

**ALEXANDRE ANTONIO MURTA**

**Implante de fáschia lata e de gordura na prega vocal  
de coelho: análise quantitativa do processo  
inflamatório**

Tese apresentada ao Departamento de Oftalmologia e  
Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para a obtenção do Título  
de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Otorrinolaringologia  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

**São Paulo  
2005**

### FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Murta, Alexandre Antonio

**Implante de fásia e de gordura na prega vocal de coelho: análise quantitativa do processo inflamatório** / Alexandre Antonio Murta. -- São Paulo, 2005.

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

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes

Descritores: 1.COELHO 2.FÁSCIA LATA/transplante 3.TECIDO ADIPOSEO/transplante 4. CORDAS VOCAIS/cirurgia 5.GLOTE/cirurgia 6. INFLAMAÇÃO/cirurgia

USP/FM/SBD-086/05

Aos meus amados pais, **Regina e Antonio**, que são o maior tesouro que um filho poderia ter, os verdadeiros responsáveis por todas as conquistas.

À minha doce esposa **Lucyenne**, por todo seu companheirismo, paciência, dedicação e ajuda, ao ler essa tese em primeira mão sobre meu ombro.

Aos meus queridos irmãos **Eduardo, Gustavo e Guilherme**, por terem sempre participado e contribuído com cada detalhe da minha vida.

A minha querida **tia Maria**, um pouco de mãe, de avó e de amiga, por seu amor sem fim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, professor Livre Docente e Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que aceitou esse desafio hercúleo com resignação, paciência, e muita amizade, acreditando e investindo na concretização desse sonho.

Aos **Profs. Dr. Aroldo Minitti**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Coordenador da Pós-Graduação em Otorrinolaringologia e **Prof. Dr. Ossamu Butugan**, grandes mentores dessa renomada instituição de ensino médico, pelo valioso apoio na realização dessa Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**, Chefe do Grupo de Voz da Clínica otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela amizade e apoio constantes, indispensáveis para a execução desse trabalho.

Ao **Dr. Christiano de Giacomo Carneiro**, Responsável pela Divisão de Laringologia e Voz do Instituto Felippu, mais que amigo, meu irmão, sempre presente nos momentos mais difíceis da minha vida, exerceu papel decisivo para a conquista desse objetivo.

Ao **Dr. Alexandre Felippu**, Diretor do Instituto Felippu de Otorrinolaringologia, grande exemplo de profissional e professor, com sua eterna amizade e fidelidade foi o responsável pela minha orientação médica e formação otorrinolaringológica.

Ao **Dr. Perboyre Lacerda Sampaio**, professor adjunto da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pela inspiração, responsabilidade, e acima de tudo confiança em meu potencial, ao me conduzir para essa Pós-Graduação.

Ao **Dr. Paulo Sérgio Mateó Santana**, Diretor do Instituto de Pesquisa Médico-Científica de São Bernardo do Campo, sempre muito mais que um grande Mestre, um grande Amigo, por me conduzir pelos caminhos da cirurgia plástica.

Aos **Drs. João Melo Jr., Domingos Tsuji, Luís Antonio Prata de Figueiredo, Patrícia Santoro**, membros da nossa banca examinadora do exame de qualificação, pelas sugestões e críticas de tanto valor.

À **Márcia, Marilede, Lucy, Bárbara e Jorge**, sempre prestativos e auxiliando nos imprevistos, suportando com paciência nossas constantes faltas.

À **Dra. Sofia Miyakoshi** pela valiosa orientação estatística.

## SUMÁRIO

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Lista de Abreviaturas                                                         |           |
| Lista de Figuras                                                              |           |
| Lista de Gráficos                                                             |           |
| Lista de Tabelas                                                              |           |
| Resumo                                                                        |           |
| Summary                                                                       |           |
| Normas de Publicação                                                          |           |
| Artigo para Publicação                                                        |           |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                     | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                          | <b>19</b> |
| 2.1 Histologia da prega vocal do coelho.....                                  | 19        |
| 2.2 Enxerto de gordura autóloga em pregas vocais: estudos experimentais ..... | 20        |
| 2.3 Enxerto de gordura autóloga nas pregas vocais – Estudos clínicos .....    | 23        |
| 2.4 Enxerto de fáscia muscular em prega vocal - Estudos experimentais .....   | 25        |
| 2.5 Enxerto de fáscia muscular em prega vocal – Estudos clínicos .....        | 26        |
| 2.6 Processo inflamatório e cicatricial.....                                  | 29        |
| <b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....                                           | <b>30</b> |
| 3.1 Amostra .....                                                             | 30        |
| 3.2 Formação dos grupos de estudo .....                                       | 30        |
| 3.3 Técnica cirúrgica .....                                                   | 32        |
| 3.3.1 Anestesia dos coelhos .....                                             | 32        |
| 3.3.2 Obtenção dos enxertos .....                                             | 32        |
| 3.3.2.1 Obtenção do enxerto de gordura .....                                  | 32        |
| 3.3.2.2 Obtenção do enxerto de fáscia lata .....                              | 32        |
| 3.3.3 Acesso à laringe e inserção do enxerto .....                            | 33        |
| 3.4 Remoção da prega vocal .....                                              | 35        |

|          |                                                                   |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5      | Preparações histológicas .....                                    | 35        |
| 3.6      | Análise histológica e morfométrica .....                          | 36        |
| 3.7      | Análise estatística.....                                          | 41        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                                           | <b>42</b> |
| 4.1      | Características dos coelhos .....                                 | 42        |
| 4.2      | Densidade de células inflamatórias .....                          | 42        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                            | <b>48</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                            | <b>56</b> |
| <b>7</b> | <b>ANEXOS</b> .....                                               | <b>57</b> |
|          | <b>ANEXO A</b> – Peso dos coelhos .....                           | <b>57</b> |
|          | <b>ANEXO B</b> - Dados obtidos para os grupos F1 e controle ..... | <b>58</b> |
|          | <b>ANEXO C</b> - Dados obtidos para os grupos G1 e controle ..... | <b>60</b> |
|          | <b>ANEXO D</b> - Dados obtidos para os grupos F2 e controle ..... | <b>62</b> |
|          | <b>ANEXO E</b> - Dados obtidos para os grupos G2 e controle ..... | <b>64</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                          | <b>66</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|            |                                                    |
|------------|----------------------------------------------------|
| dB         | decibel                                            |
| dB NA      | decibel nível de audição                           |
| ed.        | edição                                             |
| et al.     | e outros                                           |
| FMUSP      | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| <i>gap</i> | hiato entre a condução aérea e óssea               |
| Hz         | hertz                                              |
| kHz        | quilohertz                                         |
| mL         | mililitros                                         |
| mm         | milímetros                                         |
| PTA        | <i>pure tone average</i>                           |
| p          | nível de significância                             |
| pág        | página                                             |
| prof       | professor                                          |
| r          | valor calculado do coeficiente de <i>Pearson</i>   |
| s          | segundo                                            |
| t          | valor calculado no teste de <i>Student</i>         |



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal demonstrando sua estruturação em camadas: (A) prega vocal de coelho, corada com HE, x10; (B) prega vocal humana, corada com H.E., x5.

**Figura 2:** Exposição da face anterior da laringe de coelho através de incisão cervical.

**Figura 3:** Microscópio acoplado a monitor e computador, no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05).

**Figura 4:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho. A área correspondente ao enxerto de fásia lata está identificada. (Coelho 13, grupo F2).

**Figura 5:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 50x (Coelho 13, grupo F2). Os cinco quadriláteros em vermelho representam os locais de escolha perienxerto dos campos de maior aumento (200x), para contagem da densidade celular inflamatória.

**Figura 6:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), demonstrando a colocação do graticulo sobre o campo.

**Figura 7:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), demonstrando a exclusão da área no representada pelo enxerto.

**Figura 8:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), apresentando os pontos de inclusão, exclusão, e de intersecção.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de fáscia muscular (F1 e F2) com seus respectivos controles.

**Gráfico 2** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de gordura (G1 e G2) com seus respectivos controles.

**Gráfico 3** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de fáscia muscular (F1 e F2) e gordura (G1 e G2).

**Gráfico 4** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos controle correspondentes aos submetidos à enxertia de fáscia muscular (F1 e F2) e gordura (G1 e G2).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Densidade de células inflamatórias dos grupos sacrificados aos três meses:

**Tabela 2** - Densidade de células inflamatórias dos grupos sacrificados aos seis meses:

## RESUMO

Murta AA. *Implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: análise quantitativa do processo inflamatório* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 73p.

Vários materiais têm sido introduzidos nas pregas vocais na tentativa de solucionar a incompetência glótica, porém poucos são os estudos que avaliam o processo cicatricial decorrente da enxertia destes materiais. O objetivo desta pesquisa foi quantificar o processo inflamatório celular na prega vocal de coelhos submetidos a enxerto unilateral de gordura ou fásia muscular. Estudamos 24 coelhos, divididos em 2 grupos, nos quais gordura ou fásia foi enxertada. O grupo controle foi formado pela prega vocal contralateral, a qual foi submetida ao mesmo procedimento, excetuando-se a colocação do enxerto. Metade dos coelhos de cada grupo foi sacrificada após 90 dias, enquanto a outra metade foi sacrificada após 180 dias da cirurgia. A densidade celular inflamatória peri-enxerto foi avaliada em todas as pregas vocais. Houve um aumento do infiltrado inflamatório no grupo submetido à enxertia de gordura, quando comparado ao submetido à enxertia de fásia. Bem como ao grupo controle, após 90 dias. Quanto aos coelhos sacrificados após 180 dias, não houve diferença entre os grupos entre si e em relação ao grupo controle. Esse estudo sugere que o enxerto de fásia parece ser mais aceitável que o enxerto de gordura para a prega vocal, uma vez que origina menor reação inflamatória tecidual.

### **Palavras-chave:**

Incompetência glótica, fásia, prega vocal, implante de gordura, cirurgia vocal, coelho.

## SUMMARY

Murta AA. *Fat and fascia lata implantation in rabbit vocal fold: quantitative analysis of the inflammatory process* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 73pp.

Several material have been introduced into the vocal folds in attempt to solve glottic incompetence, however just a few studies are related with the consequent inflammatory process. The aim of this article was to quantify the cellular inflammatory process in rabbit vocal fold, which have undergone unilateral fat or muscular fascia introduction. Twenty-four rabbits were allocated into two groups, in which muscular fascia or fat were implanted. The control group, formed by the contra-lateral vocal fold, underwent the same surgical procedure, except for the grafting. Half the rabbits from each group were sacrificed after 90 days from the surgery, while the other half was sacrificed after 180 days. The inflammatory cellular density around the graft was measured in all vocal folds. There was a higher cellular inflammatory reaction in the group submitted to fat grafting when compared to the group submitted to muscular fascia grafting, and to the control group, after 90 days. As for the rabbits sacrificed after 180 days, there was no significant difference between the implanted groups with each other, and with the control group. This study suggests that muscular fascia graft seems to be more acceptable than fat grafts for the vocal fold, as it produces a lower local inflammatory reaction.

### Key Words

Glottic incompetence, fascia, vocal fold, fat implantation, voice surgery, rabbit.

# NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

## *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*

### **INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

#### **SUB**

#### **MISSION**

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, rhinology, 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 (ie, the American Laryngological Association, or the American Broncho-Esophagological Association, etc) 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 re-publish tables or illustrations copyrighted elsewhere. Submit this permission with the manuscript. Papers are scheduled for publication in chronological order of acceptance, but manuscripts received in improper form require longer production time. Manuscripts are edited in accordance with the *AMA Manual of Style*, 9th edition (1998), and with the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (updated Nov 2003; <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 typeset 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 typeset 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 (**no more than five authors are permitted**) 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, study design, 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 1

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 for Windows 2000 or lower. Do not use complex formatting or desktop publishing software. Do not deliver files that contain hidden text. For example, do not use your word processor's automated features to create footnotes and reference lists. Submit text, tables, and figure legends as a single file. Do not include illustrations in this file.

**Illustrations** should be in TIFF, EPS, JPEG, or PSD formats. Do not submit illustrations in Powerpoint. Do not submit native application formats. Journal quality

reproduction will require grayscale and color files at resolutions of at least 300 dpi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions of at least 600 dpi. (These resolutions refer to the output size of the file.)

## **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) "To my knowledge, the content of this paper, all or in part, has not been published, has not been submitted for publication

elsewhere, and is not in press elsewhere." 2) "I verify that I have met all of the following criteria for authorship and am qualified to be listed as an author of this work by my substantive contribution to the conception and design of the project or analysis of the data, my drafting or critical revision of the content of this manuscript, and my approval of the final version to be published." 3) "In consideration of the

Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology taking action in reviewing and editing my (our) submission, I hereby transfer, assign, or otherwise convey all copyright ownership to Annals Publishing Company in the event such work is published in the Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology." (See McCabe BF. Criteria for authorship. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001;110:599 for further clarification.)

## **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 98 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.

June 2004

2 Instructions to Authors 2

## ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Fat and fascia lata implantation in rabbit vocal fold: quantitative analysis  
of the inflammatory process.

Vocal fold implantation: fat x fascia.

Alexandre Antonio Murta, M.D.

Luiz Ubirajara Sennes, M.D., PhD

Christiano de Giacomo Carneiro, M.D.

João Aragão Ximenes Filho, M.D., PhD

Domingos Hiroshi Tsuji, M.D., PhD

From: Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade  
de São Paulo.

Alexandre Antonio Murta.

Adress: Rua Bandeira Paulista, 49/71

São Paulo – SP - Brazil 04532-010

Phone: 55-11-3079-2955

Fax: 55-11-5536-5353

E-mail: [Murta.a@terra.com.br](mailto:Murta.a@terra.com.br)

**Abstract**

Several material have been introduced into the vocal folds in attempt to solve glottic incompetence, however just a few studies are related with the consequent inflammatory process. The aim of this article was to quantify the cellular inflammatory process in rabbit vocal fold, which have undergone unilateral fat or muscular fascia introduction. Twenty-four rabbits were allocated into two groups, in which muscular fascia or fat were implanted. The control group, formed by the contra-lateral vocal fold, underwent the same surgical procedure, except for the grafting. Half the rabbits from each group were sacrificed after 90 days from the surgery, while the other half was sacrificed after 180 days. The inflammatory cellular density around the graft was measured in all vocal folds. There was a higher cellular inflammatory reaction in the group submitted to fat grafting when compared to the group submitted to muscular fascia grafting, and to the control group, after 90 days. As for the rabbits sacrificed after 180 days, there was no significant difference between the implanted groups with each other, and with the control group. This study suggests that muscular fascia graft seems to be more acceptable than fat grafts for the vocal fold, as it produces a lower local inflammatory reaction.

