneceram elevados e estáveis durante todo o estudo (Tateya et al., 2005). Esses resultados mostram que o processo de deposição e reabsorção cicatricial do colágeno no período pós-operatório é bastante complexo e conseqüentemente as propriedades viscoelásticas da prega vocal operada devem sofrer grandes alterações ao longo do tempo. Acreditamos que uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da deposição de colágeno na cicatrização será de grande importância para o tratamento e prevenção de cicatrizes em fonocirurgia.

6.1 Considerações finais

A prevenção e o tratamento ideal da fibrose na prega vocal ainda não foram bem estabelecidos, embora muitas pesquisas tenham sido realizadas. O nosso estudo mostrou efetivamente que, não obstante a injeção do medicamento possa estar associada com maior trauma tecidual decorrente da expansão tecidual provocada, o uso do corticosteróide diminui a deposição de colágeno na cicatrização da prega

vocal lesionada. Esse fato nos leva a pensar que o uso prático da injeção intra-operatória dessa substância que, há muito tempo, vem sendo realizada por diversos profissionais apoiada até então em deduções intuitivas, tem, agora, um valor cientificamente comprovado, justificando a continuidade do seu emprego. É preciso salientar, todavia, que mais estudos são necessários, principalmente, para avaliar se as alterações do colágeno causadas pelo corticosteróide persistem a longo prazo e, se efetivamente há impacto significativo dessas alterações a níveis macroscópico da vibração cordal e da análise acústica laboratorial.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo a injeção de corticosteróide na prega vocal de coelhos após um procedimento cirúrgico, causou uma diminuição da deposição de colágeno no sítio da lesão durante a resposta inflamatória aguda. A quantidade de células inflamatórias no sítio da lesão não foi afetada pelo corticosteróide.

8 ANEXOS

ANEXO 1

Média da densidade numérica de cada célula (MRI2) (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos) em relação à intervenção (corticóide x controle)

Par de variáveis	n	Média de cada célula (cél./ μm^2)	Desvio-padrão (cél./ μm^2)	Mínimo	Máximo	Mediana	Significância (p)
				(cél./ μm^2)			
Linfócitos corticóide	12	4,38	2,02	2,00	7,70	4,05	0,969
Linfócitos controle	12	4,22	2,86	0,70	9,70	3,63	
Neutrófilos corticóide	12	1,51	2,40	0,00	8,40	0,63	0,888
Neutrófilos controle	12	1,00	1,42	0,00	4,70	0,50	
Eosinófilos corticóide	12	1,14	1,50	0,00	4,40	0,60	0,206
Eosinófilos controle	12	0,70	1,30	0,00	4,70	0,40	
Macrófagos corticóide	12	3,20	1,68	0,70	6,00	3,35	0,308
Macrófagos controle	12	2,40	2,37	0,50	7,40	1,25	
Fibroblastos corticóide	12	5,77	4,51	1,70	14,00	3,63	0,433
Fibroblastos controle	12	4,20	2,87	0,50	9,25	3,40	
Plasmócitos corticóide	12	2,99	2,11	0,00	7,50	2,90	0,433
Plasmócitos controle	12	2,35	1,77	0,20	6,50	1,70	

ANEXO 2

Média geral da densidade numérica de todas as células (MRI3) em função do tempo (3 dias) e da intervenção (corticóide x controle)

Par de variáveis	n	Média de todas as células (cél./ μm^2)	Desvio-padrão (cél./ μm^2)	Mínimo	Máximo	Mediana	Significância (p)
				(cél./ μm^2)			
corticóide	6	3,93	0,89	2,41	4,83	4,13	0,116
controle	6	2,89	1,09	1,92	4,63	2,67	

ANEXO 3

Média geral da densidade numérica de todas as células (MRI3) em função do tempo (7 dias) e da intervenção (corticóide x controle)

Par de variáveis	n	Média de todas as células (cél./ μm^2)	Desvio-padrão (cél./ μm^2)	Mínimo	Máximo	Mediana	Significância (p)
				(cél./ μm^2)			
corticóide	6	2,40	0,74	1,52	3,62	2,31	0,249
controle	6	2,06	0,72	1,18	3,20	2,06	

ANEXO 4

Média da área do colágeno, medida do controle e da intervenção em 3 e 7 dias

Amostra	Tempo (dias)	Média da área do colágeno*	
		corticóide (%)	controle (%)
1	3	0,051	0,948
2	3	0,011	0,013
3	3	0,001	0,009
4	3	0,034	0,128
5	3	0,005	0,464
6	3	0,014	0,308
7	7	0,686	1,062
8	7	0,401	0,969
9	7	0,189	0,835
10	7	0,001	0,729
11	7	0,600	1,010
12	7	0,193	0,218

