

**CHRISTIANO DE GIACOMO CARNEIRO**

**Avaliação da deposição do colágeno após enxerto de fásia  
lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo  
histomorfométrico**

Tese apresentada ao Departamento de  
Oftalmologia e Otorrinolaringologia da  
Faculdade de Medicina da Universidade de  
São Paulo para obtenção de 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

Carneiro, Christiano de Giacomo

**Avaliação da deposição de colágeno após enxerto de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico** / Christiano de Giacomo Carneiro. -- 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.COLÁGENO/análise 7.FIBROSE/cirurgia

USP/FM/SBD-087/05

À meu pai **Arakem**, e minha mãe **Célia**, minhas principais referências, gostaria de fazer para um filho o que vocês fizeram pra mim.

À minha esposa **Geisa**, que divide meus sonhos comigo, pela paciência e pelo incentivo.

À minha irmã **Camila**, sempre alegre e agradável, pela ajuda com os coelhos e pelo apoio incondicional.

À meu avô **Luís**, (*in memoriam*) de quem sinto muita falta e que iria gostar demais de ver seu nome escrito aqui.

## **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, grande pesquisador e um extremo caráter, que acreditou no desenvolvimento desse projeto e forneceu todos os meios para que o sonho se concretizasse.

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**, alicerces dessa renomada instituição de ensino médico e que nos possibilitaram a realização da Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva**, Professor Titular do Departamento de Patologia da FMUSP, com sua capacidade científica inquestionável, nos ajudou em fases absolutamente fundamentais para a finalização desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**, Chefe do Grupo de Voz da Clínica

otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo incentivo e auxílio sempre presentes na execução desse trabalho.

Ao **Dr. Alexandre Felippu**, Diretor do Instituto Felippu de Otorrinolaringologia, professor e principalmente amigo, o principal responsável pela minha formação otorrinolaringológica e um incentivador constante em busca da melhora profissional.

Aos **Doutores Ossamu Butugan, Renata Cantisani Di Francesco, Henry Ugadin Koishi, Luís Antonio Prata de Figueiredo e Richard Louis Voegels**, membros da nossa banca examinadora do exame de qualificação, pelas considerações e críticas altamente valiosas.

Às **Dra Andréia Nascimento e Sofia Y M** pela orientação estatística e ao **Dr. João Aragão Ximenes Filho**, grande amigo e pesquisador, pelo auxílio cirúrgico com os coelhos e também na análise estatística.

Aos veterinários **Wilson Santos Pontelli e Sílvio Sanchez Veiga**, pelo auxílio no manejo com os coelhos e ao Sr. **Antonio Aguiari**, meu sogro, pela disponibilidade.

Aos colegas de Pós-Graduação **João Ximenes, Marconi Fonseca, Erich Melo, Marzo Moussale, Marcus Lessa**, entre outros, pelo convívio agradável e ao

colega de residência médica **Alexandre Murta** pela grande amizade e sinceridade acima de tudo.

.À coordenadora da FUNCRAF **Maria Aparecida Ribeiro Campos Cavarsan**, pelas ausências durante a fase de conclusão desse trabalho e à dentista **Ana Lúcia Pereira Leite Simão**, pela dica fundamental do instrumental usado na cirurgia dos coelhos.

À **Márcia, Marilede, Lucy, Bárbara e Jorge**, sempre prestativos e auxiliando nos imprevistos, facilitando muito as nossas atividades. À técnica do Laboratório de patologia **Cássia**, que fez e refez várias lâminas para análise da microscopia óptica.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
Normas de publicação	
Artigo para publicação	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 Uso de animais para estudos experimentais em laringologia .....	19
2.2 Processo cicatricial.....	20
2.3 Cicatriz na prega vocal.....	21
2.4 Enxerto de gordura autóloga nas pregas vocais - estudos experimentais ...	22
2.5 Enxerto de gordura nas pregas vocais – estudos clínicos.....	25
2.6 Enxerto de fáscia muscular em prega vocal – estudos experimentais .....	25
2.7 Enxerto de fáscia muscular em prega vocal – estudos clínicos .....	26
2.8 Identificação histoquímica do colágeno pelo Método da Picrossírius- polarização .....	28
<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 Preparo do enxerto .....	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 Isolamento da prega vocal .....	35
3.5 Preparações histológicas .....	36
3.6 Análise histológica .....	37
3.7 Análise morfométrica .....	37
3.8 Análise estatística .....	40
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Características dos coelhos .....	41
4.2 Identificação do enxerto .....	41
4.3 Relação do enxerto com as estruturas adjacentes .....	43
4.4 Comparação da densidade do colágeno entre os grupos .....	47
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 A utilização do coelho em estudos experimentais na laringologia – método .....	51
5.2 Método estereológico .....	54
5.3 Método da picrossírius-polarização .....	55
5.4 Reação inflamatória e enxertia .....	57
5.5 Arranjo das fibras colágenas .....	62
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO A</b> - Aprovação da comissão de ética do hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) .....	<b>65</b>
<b>ANEXO B</b> - Dados obtidos para os grupos F1, G1 e controle .....	<b>66</b>
<b>ANEXO C</b> - Dados obtidos para os grupos F2, G2 e controle .....	<b>71</b>
<b>ANEXO D</b> - Evolução pós-operatória dos diferentes grupos de coelhos que receberam enxertos de fascia lata e gordura na prega vocal.....	<b>76</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