**Key Words**

Glottic incompetence, fascia, vocal fold, fat implantation, voice surgery, rabbit.

## **Introduction**

Among the surgical options for glottic incompetence treatment, the implantation of autologous materials into the vocal fold became more popular in the past two decades<sup>1</sup>. From those, fat and muscular fascia grafts appeared to show promising results, due to its safety, low risk of undesirable reactions, and simple harvesting<sup>2</sup>.

However, in attempt to define the best tissue graft for the larynx, many studies have been carried out, regarding the graft yield and the consequent fibrous scar<sup>2,3</sup>. These characteristics are closely and directly related to the inflammatory process induced by the graft: when the inflammatory process is more exuberant, the possibility of graft reabsorbing and scar tissue formation are greater<sup>5,6</sup>. Both represent undesirable consequences to larynx surgery, as they decrease the therapeutic capacity of the vocal fold augmentation, as they change the viscoelastic properties of the lamina propria and its vibratory characteristics<sup>7,8</sup>.

Doubts still remain concerning the behavior of the inflammatory response resulting from those tissue implants, and its reflex ion on larynx physiology. Nevertheless, this study was planned to quantify the cellular inflammatory densities in rabbit vocal fold after fat and muscular fascia implantation, and compare them with each other and with the control group.

## **Materials and Methods**

Twenty-four New Zealand male rabbits, healthy, weighing between 2.5 and 3.5 kg were selected for this study. A laringofissure approach was used to expose both vocal folds, in which a 1.0 mm incision was performed on its superior aspect. A

pocket was carefully dissected between the muscle and the mucous membrane. The fat or fascia graft, measuring 3 x 1 mm, was introduced into this pocket, in the right vocal fold. The opposite fold underwent the very same procedure, except for the graft placement, in order to form the control group. The fat graft was harvest from the cervical incision, and the fascia from the anterior-lateral aspect of the right thigh.

After 3 or 6 months from the surgery, rabbits were sacrificed, and divided into 4 groups, accordingly to the tissue implanted: fascia after 90 days (F1); fat after 90 days (G1); fascia after 180 days (F2); and fat after 180 days (G2). Three transverse slices were taken from each vocal fold, stained with hematoxilin-eosin for histologic analysis in optic microscope. In every histologic section 5 visual fields were taken at random, tangent to the graft. Each visual field was studied using a 200x optical magnification, over which a translucent grip was placed. The dots resulting from the intersection of vertical and horizontal grid lines were properly divided into two groups, named: dots of inclusion, and dots of coincidence. Those dots of inclusion referred to those grid dots that overlapped areas of interest to cellular counting, and the dots of coincidence referred to those grid dots that were exactly overlapping an inflammatory cell. Thus, the grid dots related with areas of no importance at all for this study, as cartilages, void regions, the glottic lumen, the interior portion of the graft, could be properly rejected. As every visual field had a different rejected area, a mathematic correction method was applied, taking into account just the representative area. Therefore, a relative inflammatory density was calculated for each visual field.

For statistic evaluation and data comparison Student t test was applied for independent samples. Tests were bilateral and significance level adopted was 5%.

## Results

Table 1 shows the means of the inflammatory cells density, for the groups submitted to muscular fascia and fat graft, sacrificed 3 and 6 months after the surgery, as the respective control groups.

The inflammatory process evolution of the groups submitted to muscular fascia and fat graft, at 3 and 6 months, as the control groups, is graphically represented on Graphic 1.

## Discussion

A complete vocal fold closure is needed in order to achieve an adequate voice function <sup>5</sup>. In glottic incompetence, as in cases of mobility alterations, fibrosis, atrophy, vocal fold bowing, several surgical procedures have been suggested to close the glottic gap. One of these procedures is the orally vocal fold implantation of substances, in order to augment the vocal folds volume and help its closure <sup>9,10</sup>.

It is already known that the inflammatory process induced by an implantation substance is directly proportional to the scar fibrosis, which changes the viscoelastic properties of the vocal fold, disturbing its vibratory characteristics <sup>11</sup>. It is also proportional to the aggressiveness against the graft, and inversely proportional to graft survival and yield <sup>8</sup>. In other words, the more intense is the inflammatory process, the more the grafts are reabsorbed, and the more the scar fibrosis is produced. Therefore, it is highly desirable that the implantation substance induces to as minimal inflammatory process as possible.

Laryngeal inclusions of fat and muscular fascia are calling special attention as they are autologous grafts, easily to harvest, with a low morbidity. In this study, the

cellular inflammatory density was higher in those groups submitted to fat and fascia implantation, after 3 months (G1 and F1), when compared to the control group ( $p < 0,001$ ), demonstrating that the chronic inflammatory process persists, due to the presence of the grafts. When the two groups are compared with each other, a greater inflammatory reaction is found in the group of fat ( $p < 0,001$ ). This difference shows us that fat graft provoke a greater inflammatory reaction in the tissue, eventually due to its higher metabolic rate, which makes fat more vulnerable to changes in its primary site<sup>12</sup>, and causes fat liberation of decomposing products, which induces the inflammatory process. Because of this, fat yield is so inconstant, varying from 30% to 60% of graft survival, depending on the method of harvesting, purification, and introduction<sup>13,14</sup>. Duke et al<sup>5</sup>, using dogs, did not find difference in the inflammatory process between fat and fascia grafts, after 3 months, although they used small sample of 8 dogs, and did not compared to a control group. Duprat et al did not observed difference in the inflammatory process between fat implant in vocal fold and the control group, after 1 week, 3 weeks, and 3 months<sup>4</sup>.

Considering the undesirable consequences of the inflammatory process to the vocal fold and to the graft, as well as its effects to the glottic function, these findings suggest us that, from an inflammatory point of view, muscular fascia seems to be more acceptable than fat as an augmentation graft. Resulting in a more exuberant inflammatory response, fat would be more reabsorbed than fascia, with greater scar production in the vocal fold, with disturbance to its vibratory pattern.

In the other hand, it is important that the implanted material presents viscoelastic properties similar to the characteristics of the vocal fold<sup>11</sup>. Fat graft presents characteristics more similar to the vocal fold lamina propria than muscular

fascia. Studies to evaluate the impact of fascia and fat grafts in viscoelastic characteristics of the vocal fold are warranted to help selecting the best choice of implantation.

When we observe the rabbits sacrificed after 6 months, we notice that there is no difference between the vocal folds submitted to fat (G2) and fascia (F2) implantation, and between the control groups ( $p=0.012$  e  $p=0,034$ ). This suggests us that the tissue reaction returned to normal levels of repair, reducing the possibility of graft reabsorbing after this period, although graft absorption depends on other events, as vocal fold vibration <sup>15</sup>.

Other authors had different impressions, as Saccogna et al <sup>6</sup>, who performed fat implantation in 6 cat vocal folds, but did not found any viable fat in 2 animals (6 and 12 months). Reijonen et al implanted fascia in dogs, but could not find any inflammatory process in vocal fold after 6 and 12 months <sup>16</sup>. Also Rodgers et al <sup>17</sup>, after fascia injection in dogs' vocal fold, could not observe the graft presence in any animal, after 12 months.

Due to the important role played by fat and muscular fascia grafts in larynx surgery, additional studies are warranted to better clarify and predict the method, related with other inflammatory process variables, graft yield, and the impact on viscoelastic properties of the lamina propria.



## **Conclusion**

The inflammatory reaction in vocal folds submitted to fat and muscular fascia implantation, after 3 months, was more exuberant than the vocal folds submitted just to surgical dissection (control group), and was more evident in the group with fat grafts than with fascia grafts. After 6 months there was no significant difference between the groups implanted with fat and fascia, as well as comparing to the control groups.

## References

1. Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Laryngol* 1996;105:602-606.
2. Woo P, Rahbar R, Wang, Z. Fat implantation into Reinke space: a histological and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Laryngol* 1999;108:738-744.
3. Reijonen P, Lehtikainen-Söderlund S, Rihkanen H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann Oto. Rhinol Laryngol* 2002;111:523-529.
4. Duprat AC, Costa HO, Eckley CA, Pupo DB, Rossi HHZ. Implante de gordura no espaço de Reinke para correção de alterações histoestruturais das pregas vocais. *Rev Bras Otorrino* 2001;67:78-83.
5. Duke SG, Salmon S, Blalock D, Postma GN, Koufman JA. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope* 2001;111:759-764.
6. Saccogna PW, Werning J, Setrekian S, Struss M. Lipoinjection in paralysed feline vocal fold: Study of graft survival. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1997;117:465-470.
7. Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterial in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope* 1998;108:725-731.
8. Stephenson SP, Roser B. The molecular basis of transplantation tolerance. *Trnasplant Proc* 1985;17:1145-289.

9. Rihkanen H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope* 1998;108:51-54.
10. Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: A new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope* 1999;109:504-508.
11. Ford CN, Bless DM, Loftus JM. Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:237-247.
12. Peer LA. Transplantation of fat. In: Converse, JM. *Reconstructive Plastic surgery*. 2 nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1977;251-286.
13. Hörl HW, Feller AM, Biemer E. Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann Plast Surg* 1991;26:248-256.
14. Illouz YG. Present results of fat injection. *Aesthetic Plast Surg* 1988;12:175-181.
15. Rihkanen H, Kaliste E, Leivo I. Processing of fascia for vocal fold injection: a study in vitro and in paralyzed canine vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:729-733.
16. Reijonen P, Leivo I, Nevalainen T, Rihkanen H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2001;111:1068-1074.
17. Rodgers BJ, Abdul-Karim FW, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2000;110:2012-2015.

## Tables

Table 1 – Inflammatory cells density and standard deviation of the implanted groups and control groups, after 3 and 6 months:

|                 | <i>Fascia</i>       |                    | <i>Fat</i>          |                    |
|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                 | <i>Graft</i>        | <i>Control</i>     | <i>Graft</i>        | <i>Control</i>     |
| <b>3 months</b> | 12.92 ( $\pm$ 1.30) | 4.90 ( $\pm$ 1.01) | 15.83 ( $\pm$ 2.20) | 4.94 ( $\pm$ 1.21) |
| <b>6 months</b> | 5.03 ( $\pm$ 1.02)  | 4.82 ( $\pm$ 0.99) | 4.96 ( $\pm$ 1.04)  | 4.65 ( $\pm$ 0.99) |

Fascia (F1) x Fat (G1):  $p < 0,001$

- Fascia (F1) x Control F1:  $p < 0,001$

- Fat (G1) x Control G1:  $p < 0,001$

- Controls de F1 x G1:  $p = 0,754$

- Fascia (F2) x Fat (G2):  $p = 0,618$

- Fascia (F2) x Control F2:  $p = 0,342$

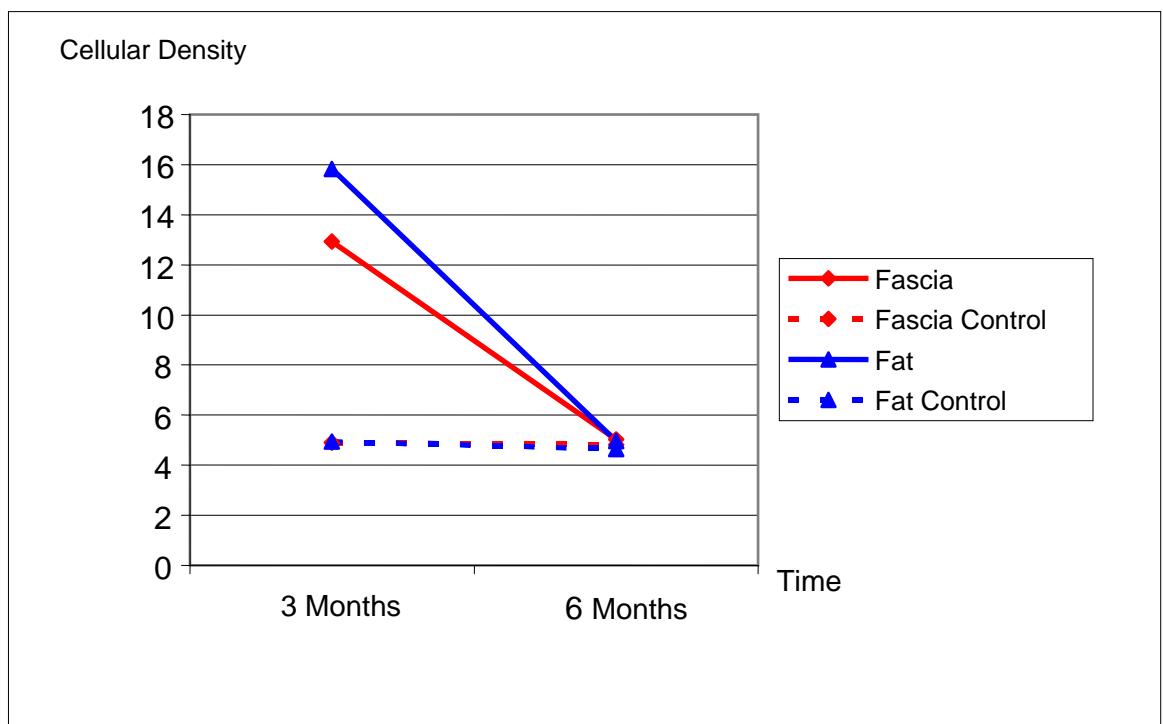
- Fat (G2) x Control G2:  $p = 0,012$

- Controls de F2 x G2:  $p = 0,254$

\* Student t Test for independent samples

## Graphics

Graphic 1 – Graphic representation comparing inflammatory cells density from groups submitted to muscular fascia and fat implantation, after 3 and 6 months, to the respective control groups:



## 1 INTRODUÇÃO

A incompetência ou insuficiência glótica pode ser causada por alterações de mobilidade, fibroses, atrofia ou arqueamento das pregas vocais, levando a disfonia além de aspiração e tosse pouco efetiva (Benninger et al, 1994). A qualidade de vida do paciente pode comprometer-se significativamente pela voz fraca ou soprosa, cansaço ao falar, e pelas alterações da tosse (Brandenburg et al, 1992). Entre as causas mencionadas, a fibrose ou cicatriz talvez seja a que mais se caracteriza pelo impacto social negativo, e pela carência de tratamentos efetivos (Kriesel et al, 2002).

As opções cirúrgicas para tratamento da incompetência glótica podem ser divididas em: preenchimentos variados da prega vocal, cirurgia do arcabouço, e procedimentos de reinervação laríngea (Shindo et al, 1996).