*Área de colágeno dividida pela área total X100

ANEXO 5

Média da área do colágeno de 3 dias com relação à intervenção

Par de variáveis	n	Média da medida de colágeno (%)	Desvio-padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Significância (p)
Colágeno corticóide	6	0,02	0,02	0,00	0,05	0,028
Colágeno controle	6	0,31	0,36	0,01	0,95	

n = quantidade de coelhos

ANEXO 6

Média da área do colágeno de sete dias em relação à intervenção

Par de variáveis	n	Média da medida de colágeno (%)	Desvio-padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Significância (p)
Colágeno corticóide	6	0,35	0,26	0,00	0,69	0,028
Colágeno controle	6	0,80	0,31	0,22	1,06	

n = quantidade de coelhos

9 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- Alencar BLF, Baptistella E, Malafaia O, Czezko NG, Scopel TF, Trotta F, Costa AFCB, Watanabe SS, Silva TP. Estudo experimental de corticóide injetável em microcirurgia laríngea. *Arq Int Otorrinolaringol*. 2007;11:438-43.
- Benninger MS, Alessi D, Archer S. Vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope*. 2003;113:620-7.
- Blakeslee DB, Banks RE, Eusterman V, et al. Analysis of vocal fold function in the miniswine model. *J Invest Surg*. 1995;8:409-24.
- Boehnke M, Behrend R, Dietz G, Kuster RM. Intra articular hip treatment with triamcinolone hexacetonide in juvenile chronic arthritis. *Acta Univ Carol*. 1994; 40:123-6.
- Bouchayer M, Cornut G. Microsurgery for benign lesions of the vocal fold. *Ear Nose Throat J*. 1998;67:446-66.
- Brandenburg JH, Kirkham W, Koschke D. Vocal cord augmentation with autogenous fat. *Laryngoscope*. 1992;102:495-500.

¹ Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

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

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

- Branski RC, Verdolini K, Rosen CA, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:19-24.
- Caldwell JR. Intra-articular corticosteroids. Guide to selection and indications for use. *Drugs*. 1996;52:507-14.
- Carlson MA. Acute wound failure. *Surg Clin North Am*. 1997c;77: 607-36.
- Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R. Injeção de corticosteróide em patologias vocais inflamatórias crônicas, revisão da literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(6):926-32.
- Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ. Triamcinolone stimulates bFGF production na Inhibits TGF-[beta]1 production by human dermal fibroblasts. *Dermatol Surg*. 2002;28:704-9.
- Coleman JR, Smith S, Reinisch L, Billante CR, Ossoff J, Deriso W, Garret CG. Histomorphometric and laryngeal videostroboscopic analysis of the effects of corticosteroids on microflap healing in the dog larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999;108:119-27.
- Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins: patologia estrutural e funcional*. 6ªed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44-77.
- Courey MS, Gardner GM, Stone RE, Ossoff RH. Endoscopic vocal fold microflap: a three-year experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:267-73.

- Das DK, Al Juwaiser A, George SS, Francis IM, Sathar SS, Sheikh ZA, Shaheen A, Pathan SK, Haji BE, George J, Kapila K. Cytomorphological and immunocytochemical study of non-Hodgkin's lymphoma in pleural effusion and ascetic fluid. *Cytopathology*. 2007;18:157-67.
- Ehrlich HP. Collagen considerations in scarring and regenerative repair. In: Garg HG, Longaker MT editors. *Scarless wound healing*. New York, NY: Marcel Dekker; 2000. p. 99-113.
- Ford CN, Bless DM. Collagen injection in the scarred vocal fold. *J Voice*. 1987;1:116-18.
- Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: a preliminary clinical study. *Laryngoscope*. 1995;105:944-8.
- Garret CG, Soto J, Riddick J, Billante CR, Reinisch L. Effect of mitomycin-c on vocal fold healing in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:25-30.
- Goldstein NA, Hebda PA, Klein EC, Dohar JE. Wound management of the airway mucosa: comparison with skin in a rabbit model. *Int J Pediatr Otorhinolayngol*. 1998;45:223-35.
- Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, editor. *Vocal Fold Physiology: frontiers of basic science*. San Diego: Singular Publishing; 1993. p.1-34.
- Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:77-85.

- Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999;109: 845-54.
- Hirano, M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniat*. 1974;26:89-94.
- Hirano M. Phonosurgery. Basic and clinical investigation. *Otologia* (Fukuoka). 1975;21(Suppl 1):299-303.
- Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13:143-7.
- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Heisey D, Ford CN. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor [beta]1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope*. 2003a; 113:144-8.
- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham NV, Montequin D, Chan R, Ford CN. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2004;114:548-56.
- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope*. 2003b;113:966-72.
- Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani, RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41:267-74.