Historicamente, diversas substâncias heterólogas foram introduzidas no espaço paraglótico na tentativa de recuperar a competência aerodinâmica e valvular da glote. O primeiro material a ser usado foi a parafina, abandonada em seguida devido a reações de corpo estranho chamadas de parafinoma.

Os preenchimentos laríngeos não foram mais empregados até que Arnold (1962), propôs a injeção de teflon nas pregas vocais. Inicialmente os resultados foram extremamente animadores, porém as reações de corpo estranho, a fibrose, a formação de granuloma e a possibilidade de extrusão inviabilizaram a escolha do procedimento como tratamento definitivo. Outra substância proposta foi o Gelfoam<sup>®</sup>

(Schramm et al, 1978) que teve seu uso restrito como tratamento definitivo devido à sua longevidade limitada.

Baseando-se nas mesmas intenções dos preenchimentos com substâncias sintéticas, diversos implantes biológicos e enxertos foram sugeridos. Segundo Ford et al (1992), o colágeno bovino permitiria melhor integração à prega vocal por ser histologicamente similar à camada profunda da lâmina própria, além de ser facilmente transportado pela seringa de injeção. Estudos ainda mais recentes propõem o uso do colágeno humano. As principais vantagens seriam a maior longevidade do preenchimento com uma menor reação imunológica. Inicialmente Ford et al (1995) e posteriormente Remacle et al (2000) utilizaram o colágeno autólogo, ou seja, obtido a partir do mesmo indivíduo a ser empregado, enquanto Courey (2001) utilizou o colágeno homólogo proveniente da pele de cadáveres. Os custos elevados e a falta de aprovação pelo órgão de saúde americano – “Food and Drug Administration” (FDA) - ainda não estimularam seu uso.

A gordura e a fásia muscular mostraram resultados promissores quando empregadas como enxertos autólogos, graças à sua segurança e risco reduzido de reações indesejadas. A gordura foi utilizada pela primeira vez na cirurgia reparadora em 1893 por Neuber (apud Boyce et al, 1994), para correção da órbita após osteíte tuberculosa. Hill (1991) realizou estudo experimental com laringe de cães e Mikaelian (1991) foi o pioneiro utilizando na prega vocal de pacientes com paralisia unilateral.

Outra vantagem da gordura seria sua facilidade de obtenção (Shindo et al, 1996) e introdução, podendo ser injetada ou mesmo inserida na prega vocal (Mikaelian et al, 1991; Bradenburg et al, 1992; Shindo et al, 1996; Sataloff et al,

1997; Woo et al, 1999). A reabsorção e longevidade do enxerto foi questionada por Boyce et al (1994), sugerindo ser dependente de fatores como: tamanho e grau de manipulação do enxerto, região anatômica de coleta e região anatômica a ser implantada.

Quanto ao emprego da fáschia muscular em cirurgia, o primeiro cirurgião a sugeri-la foi Bruns (apud Boyce et al, 1994) que em 1905 corrigiu um prolapso retal usando fáschia lata. É um enxerto familiar à otorrinolaringologia, principalmente através da otologia, que sustenta o uso da fáschia do músculo temporal como enxerto reparador de perfurações da membrana timpânica. Previamente teve sua utilização difundida na cirurgia plástica reparadora. Segundo Boyce et al (1994), a fáschia muscular representa uma valiosa opção de enxertia, uma vez que suporta tensão, é rica em colágeno, apresenta boa biodisponibilidade, além de ser um tecido de manuseio delicado. Na laringe, a fáschia muscular também pode ser injetada (Rhikanen, 1998) lateralmente ao músculo vocal ou inserida (Tsunoda et al, 1999) na camada superficial da lâmina própria da prega vocal.

Muitos trabalhos discutem a distribuição dos enxertos de gordura e fáschia (Imamura et al, 2003), o processo de reabsorção (Bauer et al., 1995; Reijonen et al., 2001), e sua repercussão na qualidade vocal (Rhikanen et al, 1999; Duprat et al, 2001; Duke, 2001). No entanto, ainda existem dúvidas quanto ao comportamento da resposta inflamatória tecidual originada após o enxerto desses materiais, e suas possíveis repercussões.

A substância ideal de preenchimento deve valer-se de características que viabilizem seu uso clínico, como originar a menor reação inflamatória tecidual possível, tanto aguda quando crônica, uma vez que a reabsorção do material



enxertado e a fibrose perienxerto são diretamente proporcionais à intensidade dessa reação inflamatória (Duke et al., 2001). Como tal fibrose altera as propriedades viscoelásticas da prega vocal, acarretando prejuízo ao seu padrão vibratório e à voz, e como a reabsorção do enxerto leva a um tratamento insuficiente, o enxerto de preenchimento deve gerar a menor reação inflamatória possível.

Este estudo foi idealizado para comparar a intensidade da reação inflamatória celular na prega vocal após enxerto de gordura e de fáschia muscular, entre si e em relação ao grupo controle, com os objetivos a seguir:

1. Estabelecer a densidade de células inflamatórias na lâmina própria e no músculo tireoaritenóideo das laringes dos coelhos que foram submetidos a enxerto unilateral de gordura e fáschia muscular.

2. Avaliar se houve diferença estatística entre os grupos submetidos a enxerto de gordura e os submetidos a enxerto de fáschia, no mesmo espaço de tempo, e em relação ao grupo controle não enxertado.

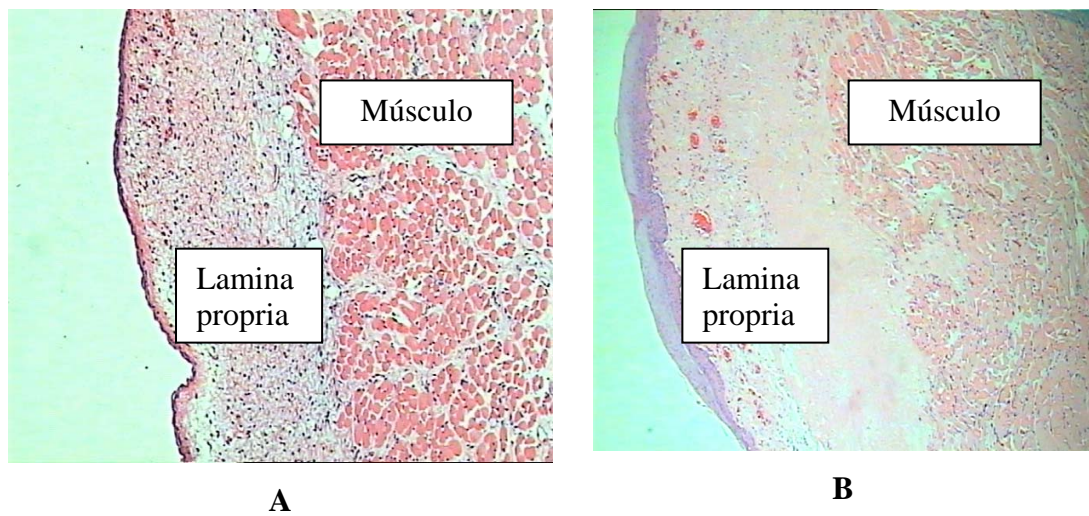
## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Histologia da prega vocal do coelho**

Houve um estímulo muito grande para o estudo da fisiologia laríngea a partir da compreensão das propriedades histológicas (Hirano, 1974) e dos padrões vibratórios das pregas vocais (Isshiki et al., 1999).

Segundo Suarez Nieto (1986), algumas fibras do músculo tireoaritenóideo do coelho inserem-se no ligamento vocal, assim como no homem.

De acordo com Kurita et al. (1995), a prega vocal do coelho apresenta sua porção membranosa com aproximadamente quatro milímetros de comprimento e a mucosa apresenta 0.3mm de espessura (Figura 1). A lâmina própria pode ser dividida em duas camadas distintas. A superficial é pobre em componentes fibrosos e a profunda é densa em fibras elásticas e colágenas. Não há estrutura comparável ao cone elástico.



**Figura 1:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal demonstrando sua estruturação em camadas: (A) prega vocal de coelho, corada com HE, x10; (B) prega vocal humana, corada com H.E., x5.

## 2.2 Enxerto de gordura autóloga nas pregas vocais - Estudos experimentais

Hill et al. (1991) realizaram estudo com cães, submetidos à injeção de gordura autóloga no 1/3 médio das pregas vocais. Os animais, previamente submetidos à secção do nervo laríngeo recorrente, foram sacrificados após quarenta e oito horas (primeiro grupo) e três semanas (segundo grupo) após o procedimento, tendo as laringes removidas para estudo histológico com microscopia de luz. No primeiro grupo, foi identificado processo inflamatório agudo com presença de células inflamatórias e sinais de hemorragia. No segundo grupo, a gordura foi identificada com presença de revascularização e ausência de necrose, caracterizando assim sua viabilidade.

Zaretsky et al. (1995) avaliaram a prega vocal de cães após injeção de gordura, retirada da região supraclavicular. Os animais foram previamente submetidos à secção do nervo laríngeo recorrente. A gordura foi irrigada com solução salina para remoção de elementos sanguíneos e posteriormente injetada lateralmente na porção mediana da prega vocal. Foi realizada análise histológica com microscopia de luz após um, três e seis meses. A gordura foi identificada em todos grupos sendo em menor quantidade no grupo dos seis meses.

Mikus et al. (1995) comparou a injeção de gordura na prega vocal de cães utilizando duas técnicas: 1) lipossucção exclusiva e 2) lipossucção seguida de purificação com homogeneização do tecido, centrifugação e solução tampão. Com relação ao processo inflamatório gerado pela enxertia, não houve diferença significativa entre os grupos. Comparando o rendimento do tecido enxertado, notou-se que a técnica de lipossucção promoveu menores taxas de absorção.

Saccogna et al. (1997) utilizaram seis gatos domésticos para avaliar a injeção de gordura na prega vocal paralisada após secção do laríngeo recorrente. A gordura foi removida da região infra-umbilical, lavada com solução salina e posteriormente injetada na região do músculo vocal. Os animais foram sacrificados com seis semanas após o procedimento e também após quatro, seis, oito e doze meses. Foi sacrificado um animal por grupo exceto com seis meses que dois animais foram sacrificados e analisados. O gato sacrificado com seis semanas apresentou formação de granuloma e pequena quantidade de gordura viável. Aos quatro meses, a análise mostrou volume significante de gordura viável, com células gigantes de corpo estranho ao redor do enxerto. Aos seis meses, em um dos gatos, a gordura foi identificada associada a processo inflamatório ao redor. O outro gato do grupo dos

seis meses não apresentava gordura viável. Aos oito meses, a gordura foi identificada e associada a células gigantes de corpo estranho ao redor. O animal sacrificado após um ano não mostrou gordura viável na análise histológica. Os autores consideram a gordura ser um método efetivo para correções temporárias após paralisias unilaterais de pregas vocais.

Woo et al. (1999) realizaram estudo experimental com laringe de cão, com implante de gordura autóloga através de microcirurgia de laringe e sacrifício do animal após 6 semanas. Os autores demonstraram a presença de células adiposas viáveis após este período, além de demonstrar um aumento no espaço de Reinke em comparação com a prega vocal contralateral.

Stein et al. (2000) compararam, em modelo animal, a migração e a reação tecidual local após injeção de quatro diferentes tipos de enxertos na prega vocal canina, sendo três heterólogos (teflon, silicone e hidroxiapatita) e um autólogo (gordura). Os autores observaram que após seis meses a hidroxiapatita e a gordura foram os materiais que causaram menor reação inflamatória tecidual e ausência de migração para nódulos linfáticos cervicais.

Imamura et al. (2003) em estudo experimental com laringes excisadas, observou que a gordura injetada no músculo tireoaritenóideo no terço médio da prega vocal tende a ocupar um espaço cilíndrico ao longo do maior eixo da prega vocal. Quando a injeção foi realizada no terço médio e lateralmente ao processo vocal, facilitou o fechamento da glote posterior e anterior.

Duprat et al. (2004) em estudo com coelhos, observou que o enxerto de gordura em prega vocal não ocasiona maior reação inflamatória tecidual ou fibrose

reacional, após 1 semana, 3 semanas, e 3 meses do procedimento, usando como controle a prega vocal não enxertada.

### **2.3 Enxerto de gordura autóloga nas pregas vocais – Estudos clínicos.**

Mikaelian et al. (1991) injetaram gordura abdominal removida por lipoaspiração em prega vocal de três pacientes com paralisia vocal, com um período máximo de acompanhamento de 12 meses. Relatam que os resultados clínicos eram animadores.

Shindo et al. (1996) avaliaram vinte e um pacientes submetidos à injeção de gordura na prega vocal devido à paralisia unilateral de etiologias variáveis. Os pacientes foram submetidos a videolaringoscopia, avaliação vocal e ressonância magnética. Após três meses, houve melhora da medialização da prega vocal injetada em setenta e cinco por cento dos pacientes. A ressonância magnética mostrou a presença da gordura em até seis meses após a cirurgia, porém com sinal menor quando comparada aos três meses. Os autores afirmam que a gordura apresenta resultados previsíveis e seguros até dois meses após o procedimento, e pode ser considerada confiável para a correção temporária da paralisia unilateral de prega vocal.

Sataloff et al. (1997) estudaram quatro pacientes com cicatriz de prega vocal secundária a manipulação cirúrgica prévia e que foram submetidos a implante de gordura. Descrevem a criação de uma bolsa no espaço de Reinke seguida do

preenchimento de gordura injetada com seringa de Bruning. Utilizando a laringostroboscopia, os autores observaram melhora nos padrões vibratórios.

Duprat et al. (2001) relatam sua experiência com o uso da gordura no manejo de onze pacientes com insuficiência glótica causada por sulco, cisto aberto e cicatriz pós-operatória. Houve melhora dos padrões vocais e dos parâmetros estroboscópicos além da satisfação da maioria dos pacientes. A gordura foi transportada em bloco com o uso de instrumental convencional utilizado em microlaringoscopia.

Tucker (2001) avaliou vinte e três pacientes após um a quatro anos de enxertia de gordura em laringe por paralisia vocal, através de exame estroboscópico e satisfação do paciente, encontrando melhoria da qualidade da voz em todos os casos.

Hsiung et al. (2003) avaliaram vinte e um pacientes com diagnóstico da atrofia das pregas vocais sem comprometimento significativo do fechamento glótico, que foram submetidos à injeção de gordura na prega vocal. A gordura foi retirada da região infraumbilical, separada de componentes sanguíneos e posteriormente injetada sempre em quantidade superior considerando a taxa de absorção. O tempo médio de seguimento foi de nove meses e meio e houve melhora no fechamento glótico e nos padrões acústicos da voz em quinze pacientes.

Chen et al. (2003) avaliaram vinte e quatro pacientes com diagnóstico de insuficiência glótica, sendo dezesseis por atrofia de pregas vocais e oito por sulco vocal. A gordura foi removida da região infraumbilical e a injeção realizada lateralmente ao músculo vocal da prega vocal comprometida, sempre em quantidade maior descontando a provável taxa de reabsorção. Houve melhora nos padrões

acústicos da voz em dezesseis pacientes após um seguimento de dezenove meses e meio.

Havas et al. (2003) avaliaram quarenta e cinco pacientes submetidos à injeção de gordura por paralisia unilateral de prega vocal. A gordura a ser injetada foi coletada da região periumbilical. O tempo médio de seguimento foi de trinta e três meses e houve melhora significativa de acordo com os padrões de análise acústica além da satisfação da maioria dos pacientes.

#### **2.4 Enxerto de fásia muscular em prega vocal - Estudos experimentais.**

Kononas et al. (1993) estudaram o rendimento do tecido gorduroso enxertado em coelhos, utilizando dois métodos de colheita: lipoaspiração e ressecção. Encontraram maior viabilidade de enxerto nas amostras ressecadas.

Rodgers et al. (2000) avaliaram em um estudo experimental, o comportamento histológico da fásia muscular (lata) injetada na prega vocal de cães. Os animais que inicialmente foram submetidos à secção unilateral do nervo laríngeo recorrente, foram sacrificados após três, cinco, oito, dez e doze meses seguido de remoção da laringe e preparo das lâminas. A fásia muscular não foi identificada em nenhum dos cortes.

Reijonen et al. (2001), também em estudo experimental, apresentam resultados diferentes. Após injeção de fásia lata na prega vocal paralisada de nove cães, foi realizado laringectomia seguido de análise histológica das lâminas preparadas em três e dez dias, seis e doze meses. Foram excluídos dois animais em



que o preparo das lâminas foi falho. A fásia muscular não promoveu reação inflamatória intensa nem formação de granuloma. Apesar da análise histológica ter sido quantitativa e o rendimento final do enxerto não ter sido avaliado, o mesmo foi identificado até após doze meses da injeção.

Duke et al. (2001) publicaram estudo experimental comparando histologicamente a fásia muscular e a gordura. Foram utilizados oito cães, os quais foram submetidos à injeção de gordura, previamente purificada, em uma das pregas vocais e fásia muscular picada na prega vocal contralateral. Não houve diferença estatística comparando a resposta inflamatória e o rendimento final entre os enxertos (gordura e fásia) ao final de 12 semanas.

Tamura et al (2002) propõe estudo com o objetivo de avaliar as propriedades histológicas da fásia muscular confeccionada pelo método “freeze-dried” e injetada em prega vocal de seis cachorros. Acredita-se que a forma de confecção e processamento da fásia muscular pode interferir no comportamento histológico. A fásia muscular foi removida e congelada a uma temperatura de sessenta e cinco graus Celsius negativos por vinte e quatro horas e adicionada a ácido hialurônico. Esse processo diminui o volume e o peso do enxerto em cinquenta e seis por cento, mas não destruiu o colágeno que é o principal componente da fásia muscular.

## **2.5 Enxerto de fásia muscular em prega vocal – Estudos clínicos.**

Rihkanen (1998) foi o pioneiro a incluir a fásia muscular entre as

possibilidades cirúrgicas também autólogas para uso em laringologia. O mesmo descreve a injeção de fásia lata “picada” para correção da insuficiência glótica em nove pacientes. Tendo em vista os bons resultados iniciais, o mesmo grupo - Rihkanen et al (1999) - avaliou dezoito pacientes com diagnóstico de paralisia unilateral de prega vocal de etiologia e duração variáveis. Dos dezoito pacientes, nove pertenciam ao grupo estudado em 1998 e foram incluídos no trabalho de 1999. A fásia foi removida sob anestesia local e cortada em pequenos pedaços usando bisturi. A injeção foi feita sob microlaringoscopia direta, utilizando seringa de pressão, em três ou quatro pontos, sendo que o primeiro lateral ao processo vocal da aritenóide e dois ou três adicionais lateralmente ao músculo tireoaritenóideo, até o terço anterior da prega vocal. Foi utilizada pequena quantidade de gordura adicional para facilitar o transporte pela seringa. As análises perceptiva e acústica da voz, assim como o tempo máximo de fonação mostrou melhora estatisticamente significativa após seis meses do tratamento proposto. O tempo médio de análise após o procedimento foi de 0,83 ano. Os autores relatam que houve melhora significativa nos níveis de jitter, shirmer e tempo máximo de fonação.

Hörl et al. (1991) estudaram o rendimento da gordura enxertada em diversos locais da face, através de exame de ressonância magnética. Observaram uma grande variabilidade no volume remanescente do tecido enxertado, variando entre 30 a 60%.

O implante da fásia do músculo temporal para correção da insuficiência glótica causada por sulco vocal foi descrito por Tsunoda et al. (1999). A técnica utilizada tinha três etapas básicas: confecção da “bolsa” através da separação minuciosa da aderência entre a mucosa e o ligamento vocal, preparação da fásia e

transplante para a prega vocal. Em situações onde a adesão da mucosa ao ligamento vocal era muito pronunciada, a “bolsa” penetrava nos limites do músculo vocal no sentido de evitar dano ao epitélio. Os resultados dessa técnica proposta para quinze pacientes foram estudados e publicados pelo mesmo grupo (Tsunoda et al, 2001). Após o seguimento médio de um ano, houve melhora gradual no tempo máximo de fonação a partir do terceiro mês. Os autores referem melhora do fechamento glótico e da onda mucosa.

Reijonen et al. (2002) publicam a avaliação de quatorze pacientes com diagnóstico de paralisia unilateral de prega vocal, que foram submetidos à injeção de fásia lata picada. O tempo de seguimento variou de cinco a trinta e dois meses e houve melhora estatística nos padrões acústicos e perceptivos da voz.

Rhikanen (2002) estudou o uso de tesoura para picar a fásia muscular e avaliar histologicamente a integridade do enxerto. Os achados histomorfológicos mostraram o enxerto íntegro, vascularizado e sem reação inflamatória aguda ou crônica.

Nishiyama (2002) descreve técnica com confecção de bolsão para receber o enxerto e inserção do mesmo por laringoscopia direta. A paralisia unilateral de prega vocal foi o diagnóstico dos oito pacientes operados. Essa técnica difere da anterior por usar sutura para evitar a extrusão do enxerto além de enrolar a fásia muscular. Houve melhora nos padrões de análise acústica e perceptiva da voz em todos pacientes.

## 2.6 Processo inflamatório e cicatricial

As fases de resposta à agressão tecidual podem ser divididas em quatro: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Peacock, 1984). A fase inflamatória ocorre até três dias após a enxertia. Conforme a inflamação prossegue há migração de neutrófilos e histiócitos. Os neutrófilos ficam na cicatriz por vários dias e são substituídos por histiócitos. Os histiócitos realizam a fagocitose bacteriana e direcionam o processo inflamatório. Quando ativados, produzem os fatores de crescimento levando ao aumento do número de fibroblastos e de células endoteliais, promovendo a formação de granulação e formação de tecido (Robbins, 1991).

Na fase de proliferação, até duas semanas após a agressão, os fibroblastos são as células chaves. Os fatores de crescimento angiogênicos deflagram a neovascularização, epitelização e formação de tecido de granulação.

A remodelação é a fase mais longa. O tecido de granulação recrudescer, o colágeno se remodela e forma-se uma cicatriz madura.

De acordo com Hom (1994), a presença de um enxerto prolonga as fases inflamatória e proliferativa devido ao estímulo contínuo. Os neutrófilos ao redor do enxerto promovem a degradação deste. O produto dessa degeneração, ativa os sistemas do complemento e imune. Os histiócitos aproximam-se da periferia do enxerto, liberam quimiotáxicos induzindo a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, e colagenase, que degrada o colágeno do tecido ao redor do enxerto.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa 200/02),

#### **3.1 Amostra**

A amostra foi constituída por trinta e cinco coelhos albinos da raça New Zealand, todos sadios e do sexo masculino, pesando entre 2,5 e 3,5 kg.

#### **3.2 Formação dos grupos de estudo**

Do total da amostra, seis coelhos foram utilizados para o estudo piloto, houve três perdas e outros dois coelhos foram excluídos por problemas técnicos na confecção das lâminas. Sendo assim, os vinte e quatro animais foram divididos em quatro grupos de seis coelhos cada. Nos dois primeiros (Grupos F1 e F2), os coelhos foram submetidos à inserção de enxerto de fáschia lata na prega vocal direita. Nos outros dois grupos (Grupos G1 e G2), os coelhos foram submetidos a implante de gordura autóloga em bloco também na prega vocal direita. Nos coelhos dos quatro

grupos citados, o grupo controle foi formado pela prega vocal esquerda que foi submetida ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção da colocação do enxerto.

Os procedimentos cirúrgicos e os cuidados pós-operatórios imediatos foram realizados integralmente no Laboratório de Investigação Médica da Otorrinolaringologia (LIM-32) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Após a cirurgia, os animais foram enviados para a Granja RG, biotério localizado na cidade de Suzano, com supervisão de zootecnistas e veterinários onde permaneceram com cuidados diários de alimentação e temperatura até o sacrifício. Todos foram sacrificados pelo mesmo método de injeção endovenosa de 2,0 ml de KCl 20%, sendo que:

- As pregas vocais direitas dos animais sacrificados após um período de 90 dias do procedimento cirúrgico formaram os **grupos Fáscia (F1) e Gordura (G1)** e as pregas vocais esquerdas os respectivos **grupos controle**;

- As pregas vocais direitas dos animais sacrificados após um período de 180 dias do procedimento cirúrgico formaram os **grupos Fáscia (F2) e Gordura (G2)** e as pregas vocais esquerdas os respectivos **grupos controle**.

### 3.3 Técnica Cirúrgica

#### 3.3.1 Anestesia dos coelhos

Os animais foram anestesiados com Xilazina (5 mg/kg) associado à Quetamina (50 mg/kg) por via intramuscular. Foram mantidos em ventilação espontânea, através da incisão laríngea, sem necessidade de cânula traqueal, e fixos à mesa cirúrgica pelas patas, sendo que as dianteiras foram mantidas ao longo do corpo.

#### 3.3.2 Obtenção dos enxertos

##### 3.3.2.1 Obtenção do enxerto de gordura

Através da incisão na região cervical para acesso à laringe, a gordura subcutânea foi captada para posterior inserção. A mesma foi mantida em cúpula de aço contendo soro fisiológico a 0,9%.

##### 3.3.2.2 Obtenção do enxerto de fáscia lata

Foi realizado tricotomia na face anterior e lateral da coxa direita seguido de anti-sepsia com PVP-I tintura (polivinilpirrolidona-iodo a 10%). A incisão foi feita na pele da região ântero-lateral da coxa, medindo 2x2 centímetros, seguido de hemostasia. A pele e o subcutâneo foram afastados para facilitar a exposição da

fáscia muscular a qual foi delicadamente dissecada (1X1centímetro). O plano subcutâneo e a pele foram suturados com fio de Nylon 5-0.

### 3.3.3 Acesso à laringe e inserção do enxerto

Foi realizada tricotomia na região cervical anterior, estendendo-se desde a mandíbula até a fúrcula esternal, e antissepsia com PVP-I tintura (polivinilpirrolidona iodo a 10%). Os coelhos foram submetidos à incisão na linha média, a partir da margem superior da cartilagem tireóidea até a borda inferior da cartilagem cricóidea, utilizando-se bisturi lâmina 15, na pele e subcutâneo, permitindo a exposição das cartilagens tireóidea e cricóidea (Figura 2). Com o uso do microscópio cirúrgico (modelo Inami L 860, lente de 200 mm, binocular angulada, ocular de 12,5 x, iluminação por fibra óptica e fonte de luz halógena de 15 volts e 150 watts) a membrana cricotireóidea foi incisada na linha média, com bisturi lâmina 15, permitindo a visualização da subglote. A cartilagem tireóidea aberta anteriormente permitiu a exposição das pregas vocais. Ambas pregas vocais foram submetidas à incisão de 1,0 mm em sua face superior seguindo-se de minucioso descolamento da mucosa ao longo da margem medial estendo-se também em direção inferior à subglote, utilizando-se estilete Holleback 3s, empregado em dentística. Dessa forma, um bolsão foi confeccionado seguindo o eixo longitudinal da prega vocal, utilizando-se o músculo tireoaritenóideo como referência principal. Foi necessária cautela para evitar a penetração do músculo tireoaritenóideo. O enxerto (fáscia muscular ou gordura) foi cortado sobre placa de aço em fragmento de aproximadamente três milímetros de diâmetro e 1mm de altura, medido com



paquímetro, e foi posicionado em tal bolsão dissecado entre o músculo tireoaritenóideo e a mucosa da prega vocal direita. A prega vocal esquerda foi submetida ao mesmo procedimento com exceção da enxertia. Foi usado fio de Nylon 5-0 para o fechamento da cartilagem tireóidea, da membrana cricotireóidea e da pele. Todos os animais operados foram mantidos vivos, com cuidados diários e controle do processo de cicatrização. Os coelhos receberam antibioticoterapia com Benzilpenicilina procaína 300000 UI, Benzilpenicilina potássica UI, diluída em 3 mL de água destilada, sendo aplicado 0,4 mL intramuscular por dose. A primeira dose foi aplicada durante o procedimento, e duas outras, a cada 24 horas.



**Figura 2:** Exposição da face anterior da laringe de coelho através de incisão cervical.

### **3.4 Remoção da prega vocal**

Após o sacrifício do animal, foi removida a laringe através de incisão cervical em um bloco que se estendia desde a base da língua até o quinto ou sexto anel traqueal. As peças foram dissecadas preservando-se apenas a laringe, removendo-se as partes moles. A seguir a laringe foi aberta, através de incisão longitudinal posterior, entre as cartilagens aritenóideas. Ressecou-se a cartilagem tireóidea, prega vocal e aritenóide de uma hemilaringe, em bloco, entre o ventrículo laríngeo e a subglote. Por fim isolou-se a prega vocal entre a comissura anterior e o processo vocal da cartilagem aritenóidea.

### **3.5 Preparações histológicas.**

Todas as pregas vocais medindo cerca de 0,3 x 0,5 cm foram fixadas em formalina a 10% e colocadas em cassetes após identificação com o número do animal e origem anatômica da amostra. Foram então encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) para processamento. Nesse laboratório foram desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas em xilol, impregnadas pela parafina fundida em estufa a 60 °C, incluídas e a seguir cortadas no micrótomo com espessura de 3µm. Os cortes iniciais foram sempre na porção média da porção membranosa da prega vocal, seguindo-se de cortes em direção à comissura anterior e ao processo vocal até que não se identificasse tecido enxertado.