- Kloth LC, McCulloch JM. The inflammatory response to wounding. In: McCulloch JC, Kloth LC, Feedar JA editors. *Wound healing alternatives in management*. Philadelphia: CPR F.A.;1998. p. 3-15.
- Lawrence WT. Physiology of acute wound. *Clin Plast Surg*. 1998;25:321-40.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair: A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975;78:71-100.
- Lim X, Tateya I, Tateya T, Muñoz-Del-Rio A, Bless D. Immediate inflammatory response and scar formation in wounded vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115:921-9.
- Louzada P, Sarti W. Corticosteróides. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. *Tratado de otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca; 2002. p. 243-9.
- Mallik MK, Kapila K, Das DK, Haji BE, Anim JT. Cytomorphology of hyaline-vascular Castleman's disease: a diagnostic challenge. *Cytopathology*. 2007;18:168-74.
- Martinez-Hernandez, A. Reparação, regeneração e fibrose. In: Rubin E, Farber JL. editors. *Patologia*. Rio De Janeiro: Interlivros;1990. p. 60-86.
- Mello ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes UL, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113:2187-91.

- Montes GS, Bezerra MSF, Junqueira LCU. Collagen distribution in tissues. In: Ruggeri, A, Motta, PM. editors. *Ultrastructure of the connective tissue matrix*. The Hage: Martinus Nijhoff; 1984. p. 65-88.
- Montes GS, Junqueira LCU. Histochemical localization of collagen and of proteoglicans in tissues. In: Nimni, ME editor. *Collagen* vol II. Philadelphia: CRC Press; 1988. p. 41-72.
- Montes GS, Kristan RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PAS, Junqueira LCU. Histochemical and morphological characterization of reticular fibres. *Histochemistry*. 1980;65:131-41.
- Mortensen M, Woo P. Office steroid injections of the larynx. *Laryngoscope*. 2006;116:1735-9.
- Mulder GD, Brazinsky BA, Seely JE. Factors complicating wound repair. In McCulloch JC, Kloth LC, Feedar JA editors. *Wound healing alternatives in management*. 2nd ed. Philadelphia: CPR F;1998. p. 47-59.
- Pereira FEL. *Degenerações*. Morte celular. Alterações do Interstício. In: Brasileiro Filho G, Pittella JEH, Pereira FEL, Bambirra EA, Barbosa AJA, editors. *Bogliolo patologia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1994. p. 46-81.
- Piccinato CE, Netto JC, Cherri J. Cicatrização. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. *Tratado de otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca 2002; p.189-200.

- Rogerson AR, Clark KF, Bandi SR, Bane B. Voice and healing after vocal fold epithelium removal by CO2 laser vs. microlaryngeal stripping. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;115:352-59.
- Rousseau B, Hirano S, Chan RW, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice.* 2004a;18:116-24.
- Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope.* 2003;113:620-7.
- Rousseau B, Sohn JH, Montequin DW, Tateya I, Bless D. Functional outcomes of reduced hyaluronan in acute vocal fold scar. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004b;113:767-76.
- Schweinfurth JM, Ossoff RH. Surgery for dysphonia. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;7:357-64.
- Sibilia J. Corticosteroids and inflammation. *Rev Prat.* 2003;53:495-501.
- Socher JA. Impacto da mitomicina-C tópica na deposição de colágeno em torno de enxertos de gordura na prega vocal de coelhos: estudo histológico e morfométrico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2009.
- Tateya I, Omori K, Hirano S, Kaneko K, Ito J. Steroid injection to vocal nodules using fiberoptic laryngeal surgery under topical anesthesia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261:489-92.

- Tateya I, Omori K, Hirano S, Kaneko K, Ito J. Steroid injection for Reinke's edema using fiberoptic laryngeal surgery. *Acta Otolaryngol.* 2003;123: 417-420.
- Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless D. Histologic characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114:183-91.
- Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless D. Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115:285-92.
- Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice.* 2002;16:96-104.
- Valente SES, Herculani PP, Zorzetto NL, Guida HL. Estudo da histologia da prega vocal no coelho (*Oryctolagus cuniculus*). In: Resumos da XI Jornada de Fonoaudiologia; 2005; Marília, São Paulo.
- Wannmacher L, Ferreira MBC. Antiinflamatórios esteróides. In Fuchs D, Wannmacher L, editores. *Farmacologia clínica.* 2ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 194-202.
- 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;104:1084-91.
- Yanagihara n, Azuma F, Koike Y, Honjo I, Imanishi Y. Intracordal injection of dexamethasone. *Practica Otorhinolaryngol.* 1964; 57:496-500.

Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LCU. Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat.* 1982;13: 26-38.

APÊNDICE



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 329/06, intitulado: " Estudo histológico da ação do corticosteróide intralesional no processo agudo de cicatrização da lâmina própria das pregas vocais dos coelhos" apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

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

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Domingos Hiroshi Tsuji

Pesquisador (a) Executante: Dra. Andréa Maria Campagnolo

CAPPesq, 25 de Maio de 2006.

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