O número de lâminas para cada animal foi variável de acordo com a identificação do enxerto presente nos cortes. Para análise foram selecionadas três lâminas de cada prega vocal, que permitissem adequada visualização do material enxertado. As lâminas foram identificadas apenas com um código que identificava sua origem.



**Figura 3:** Microscópio acoplado a monitor e computador, no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05).

### 3.6 Análise histológica e morfométrica

As lâminas foram coradas com hemtoxilina-eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico com objetivas de aumento de 50 e 200 vezes (Figura 3). Em cada lâmina foram analisados cinco campos aleatórios que tangenciassem a área enxertada (Figura 4). Cada campo visual foi estudado em aumento óptico de 200 vezes (Figura

5), sobre o qual se aplicava uma grade quadriculada (gratículo) translúcida, contendo 10 linhas horizontais e 14 verticais (Figura 6).

Os pontos de intersecção das linhas horizontais e verticais do gratículo eram contados e divididos em dois grupos: pontos de inclusão e de coincidência

Foram contabilizados como pontos de inclusão os pontos do gratículo que coincidiam com áreas de interesse para a contagem celular, relacionados com os tecidos circunvizinhos ao enxerto. Já os pontos que coincidiam exatamente com células inflamatórias eram contados como pontos de coincidência. Com isso eram descartados os pontos relacionados a áreas da lâmina não interessantes à contagem celular, como cartilagens, o próprio bloco do enxerto, a luz da laringe e artefatos de preparação (Figura 6, 7 e 8).

Como cada campo microscópico apresentava uma área descartada variável, foi então estabelecido um método matemático de correção da densidade celular relativa, levando-se em conta somente a área do campo contada. Assim, a densidade do campo foi equivalente à divisão dos pontos de coincidências pelos pontos de inclusão, multiplicados por 140 (número total de pontos do gratículo), representada pela equação:

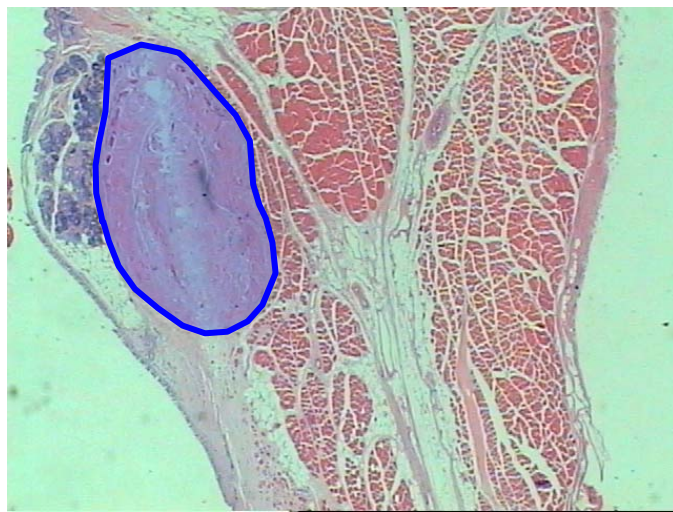
$$\text{Densidade} = (\text{Pontos de Coincidência} / \text{Pontos de Inclusão}) \times 140$$

Contabilizamos 5 campos microscópicos por lâmina, 3 lâminas por prega vocal, 2 pregas por coelho (prega enxertada e prega controle), 6 coelhos por grupo e 4 grupos, totalizando 720 campos microscópicos estudados.

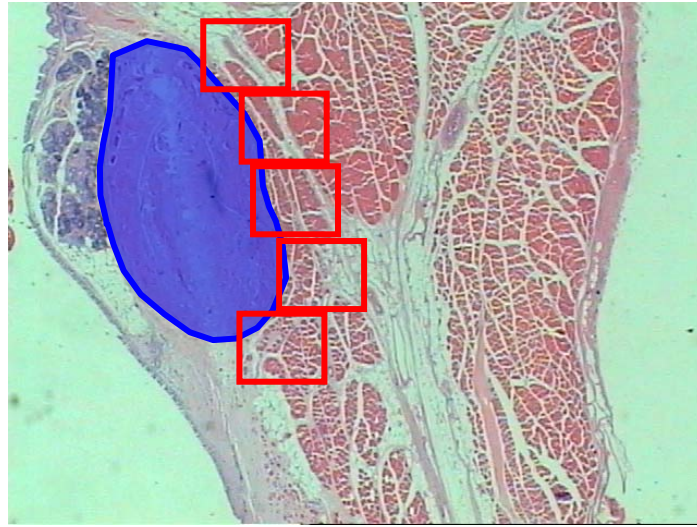
As medidas foram realizadas no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05). O sistema de análise consistiu de uma câmera

(CCD Sony DCX-101), acoplada a um microscópio óptico marca Zeiss, que enviava as imagens para um monitor (Trinitron, Sony).

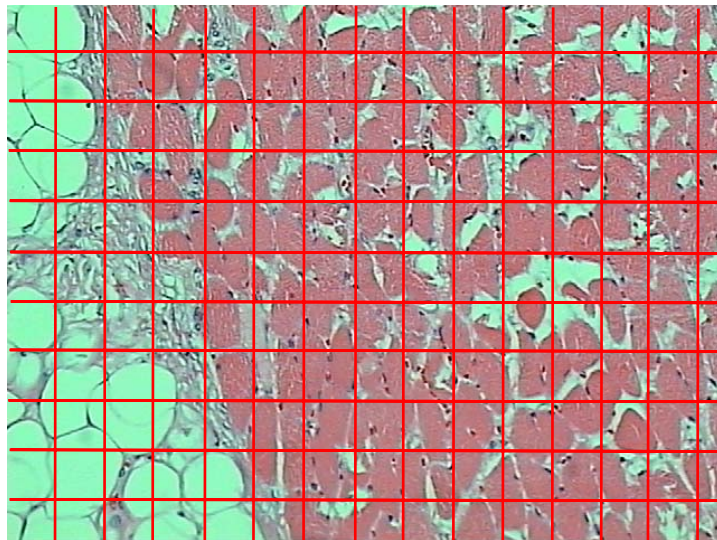
As lâminas foram codificadas e estudadas de maneira cega pelo pesquisador. Foram padronizadas a intensidade de luz do microscópio, a abertura do diafragma e a altura do condensador, bem como os aumentos das lentes objetivas.



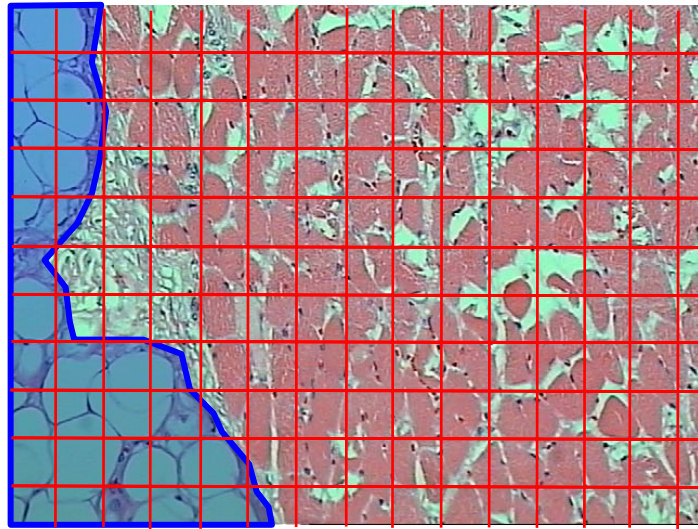
**Figura 4:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 50x. A área correspondente ao enxerto de fásia lata está identificada. (Coelho 13, grupo F2).



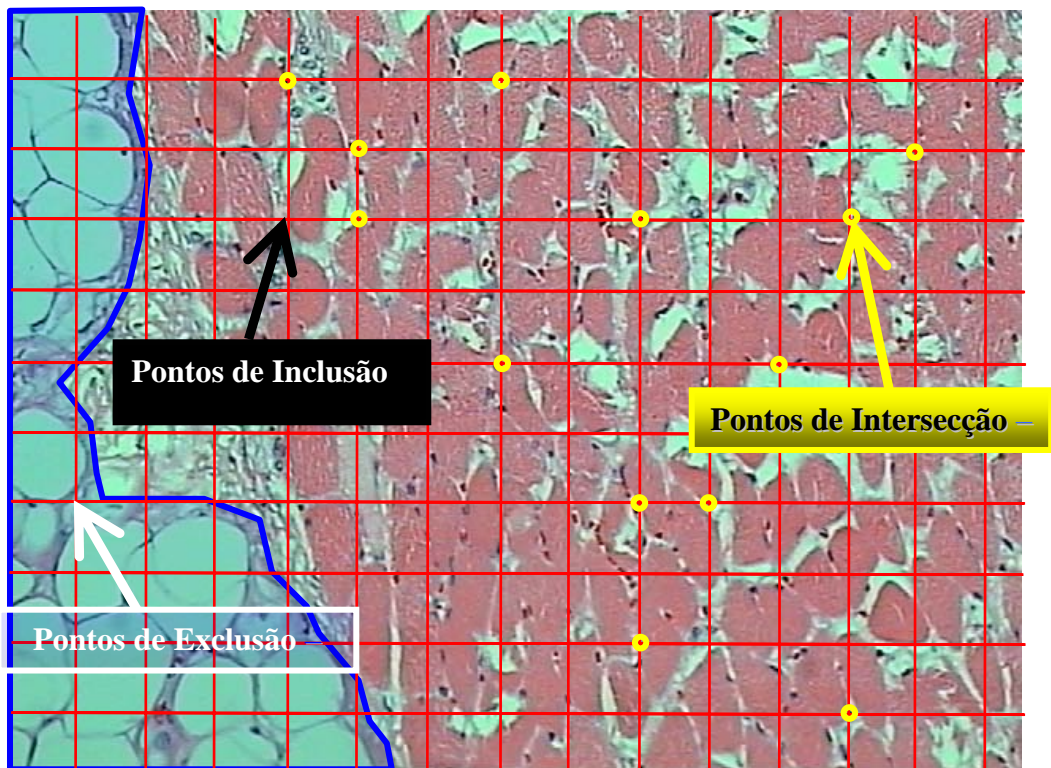
**Figura 5:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 50x (Coelho 13, grupo F2). Os cinco quadriláteros em vermelho representam os locais de escolha perienxerto dos campos de maior aumento (200x), para contagem da densidade celular inflamatória.



**Figura 6:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), demonstrando a colocação do graticulo sobre o campo.



**Figura 7:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), demonstrando a exclusão da área no representada pelo enxerto.



**Figura 8:** Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho, aumento de 200x (Coelho 6, grupo G1), apresentando os pontos de inclusão, exclusão, e de intersecção.

### **3.7 Análise estatística**

A comparação estatística entre os grupos foi feita utilizando-se teste t de Student para amostras independentes. Os testes foram bilaterais e o nível de significância adotado foi de 5%.



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Características dos coelhos**

A média de peso entre os animais foi de 2900 gramas, sendo todos do mesmo sexo (masculino). Os pesos dos coelhos estão apresentados no Anexo A. Não houve intercorrência com os animais do grupo de estudo.

### **4.2 Densidade de células inflamatórias**

Os dados referentes à densidade de células inflamatórias de todos os campos e de todas as lâminas estudadas após 90 dias estão apresentados no Anexo B, referentes aos coelhos submetidos a enxerto de fáscia (F1), e Anexo C, referentes aos submetidos a enxerto de gordura (G1), enquanto os analisados após 180 dias estão presentes no Anexo D, referentes aos coelhos submetidos a enxerto de fáscia (F2), e Anexo E, submetidos a enxerto de gordura (G2).

A Tabela 1 apresenta a média de densidade de células inflamatórias dos dois grupos sacrificados aos três meses e seus respectivos grupos controle (F1, G1, e controles). A Tabela 2 apresenta a média de densidade de células inflamatórias dos

dois grupos sacrificados aos seis meses e seus respectivos grupos controle (F2, G2, e controles).

**Tabela 1** – Densidade de células inflamatórias dos grupos sacrificados aos três meses

|                                | <b>Fáscia</b>       |                    | <b>Gordura</b>      |                    |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                                | <b>Enxerto (F1)</b> | <b>Controle F1</b> | <b>Enxerto (G1)</b> | <b>Controle G1</b> |
| <b>Média (± Desvio padrão)</b> | 12,92 (±1,30)       | 4,90 (±1,01)       | 15,83 (±2,20)       | 4,94 (±1,21)       |
| <b>Amplitude</b>               | 9,8 – 15,6          | 3,0 – 7,1          | 10,8 – 21,1         | 3,0 – 8,0          |

*Comparação estatística\*:*

- Fáscia (F1) x Gordura (G1):  $p < 0,001$  (significante)
- Fáscia (F1) x Controle F1:  $p < 0,001$  (significante)
- Gordura (G1) x Controle G1:  $p < 0,001$  (significante)
- Controles de F1 x G1:  $p = 0,754$  (não significante)

\* teste t de Student para amostras independentes

**Tabela 2** - Densidade de células inflamatórias dos grupos sacrificados aos seis meses

|                               | <b>Fáscia</b>       |                    | <b>Gordura</b>      |                    |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                               | <b>Enxerto (F2)</b> | <b>Controle F2</b> | <b>Enxerto (G2)</b> | <b>Controle G2</b> |
| <b>Média (± Devio padrão)</b> | 5,03 (±1,02)        | 4,82 (±0,99)       | 4,96 (±1,04)        | 4,65 (±0,99)       |
| <b>Amplitude</b>              | 2,9 – 7,2           | 3,0 – 7,0          | 3,1 – 8,1           | 3,0 – 7,2          |

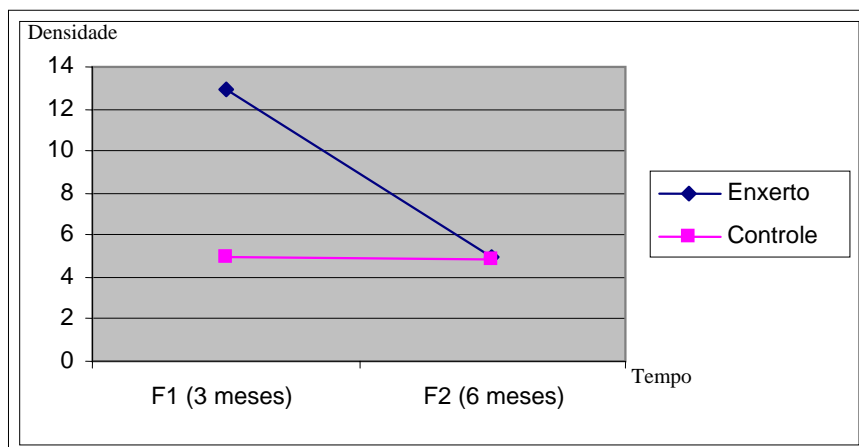
*Comparação estatística\*:*

- Fáscia (F2) x Gordura (G2):  $p = 0,618$  (não significante)
- Fáscia (F2) x Controle F2:  $p = 0,342$  (não significante)
- Gordura (G2) x Controle G2:  $p = 0,012$  (não significante)
- Controles de F2 x G2:  $p = 0,254$  (não significante)

\* teste t de Student para amostras independentes

A evolução do processo inflamatório observado aos 3 e 6 meses está representada graficamente para a fáscia (Gráfico 1) e gordura (Gráfico 2).

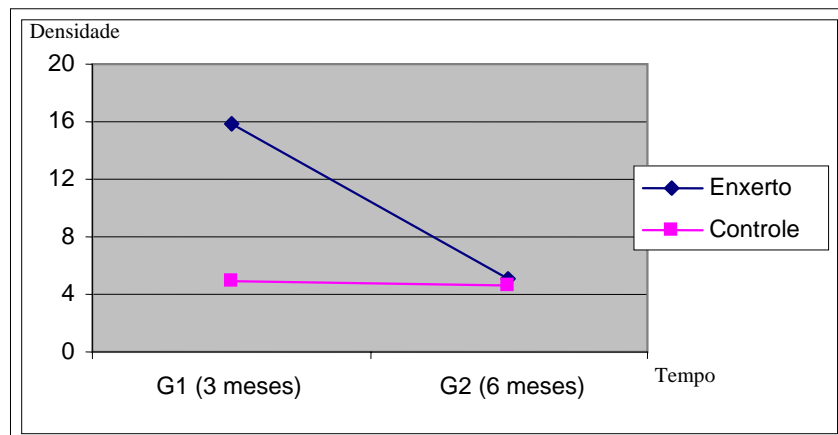
**Gráfico 1** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de fáscia muscular (F1 e F2) com seus respectivos controles.



Enxerto:  $p < 0,001$  (significante)

Controle:  $p = 0,599$  (não significante)

**Gráfico 2** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de gordura (G1 e G2) com seus respectivos controles.



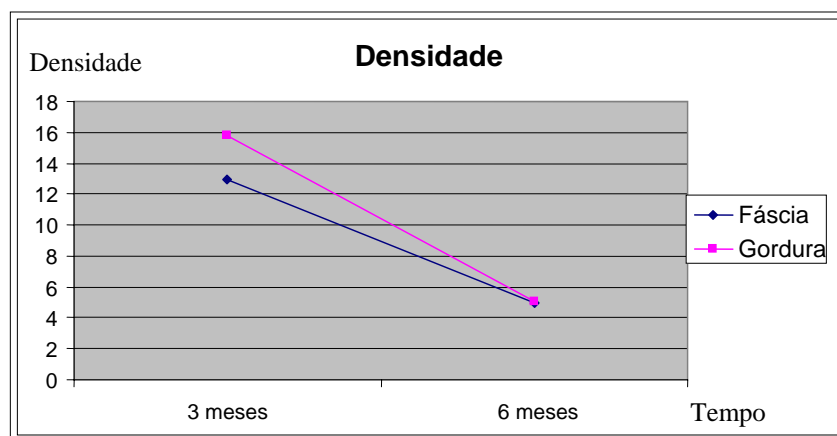
Enxerto:  $p < 0,001$  (significante)

Controle:  $p = 0,071$  (não significante)

A comparação da evolução do processo inflamatório entre 3 e 6 meses nas pregas vocais submetidas a enxerto de fásia e gordura está representada no Gráfico

3.

**Gráfico 3** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos submetidos à enxertia de fáschia muscular (F1 e F2) e gordura (G1 e G2).



F1 X F2:  $p < 0,001$  (significante)

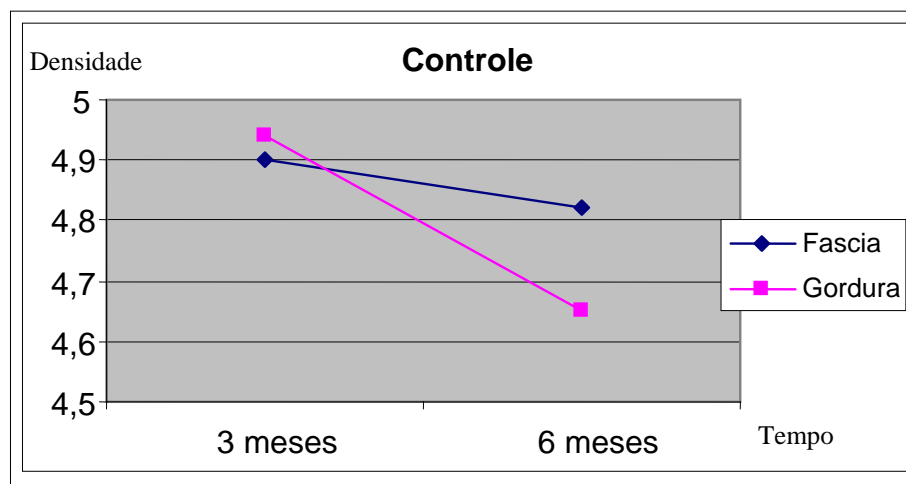
F1 X G1:  $p < 0,001$  (significante)

G2 X F2:  $p = 0,618$  (não significante)

G1 X G2:  $p < 0,001$  (significante)

A comparação da evolução do processo inflamatório entre 3 e 6 meses nas pregas vocais controles dos coelhos submetidos a enxerto de fáschia e gordura está representada no Gráfico 4.

**Gráfico 4** – Representação gráfica comparativa entre a densidade de células inflamatórias dos grupos controle correspondentes aos submetidos à enxertia de fáscia muscular (F1 e F2) e gordura (G1 e G2).



F1 X F2:  $p = 0,599$  (não significativa)

F1 X G1:  $p = 0,754$  (não significativa)

G2 X F2:  $p = 0,254$  (não significativa)

G1 X G2:  $p = 0,071$  (não significativa)

## 5 DISCUSSÃO

A prega vocal humana apresenta estrutura em camadas, consistindo de epitélio, lâmina própria (camadas superficial, intermediária e profunda), e o músculo vocal (Hirano, 1974). Esta estrutura estratificada é fundamental para o caráter vibratório da prega vocal, sendo a camada superficial da lâmina própria a que mais marcadamente vibra durante a fonação.

Para se obter uma adequada função fonatória se faz necessária uma completa coaptação das pregas vocais (Shindo et al., 1996; Sataloff et al., 1997; Woo et al., 1999; Havas et al., 2003). Em condições de incompetência glótica, como em alterações de mobilidade, fibroses, atrofias ou arqueamento das pregas vocais, diversos procedimentos cirúrgicos têm sido propostos para melhorar o fechamento glótico, como as cirurgias do arcabouço laríngeo (Isshiki et al., 1999), as inclusões em prega vocal (Mikaelian et al., 1992; Rhikanen, 1998; Tsunoda et al., 1999; Reijonen et al., 2002), a reinervação laríngea (Nishiyama, 2002 e até procedimentos combinados como reinerações associadas à cirurgias do arcabouço (Tucker, 1989).

Embora a tireoplastia de medialização seja uma excelente alternativa, pressupõe-se uma incisão externa, abordagem cervical e uso de uma prótese de silicone, com suas conseqüentes complicações (Imamura et al., 2003). Em contrapartida, os preenchimentos laríngeos, caracterizados por inclusões de substâncias na prega vocal para aumentar seu volume e favorecer sua coaptação são

realizados via trans-oral, marcadamente menos agressivos e de menor morbidade cirúrgica (Chen et al., 2003). Brüning, em 1911, foi o pioneiro na realização do procedimento de preenchimento laríngeo, usando parafina e desde então, diversos materiais, sintéticos ou não, vêm sendo propostos.

Entretanto, a inclusão de substâncias na prega vocal pode alterar as propriedades viscoelásticas da lâmina própria, especialmente de sua camada superficial, alterando significativamente o comportamento vibratório da mesma (Ford et al, 1992).

O grau de processo inflamatório induzido pela substância de preenchimento é diretamente proporcional à fibrose cicatricial. Assim, deseja-se da substância de preenchimento a menor reação inflamatória possível (Tsunoda et al., 1999; Chan, Titze, 2001). Além disso, a intensidade do processo inflamatório tecidual resultante de enxertia também é diretamente proporcional ao grau de agressão contra o enxerto, e inversamente proporcional à sua sobrevivência (Stephenson, Roser, 1985; Hill et al., 1991). Em outras palavras: quanto maior o processo inflamatório, maior a fibrose da prega vocal e maior a absorção do enxerto.

As inclusões laríngeas de gordura e de fásia muscular vêm merecendo especial atenção por se tratar de enxertos autólogos, de fácil obtenção e baixa morbidade (Hsiung et al., 2003). Observamos que a densidade celular do infiltrado inflamatório perienxerto foi estatisticamente mais elevada nos grupo submetidos à enxertia de gordura e de fásia muscular, no período de três meses (G1 e F1), quando comparadas às dos grupos controle ( $p < 0,001$ ), demonstrando uma persistência da reação inflamatória crônica pela presença dos tecidos enxertados. Comparando os



grupos de fáscia muscular (F1) e gordura (G1) entre si, encontramos uma maior reação inflamatória no grupo submetido a enxerto de gordura (G1) ( $p < 0.001$ ).

Tal diferença nos mostra que a gordura induz a uma maior reação inflamatória no sítio de enxertia, possivelmente devido à sua taxa metabólica ser mais elevada que a da fáscia, necessitando de um maior aporte de oxigênio e glicose (Peer, 1956; Peer, 1977). Essa maior necessidade metabólica dos adipócitos os torna mais sensíveis a mudanças do seu sítio primário. Após a enxertia, existe um período de integração do enxerto, no qual suas células estão sujeitas a condições não ideais de nutrição (Peer, 1977). Neste período, o enxerto de gordura sofreria mais que o de fáscia (que contém menor quantidade de células e menor taxa metabólica), liberando localmente maior quantidade de produtos da decomposição, e determinando um maior infiltrado inflamatório (Saccogna et al., 1997; Stein et al., 2000).

Apesar de não existirem estudos relacionando o efeito isolado dos elementos liberados pela manipulação e enxertia da gordura sobre o processo inflamatório local, há trabalhos que relacionam os métodos de enxertia e o rendimento do enxerto (Kononas et al., 1993; Mikus et al., 1995; Zaretsky et al., 1995; Tamura et al., 2002). Como sabemos, quanto maior o processo inflamatório, maior a agressão imunológica ao tecido enxertado e maior sua reabsorção (Stephenson, Roser, 1985). Na literatura encontramos estudos que reportam de 30% a 60% de sobrevivência do enxerto de gordura, dependendo do método de remoção, purificação e introdução, o que também compromete a viabilidade dos adipócitos e o rendimento do enxerto (Illouz, 1988; Peer, 1977; Hörl et al., 1991). Duke et al. (2001), em experimento em cães, não encontraram diferença significativa entre o rendimento dos enxertos de gordura e fáscia aos 3 meses, embora tenham realizado

---

em uma amostra pequena de 8 cães, e não tenham empregado grupos controle para comparação. Os autores citam a presença de processo inflamatório tecidual de leve intensidade, igualmente em ambos os grupos de enxertos, entretanto não quantificam essa observação.

Também se discute a possibilidade de involuntariamente os enxertos transportarem partículas estranhas originadas do seu corte e manipulação. Demonstrou-se que enxertos de fáscia preparados sobre placas de polímeros, como poliacetato, polietileno e poliéster, apresentam até cinco vezes mais corpos estranhos microscópicos que os enxertos cortados sobre o vidro ou aço (Rihkanen et al., 2003). No presente estudo todos os enxertos foram preparados da mesma maneira, sobre o aço. Entretanto, como a gordura é menos densa e mais flocosa que a fáscia, existe a possibilidade de maior incorporação de partículas estranhas junto ao enxerto, aumentando seu potencial de indução inflamatória tecidual.

Outro ponto observado foi que comumente havia presença de células inflamatórias no interior dos enxertos de gordura, o que não ocorreu nos enxertos de fáscia. Tais células não foram contabilizadas na determinação da densidade do processo inflamatório, porém se o fossem, certamente a diferença entre os grupos teria sido ainda maior. Tal fato pode se explicar, além da maior liberação de produtos de degradação pelos adipócitos em sofrimento, pela conformação histológica do tecido adiposo, que é mais frouxo, menos aderido, muito trabeculado pelas septações de tecido conjuntivo frouxo, mais vascularizado (Junqueira, 1997), possivelmente favorecendo a migração celular em seu interior. O mesmo não ocorre com a fáscia muscular, que por ser mais compacta, densa, e hipocelular, ofereceria maior dificuldade à penetração de células inflamatórias.

Considerando as conseqüências indesejáveis do processo inflamatório para a prega vocal e para o tecido enxertado, e suas repercussões na função glótica, tais achados nos sugerem que, do ponto de vista inflamatório, a fáschia muscular parece ser mais aceitável como enxerto de preenchimento do que a gordura. Levando a uma reação inflamatória tecidual mais intensa, a gordura teria maior tendência a ser reabsorvida, com maior indução de fibrose cicatricial na prega vocal e prejuízo da função vibratória.

Por outro lado, é importante que o tecido enxertado reproduza as propriedades viscoelásticas da lâmina própria da prega vocal (Ford et al., 1992). Neste sentido, o enxerto de gordura possui características mais próximas às da lâmina própria, sendo funcionalmente melhor que a fáschia. Estudos que avaliem o impacto dos enxertos integrados de fáschia e gordura na viscoelasticidade da prega vocal poderiam auxiliar na escolha do melhor enxerto.

Além disso, o presente estudo não nos permite entender completamente a curva de evolução do processo inflamatório causado pelos enxertos, uma vez as amostras foram recolhidas somente em duas ocasiões: aos 3 e 6 meses. Sabe-se que aos três meses ambos os grupos apresentavam maior densidade de células inflamatórias que aos seis meses, porém não sabemos se essa atividade inflamatória encontrava-se em ascensão, ápice ou queda. Para se elucidar a questão seria necessário um estudo que sacrificasse os animais antes e depois dos três meses, eventualmente com amostras seriadas em vários intervalos de tempo. Duprat et al. (2004) realizaram enxertia de gordura em prega vocal de coelhos, sacrificando-os em 1 semana, 3 semanas e 3 meses, e concluíram que não houve diferença significativa

quanto ao infiltrado inflamatório tecidual entre os grupos, bem como com o grupo controle, embora não tenha utilizado nenhum método objetivo de quantificação.

Da mesma forma, o comportamento dos grupos controle não está claro. Não foi encontrada diferença significativa entre o processo inflamatório nas pregas vocais operadas e não enxertadas aos 3 e 6 meses. Porém isso não significa que não houve reação inflamatória após a cirurgia. Sabe-se que, três semanas após uma incisão cirúrgica limpa, praticamente todo o infiltrado inflamatório leucocitário agudo, que se inicia no momento da agressão tecidual, recrudescer, dando lugar ao longo processo de remodelação do colágeno (Robbins, 1991). Assim sendo, provavelmente houve reação inflamatória ao ato cirúrgico da dissecação da prega, mas sem a presença do enxerto para prolongá-la, a reação provavelmente atingiu seu ápice e retornou ao estado de equilíbrio antes da primeira amostra, sacrificada aos três meses.

Quando avaliamos os coelhos sacrificados aos seis meses, notamos que não existiu diferença estatisticamente significativa entre as pregas vocais submetidas à enxertia de gordura (G2) e fáschia muscular (F2), e os respectivos grupos controle. Isso sugere que a reação tecidual retornou a níveis normais de cicatrização, reduzindo a possibilidade de reabsorção dos enxertos a partir desse período, muito embora a reabsorção do enxerto possa depender de outros fatores, como a vibração das pregas vocais (Rihkanen et al., 2003; Hom, 1994). Alguns autores seccionam o nervo laríngeo recorrente de cães e gatos na tentativa de minimizar esse efeito (Saccogna et al., 1997; Rodgers et al., 2000; Rihkanen et al., 2003). Uma vez que coelhos não emitem sons com tanta frequência (Kurita et al., 1995), optamos por não realizar o procedimento. Além disso, como foram operadas as duas pregas vocais de

cada animal, se tivéssemos seccionado ambos os nervos, teríamos de deixar os coelhos traqueostomizados, o que, entretanto, poderia aumentar o processo inflamatório laríngeo por irritações ou infecções. De qualquer modo, a prega vocal contralateral foi controle da enxertada, ambas submetidas às mesmas condições de mobilidade e vibração.

Obtiveram resultados semelhantes aos nossos Reijonen et al. (2001). Enxertaram fásia lata em prega vocal de cães e apontam a ausência de reação inflamatória tecidual aos 6 e 12 meses de enxertia. Entretanto não apresentaram grupo controle, tampouco quantificação celular por métodos estereológicos.

Em contrapartida, outros autores chegaram a conclusões contraditórias, como Saccogna et al. (1997), que dentre seis gatos submetidos à enxertia de gordura em prega vocal, não identificaram a gordura viável em 2 animais, nem aos 6 e tampouco aos 12 meses. Também Rodgers et al. (2000), após injeção de fásia lata em laringe de cães, não identificaram a presença do enxerto em nenhum caso, em doze meses. Embora os métodos de inserção aparentemente tenham respeitado a todas as técnicas preconizadas, os autores não sabem justificar o achado, podendo haver reabsorção total dos enxertos, ou extrusão. A dificuldade de se manter o enxerto na prega vocal deve-se à impossibilidade de se realizar uma sutura de contenção, mesmo porque qualquer corpo estranho, como o fio de sutura, poderia alterar a resposta inflamatória da prega. No presente estudo, tivemos o cuidado de criar uma bolsa entre o músculo tireoaritenóideo e a lâmina própria, através de uma minúscula abertura na mucosa da prega vocal (1 mm de comprimento), utilizando um descolador específico, dificultando assim a extrusão do enxerto, o que não ocorreu em nenhum caso.

Muitos artigos na literatura mencionam ou identificam a reação inflamatória tecidual resultante da enxertia de tecidos como a gordura e a fáscia muscular em prega vocal, mas poucos são os que se propõe a quantificar tal reação. Pela importância que a enxertia de gordura e fáscia muscular desempenha na terapêutica cirúrgica da laringe, estudos adicionais relacionados às demais variáveis do processo inflamatório, rendimento dos enxertos e o impacto nas propriedades viscoelásticas da lâmina própria são necessários para a compreensão e previsibilidade do método.

## 6 CONCLUSÃO

Em relação à reação inflamatória celular em prega vocal de coelhos submetidos à enxertia de gordura e fáscia lata, o presente estudo nos permite concluir que:

- Houve maior reação inflamatória nas pregas vocais submetidas à enxertia de gordura e fáscia lata, aos três meses, quando comparadas às submetidas somente à dissecação cirúrgica (grupos controle), sendo que foi mais evidente no grupo da enxertia de gordura que no de fáscia lata.
- Aos seis meses não houve diferença significativa entre os grupos submetidos à enxertia de gordura e fáscia lata, comparados entre si e aos respectivos grupos controle.

## 7 ANEXOS

## ANEXO A

Tabela com o peso dos coelhos estudados.

| <b>Coelhos</b> | <b>Peso<br/>(grama)</b> | <b>Enxerto</b> | <b>Pós<br/>Operatório</b> | <b>Intercorrência</b> |
|----------------|-------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------|
| 3              | 2600                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 4              | 2700                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 5              | 2800                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 6              | 3000                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 30             | 2800                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 31             | 2900                    | Gordura        | 90 dias                   | Não                   |
| 7              | 3000                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 9              | 2700                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 11             | 2800                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 32             | 3100                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 33             | 2700                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 34             | 3200                    | Fáscia         | 90 dias                   | Não                   |
| 15             | 3000                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 16             | 3200                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 21             | 3100                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 23             | 3100                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 24             | 2900                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 26             | 2900                    | Gordura        | 180 dias                  | Não                   |
| 13             | 2800                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |
| 14             | 3200                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |
| 25             | 3000                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |
| 27             | 2900                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |
| 28             | 2800                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |
| 29             | 2900                    | Fáscia         | 180 dias                  | Não                   |



## ANEXO B

Densidade inflamatória dos cinco campos estudados (A, B, C, D e E) nas três lâminas submetidas à enxertia de fáscia muscular (F1), e nas três lâminas do grupo controle correspondente. Estudo aos três meses.

| Fáscia 3 meses coelho 7 |           |      |      |          |     |     |
|-------------------------|-----------|------|------|----------|-----|-----|
| Campo                   | Densidade |      |      | Controle |     |     |
| A                       | 14,2      | 13,5 | 15,1 | 4        | 5,1 | 4   |
| B                       | 11,9      | 11,5 | 13,6 | 6,5      | 6   | 4,1 |
| C                       | 13,2      | 14,2 | 10,7 | 7        | 4   | 5   |
| D                       | 14,1      | 10,8 | 12,5 | 4,1      | 3,8 | 6,4 |
| E                       | 11,4      | 14,5 | 13,1 | 5        | 5   | 3,6 |

| Fáscia 3 meses coelho 9 |           |      |      |          |     |     |
|-------------------------|-----------|------|------|----------|-----|-----|
| Campo                   | Densidade |      |      | Controle |     |     |
| A                       | 11,9      | 12,5 | 10,8 | 5,1      | 3,5 | 7   |
| B                       | 15,2      | 13,6 | 11,5 | 5        | 4   | 4,2 |
| C                       | 13,5      | 14,7 | 14,2 | 3,9      | 5   | 5,1 |
| D                       | 12,8      | 12,1 | 13,6 | 4,2      | 5,8 | 5   |
| E                       | 12,9      | 13,1 | 12,5 | 5,6      | 5,1 | 6   |

| Fáscia 3 meses coelho 11 |           |      |      |          |     |     |
|--------------------------|-----------|------|------|----------|-----|-----|
| Campo                    | Densidade |      |      | Controle |     |     |
| A                        | 13,6      | 9,8  | 15,2 | 3,8      | 5,2 | 3,8 |
| B                        | 12,8      | 12,4 | 12,3 | 4        | 3,9 | 6   |
| C                        | 12,1      | 14,3 | 10,4 | 6        | 4,1 | 7   |
| D                        | 10,9      | 13,5 | 13,2 | 5,1      | 6   | 3   |
| E                        | 14,7      | 12,9 | 11,5 | 4,6      | 5   | 4   |

| Fáscia 3 meses coelho 32 |           |      |      |          |     |     |
|--------------------------|-----------|------|------|----------|-----|-----|
| Campo                    | Densidade |      |      | Controle |     |     |
| A                        | 13,1      | 12,5 | 12,5 | 4,2      | 5   | 3   |
| B                        | 12,5      | 13,6 | 14,3 | 5,8      | 4   | 4,2 |
| C                        | 12,3      | 11,2 | 12,6 | 5,1      | 3,9 | 5   |
| D                        | 13,8      | 10,9 | 13,5 | 4        | 6   | 4,5 |
| E                        | 11,8      | 15,2 | 12,7 | 6        | 7,1 | 6   |

---

| <b>Fáscia 3 meses coelho 33</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 10,9             | 15,3 | 13,8 | 3               | 7   | 5   |
| <b>B</b>                        | 12,6             | 9,8  | 13,5 | 4,1             | 3,5 | 4   |
| <b>C</b>                        | 14,1             | 12,3 | 12,4 | 6,1             | 5   | 4   |
| <b>D</b>                        | 13,5             | 13,7 | 15,6 | 6,2             | 6,1 | 5,1 |
| <b>E</b>                        | 13,2             | 12,5 | 11,5 | 5               | 3,2 | 6   |

---

| <b>Fáscia 3 meses coelho 34</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 12,9             | 14,5 | 12,9 | 3,8             | 4,6 | 5   |
| <b>B</b>                        | 11,5             | 12,3 | 13,6 | 5,5             | 6,1 | 4,5 |
| <b>C</b>                        | 13,8             | 11,9 | 11,7 | 4,3             | 5,3 | 5,3 |
| <b>D</b>                        | 12,1             | 13,6 | 13,1 | 5,1             | 5,7 | 3,9 |
| <b>E</b>                        | 14,3             | 14,7 | 14,3 | 4,7             | 4,2 | 6   |

## ANEXO C

Densidade inflamatória dos cinco campos estudados (A, B, C, D e E) nas três lâminas submetidas à enxertia de gordura (G1), e nas três lâminas do grupo controle correspondente. Estudo aos três meses.

| <b>Gordura 3 meses coelho 3</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 15,4             | 13,8 | 17,1 | 7,2             | 5   | 5,4 |
| <b>B</b>                        | 20,8             | 14,5 | 15,9 | 4               | 6   | 3,8 |
| <b>C</b>                        | 15,5             | 15,8 | 15,1 | 6               | 3,5 | 4,2 |
| <b>D</b>                        | 14,5             | 15,2 | 13,5 | 5,1             | 7   | 6   |
| <b>E</b>                        | 14               | 16,2 | 12,9 | 4               | 5,2 | 5   |

| <b>Gordura 3 meses coelho 4</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 16,8             | 17,3 | 18,1 | 3,2             | 4   | 5   |
| <b>B</b>                        | 19,4             | 16,4 | 14,2 | 7               | 6   | 5,1 |
| <b>C</b>                        | 15,9             | 20,1 | 15,2 | 4,4             | 3,8 | 3,9 |
| <b>D</b>                        | 13,9             | 14,1 | 13,2 | 4               | 4,2 | 7   |
| <b>E</b>                        | 16,8             | 16,3 | 16,4 | 5,6             | 5,3 | 6   |

| <b>Gordura 3 meses coelho 5</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 12,6             | 15,2 | 16,3 | 7               | 4   | 5   |
| <b>B</b>                        | 19,4             | 19,4 | 13,2 | 3,5             | 3,6 | 3,1 |
| <b>C</b>                        | 13,1             | 14,2 | 18,2 | 3               | 5,8 | 4   |
| <b>D</b>                        | 18,2             | 16,3 | 15,4 | 5               | 6   | 6,5 |
| <b>E</b>                        | 17,6             | 13,8 | 16,2 | 4,2             | 5   | 7   |

| <b>Gordura 3 meses coelho 6</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 18,3             | 12,2 | 15,6 | 3               | 5,6 | 4,2 |
| <b>B</b>                        | 16,5             | 15,6 | 12,8 | 3               | 5   | 8   |
| <b>C</b>                        | 21,1             | 14,9 | 14,3 | 4,4             | 4,8 | 6   |
| <b>D</b>                        | 14,9             | 13,8 | 20,7 | 7               | 3   | 5   |
| <b>E</b>                        | 17,6             | 16,2 | 15,8 | 5,1             | 7   | 3,4 |

---

| <b>Gordura 3 meses coelho 30</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|----------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                         | 17,3             | 12,9 | 14,7 | 4,9             | 3   | 7   |
| <b>B</b>                         | 14,5             | 16,7 | 15,5 | 3               | 4,7 | 3,9 |
| <b>C</b>                         | 18,1             | 18,4 | 19,7 | 4               | 3,5 | 4   |
| <b>D</b>                         | 15,4             | 12,3 | 17,3 | 5,1             | 6,1 | 5,2 |
| <b>E</b>                         | 16,1             | 14,6 | 12,4 | 5,5             | 5,1 | 4,6 |

---

| <b>Gordura 3 meses coelho 31</b> |                  |      |      |                 |     |     |
|----------------------------------|------------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |      |      | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                         | 19,1             | 14,5 | 12,8 | 5,8             | 5   | 5,7 |
| <b>B</b>                         | 15,1             | 10,8 | 12,6 | 4,5             | 5   | 3,4 |
| <b>C</b>                         | 15,8             | 16,8 | 14,7 | 5,1             | 3,9 | 6   |
| <b>D</b>                         | 16,3             | 17,4 | 18,2 | 5               | 6,4 | 5,4 |
| <b>E</b>                         | 14,9             | 15,9 | 20,1 | 4,4             | 7,1 | 4   |

## ANEXO D

Densidade inflamatória dos cinco campos estudados (A, B, C, D e E) nas três lâminas submetidas à enxertia de fáschia muscular (F2), e nas três lâminas do grupo controle correspondente. Estudo aos seis meses.

| <b>Fáschia 6 meses coelho 25</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 5,3              | 3,4 | 4,2 | 6   | 4               | 5   |
| <b>B</b>                         | 4,1              | 4,2 | 4,8 | 5,2 | 3,6             | 3,1 |
| <b>C</b>                         | 3,9              | 5,4 | 3,9 | 3,7 | 5,8             | 4   |
| <b>D</b>                         | 6,2              | 4,5 | 5,5 | 4,8 | 6               | 6,5 |
| <b>E</b>                         | 7,1              | 6,3 | 5,9 | 4   | 5               | 7   |

| <b>Fáschia 6 meses coelho 13</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 3,2              | 4,2 | 5,6 | 4   | 5,5             | 3,7 |
| <b>B</b>                         | 7,2              | 6,5 | 5,1 | 5,2 | 4,2             | 4   |
| <b>C</b>                         | 4,4              | 3,8 | 3,8 | 6,2 | 5,1             | 5,8 |
| <b>D</b>                         | 4,9              | 4,2 | 4,6 | 5   | 3               | 5   |
| <b>E</b>                         | 5,6              | 5,3 | 4,7 | 4   | 6               | 5,2 |

| <b>Fáschia 6 meses coelho 27</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 5,6              | 4,2 | 4,7 | 5,2 | 5,1             | 4   |
| <b>B</b>                         | 5,7              | 8,1 | 4,5 | 5   | 4               | 4,7 |
| <b>C</b>                         | 4,8              | 6,3 | 5,6 | 3,9 | 6               | 5   |
| <b>D</b>                         | 3,1              | 4,5 | 5,1 | 4   | 3,8             | 3,6 |
| <b>E</b>                         | 7,3              | 3,4 | 3,9 | 4,9 | 5,2             | 5   |

| <b>Fáschia 6 meses coelho 14</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 7,4              | 4,5 | 4,3 | 4,7 | 4               | 3,5 |
| <b>B</b>                         | 3,5              | 3,6 | 4,9 | 3,8 | 5,5             | 4   |
| <b>C</b>                         | 3,1              | 5,8 | 5,3 | 7   | 4               | 5,5 |
| <b>D</b>                         | 5,2              | 6,2 | 5,2 | 5,6 | 6,4             | 5   |
| <b>E</b>                         | 4,2              | 5,1 | 4,8 | 5   | 7               | 4,8 |

---

| <b>Fáscia 6 meses coelho 28</b> |                  |     |     |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|-----|-----|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |     |     | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 5,8              | 5,4 | 5,8 | 4               | 5   | 3   |
| <b>B</b>                        | 4,5              | 5,1 | 5,1 | 3,6             | 6,1 | 5   |
| <b>C</b>                        | 5,1              | 3,9 | 4,7 | 7               | 5   | 4,5 |
| <b>D</b>                        | 5,3              | 6,4 | 3,8 | 5,2             | 4,7 | 6,3 |
| <b>E</b>                        | 4,4              | 7,1 | 4,8 | 5               | 5,8 | 5,1 |

---

| <b>Fáscia 6 meses coelho 29</b> |                  |     |     |                 |     |     |
|---------------------------------|------------------|-----|-----|-----------------|-----|-----|
| <b>Campo</b>                    | <b>Densidade</b> |     |     | <b>Controle</b> |     |     |
| <b>A</b>                        | 4,9              | 3,9 | 4,8 | 5,2             | 4,7 | 3   |
| <b>B</b>                        | 3,2              | 4,7 | 5,4 | 4               | 6   | 3,2 |
| <b>C</b>                        | 4,7              | 3,5 | 4,7 | 5               | 3   | 6,2 |
| <b>D</b>                        | 5,1              | 6,1 | 5,3 | 3,8             | 4,5 | 5   |
| <b>E</b>                        | 5,5              | 5,1 | 4,3 | 5               | 4,9 | 4   |

## ANEXO E

Densidade inflamatória dos cinco campos estudados (A, B, C, D e E) nas três lâminas submetidas à enxertia de gordura (G2), e nas três lâminas do grupo controle correspondente. Estudo aos seis meses.

| <b>Gordura 6 meses coelho 15</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 4,8              | 3,2 | 4,7 | 3   | 5               | 5,1 |
| <b>B</b>                         | 3,9              | 7,1 | 6,1 | 3,2 | 3               | 4,6 |
| <b>C</b>                         | 6,1              | 4,4 | 3,8 | 6,2 | 4,1             | 3   |
| <b>D</b>                         | 5,4              | 4,6 | 4,2 | 5   | 4,8             | 4   |
| <b>E</b>                         | 5,9              | 5,6 | 5,3 | 4   | 5               | 4   |

| <b>Gordura 6 meses coelho 16</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 5,6              | 4,9 | 3,9 | 3,8 | 4,2             | 3,1 |
| <b>B</b>                         | 6,1              | 6,1 | 5,4 | 3,4 | 4,9             | 6   |
| <b>C</b>                         | 3,2              | 5,5 | 4,5 | 5   | 7               | 5   |
| <b>D</b>                         | 2,9              | 4,7 | 6,3 | 5   | 5               | 4,6 |
| <b>E</b>                         | 4,8              | 5,8 | 5,1 | 4,5 | 3               | 3,9 |

| <b>Gordura 6 meses coelho 23</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 4,3              | 5,8 | 4,7 | 3,5 | 4,5             | 4   |
| <b>B</b>                         | 3,8              | 4,5 | 5,5 | 4   | 6,1             | 5   |
| <b>C</b>                         | 5,8              | 5,1 | 3,9 | 5,5 | 5               | 3,5 |
| <b>D</b>                         | 5,2              | 5,3 | 6,4 | 5   | 6               | 3,9 |
| <b>E</b>                         | 3,9              | 4,4 | 7,1 | 4,8 | 3               | 6   |

| <b>Gordura 6 meses coelho 24</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 3,7              | 5,4 | 4,4 | 3,8 | 4,1             | 3,9 |
| <b>B</b>                         | 6,2              | 4,5 | 7,2 | 5,1 | 5               | 3,8 |
| <b>C</b>                         | 5,5              | 4,1 | 5,6 | 4   | 5,1             | 5,1 |
| <b>D</b>                         | 4,7              | 3,6 | 5,5 | 5,2 | 4               | 6   |
| <b>E</b>                         | 4,9              | 7,1 | 3,3 | 5   | 6               | 6   |

---

---

| <b>Gordura 6 meses coelho 26</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 5,2              | 3,5 | 6,7 | 3,7 | 5,6             | 4   |
| <b>B</b>                         | 4,7              | 5,4 | 4,2 | 4   | 5               | 7,2 |
| <b>C</b>                         | 3,5              | 4,5 | 5,1 | 5,8 | 4,1             | 6   |
| <b>D</b>                         | 5,4              | 5,8 | 3,5 | 5   | 3               | 5   |
| <b>E</b>                         | 5,2              | 5,1 | 6,6 | 5,2 | 7               | 3,3 |

---

---

---

---

| <b>Gordura 6 meses coelho 21</b> |                  |     |     |     |                 |     |
|----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| <b>Campo</b>                     | <b>Densidade</b> |     |     |     | <b>Controle</b> |     |
| <b>A</b>                         | 6,1              | 4,7 | 5,6 | 4,5 | 4,2             | 6   |
| <b>B</b>                         | 5,8              | 4,1 | 4,2 | 4   | 4,1             | 4   |
| <b>C</b>                         | 3,2              | 6,2 | 7,1 | 5   | 5               | 5,1 |
| <b>D</b>                         | 5,1              | 5,4 | 3,8 | 3,6 | 6               | 5   |
| <b>E</b>                         | 4,9              | 5,9 | 5,2 | 5,7 | 3,6             | 4,4 |

---

---



---

## REFERÊNCIAS <sup>1</sup>

Arnold, G. E. Vocal rehabilitation of paralytic disphonia: IX. Technique of intracordal injection. *Arch. Otolaryngol.*, v. 76, p. 358-68, 1962.

Benninger, M. S.; Crumley, R. L.; Ford, C. N.; Gould, W. J.; Hanson, D. G.; Ossoff, R. H.; Sataloff, R. T. Evaluation and treatment of the unilateral paralyzed vocal fold. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* v.111, p.497-598, 1994.

Boyce, R. G.; Nuss, D. W.; Kluka, E. A. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v.27, n.1, p.39-68, 1994.

Brandenburg, J. H.; Kirkham, W.; Koschkee, D. Vocal cord augmentation with autogenous fat. *Laryngoscope*, v. 102, p. 495-500, 1992.

Chan, R. W.; Titze, I. R. Viscosities of implantable biomaterial in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope*, v.108, p.725-731, 1998.

---

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

Adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

Chen, Y.; Pai, L.; Wang, H.; Hsiung, M. Fat augmentation for nonparalytic glottic insufficiency. *ORL*, v. 65, p. 176-178, 2003.

Courey, M. S. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope*, v.111, p.747-758, 2001.

Duke, S. G.; Salmon, S.; Blalock, D.; Postma, G. N.; Koufman, J. A. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope*, v.111, p.759-764, 2001.

Duprat, A. C.; Costa, H. O.; Eckley, C. A.; Pupo, D. B.; Rossi, H. H. Z. Implante de gordura no espaço de Reinke para correção de alterações histoestruturais das pregas vocais. *Rev. Bras. Otorrino.*, v. 67, p. 78-83, 2001.

Ford, C. N.; Bless, D. M.; Loftus, J. M. Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.101, p.237-247, 1992.

Ford, C. N.; Staskowski, P. A.; Bless, D. M. Autologous collagen vocal fold injection: A Preliminary Clinical Study. *Laryngoscope*, v. 105, p.944-948, 1995.

Havas, T. E.; Priestley, K. J. Autologous fat injection laryngoplasty for unilateral vocal fold paralysis. *J. Surg.*, v. 73, p. 938-43, 2003.

Hill, D. P.; Meyers, A. D. Harris, J. Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine larynx. *Laryngoscope*, v.101, p.344-48, 1991.

Hom, I. D. B. The wound healing response to grafting tissues. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v.27, p.13-24, 1997.

Hörl, H. W.; Feller, A. M.; Biemer, E. Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann. Plast. Surg.*, v.26, p.248-256, 1991.

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

Imamura, R.; Sennes, L. U.; Chung, D.; Bohadana, S.; Tsuji, D. H. Injeção de gordura na prega vocal: efeitos do local de injeção sobre a configuração glótica e a distribuição espacial da gordura injetada. *Rev. Bras. Otolaringol.*, v. 69, p. 445-450, 2003.

Illouz, Y. G. Present results of fat injection. *Aesthetic Plast. Surg.*, v.12, p.175-181, 1988.

Junqueira, LC; Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Kononas, C. T.; Bucky, L. P.; Hurley, C.; May Jr, J. W. The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in rabbit. *Plast. Reconst. Surg.*, v. 91, p.763-1993, 1993.

Kriesel, R. J.; Thibault, S. L.; Chan, R. W.; Suzuki, T.; Van Groll, T. J.; Bless, D. M.; Ford, C. N. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.111, p.884-889, 2002.

Kurita, S.; Nagata, K.; Hirano, M. Comparative study of the layer structure of the vocal fold. In: Bless, DM. *Vocal fold physiology*. 1st ed. San Diego: Singular; 1995. p.03-21.

Mikaelian, D. O.; Lowry, L. D.; Sataloff, R. T. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope*, v. 101, p. 465-468, 1991.

Mikus, J. L.; Kilpatrick, S. E.; Koufman, J. A. fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.105, p.17-22, 1995.

Nishiyama, K.; Hirose, H.; Iguchi, Y.; Nagai, H.; Yamanaka, J.; Okamoto, M. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold as a treatment for recurrent nerve paralysis. *Laryngoscope*, v. 112, p.1420-1425, 2002.

Peacock, EE. *Wound Repair*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1984.

Peer, L.A. The neglected free fat graft. *Plast. Reconst. Surg.*, v.18, p. 233-245, 1956.

Peer, L.A. Transplantation of fat. In: Converse, JM. *Reconstructive Plastic surgery*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1977. p. 251-286.

Robbins. *Patologia estrutural e funcional*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.34-72.

Reijonen, P.; Leivo, I.; Nevalainen, T.; Rihkanen, H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope*, v.111, p.1068-1074, 2001.

Reijonen, P.; Lehtikoinen-Söderlund, S.; Rihkanen, H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* v. 111, p. 523-529, 2002.

Remacle, M.; Lawson, G.; Keghian, J.; Jamart, J. Use of injectable collagen for correcting glottic gaps: initial results. *J. Voice*, v.13, n.2, p.280-288, 1999.

---

Rihkanen, H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope*, v.108, p.51-54, 1998.

Rihkanen, H.; Soderlund-Lehikoinen, S.; Reijonen, P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope*, v.109, p.1854-1857, 1999.

Rihkanen, H.; Kaliste, E.; Leivo, I. Processing of fascia for vocal fold injection: a study in vitro and in paralyzed canine vocal folds. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* v. 112, p. 729-733, 2003.

Rodgers, B. J.; Abdul-Karim, F. W.; Strauss, M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope*, v. 110, p.2012-2015, 2000.

Saccogna, P. W.; Werning, J.; Setrekian, S.; Struss, M. Lipoinjection in paralysed feline vocal fold: Study of graft survival. *Otolaryngol. Head and Neck Surg.* 117 (5): 465-70, 1997.

Sataloff, R. T.; Spiegel, J. R.; Hawkshaw, M.; Rosen, D. C.; Heuer, R. J. Autologous Fat implantation for vocal fold scar: A Preliminary Report. *J. Voice*, v.11, n.2, p.238-246, 1997.

Schramm, V. L.; May, M.; Lavorato, A. S. Gelfoam paste injection for vocal cord paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence. *Laryngoscope*, v. 88, p.1268-1273, 1978.

Shindo, M. L.; Zaretsky, L. S.; Rice, D. H. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann. Otol. Laryngol.*, v.105, p.602-606, 1996.

Stein, J.; Eliachar, I.; Myles, J.; Munoz-Ramirez, H.; Strome, M. Histopathologic study of alternative substances for vocal cord medialization. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.9, n.2, p.221-226, 2000.

Stephenson, S. P., Roser, B. The molecular basis of transplantation tolerance. *Trnsplant. Proc.*, v.17, p.1145-289, 1985.

Suarez-Nieto, R.; Casas, A.; Vigil, M. Morfilogía comparada del músculo tireoaritnoideo. *Anales O.R.L. Iber-Amer. XIII*, v.1, p.39-63, 1986.

Tamura, E.; Kitahara, S.; Kohno, N.; Ogura, M.; Hiroi, S. Use of freeze-dried autologous fascia to augment the vocal fold: an experimental study in dogs. *Acta Otolaryngol.*, v. 122, p. 537-540, 2002.

Tsunoda, K.; Baer, T.; Niimi, S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: long term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*, v.111, p.453-457, 2001.

Tsunoda, K.; Takanosawa, M.; Niimi, S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: A new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*, v.109, p.504-508, 1999.

Woo, P.; Rahbar, R.; Wang, Z. Fat implantation into Reinke space: a histological and stroboscopic study in the canine. *Ann. Otol. Laryngol.*, v.108, p.738-744, 1999.