Cappesq	Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa
et al.	e outros
FDA	Food and Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital de Clínicas
HE	hematoxicilina-eosina
KCl	Cloreto de potássio
kg	quilograma
LIM	Laboratório de Investigação Médica
mL	mililitro, equivalente a um milésimo de litro
mm	milímetros
µm	micrometro
%	porcentagem, por cento
Pvd	Prega vocal direita
Pve	Prega vocal esquerda
PVP-I	Polivinilpirrolidona-iodo
V	volt
W	watt

Carneiro, C.G. *Avaliação da deposição do colágeno após enxerto de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho – estudo histomorfométric*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 89p.

Vários materiais têm sido injetados ou inseridos nas pregas vocais na tentativa de solucionar a incompetência ou insuficiência glótica. Contudo, poucos são os estudos que avaliam o processo cicatricial decorrente da enxertia destes materiais. O objetivo desta pesquisa foi quantificar e comparar as fibras colágenas no músculo vocal das laringes dos coelhos que foram submetidos a enxerto unilateral de gordura ou fásia muscular com a prega vocal contra-lateral, que foi submetida ao mesmo procedimento, com exceção da enxertia. Estudamos 24 coelhos, divididos em dois grupos com 12 coelhos em cada um. No primeiro grupo, denominado F (Fásia), os coelhos foram submetidos à inserção de enxerto de fásia lata autóloga na prega vocal direita. No outro grupo, denominado G (Gordura), os coelhos foram submetidos a implante de gordura autóloga “em bloco” também na prega vocal direita. Todos os coelhos foram também submetidos ao mesmo procedimento na prega vocal esquerda, com exceção da colocação do enxerto. A prega vocal esquerda, desta forma, constituiu o “controle” para cada coelho. Metade dos coelhos, de cada um dos grupos (F e G), foi sacrificada após 90 dias do procedimento cirúrgico. A outra metade dos coelhos dos grupos G e F foi sacrificada após 180 dias do procedimento cirúrgico. As laringes foram removidas e as pregas vocais, direita e esquerda, foram preparadas histologicamente. Os cortes corados pelo método da picrossírius-polarização foram utilizados para a visualização e análise das fibras colágenas. O colágeno foi analisado morfometricamente através do método da Picrossírius-polarização com a utilização do software Image Pro Plus. Houve aumento do colágeno em todos grupos enxertados quando comparados com o grupo controle. A concentração do colágeno encontrada nos coelhos submetidos a enxerto de gordura foi significativamente maior quando comparados à concentração do colágeno nos coelhos submetidos a enxerto de fásia muscular, tanto com 90 quanto com 180 dias. A enxertia de gordura e fásia lata na prega vocal de coelho promoveu maior deposição de colágeno do que no grupo controle, sendo mais exuberante na inserção de gordura.

**Palavras-chave:** LARINGE/anatomia & histologia; COELHO/cirurgia; TRANSPLANTE AUTÓLOGO/efeitos adversos.

Carneiro, C.G. *Avaliação da deposição do colágeno após enxerto de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho – estudo histomorfológico*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 89pp

Several materials have been injected or inserted in the vocal fold, in attempt to solve glottic insufficiency. Nevertheless, there is just a few papers that evaluates the inflammatory process resulted from these materials incorporation. The objective of this study was to quantify and compare the collagen fibers in the vocal muscle of the larynx from the rabbits in which unilateral fat and muscular fascia were introduced, to the contralateral vocal fold, in which the same procedure have taken place, except be the grafting. Twenty four rabbits were used in this study, divided into two groups, 12 rabbits each. In the first group, named F (from Fascia), the rabbits underwent the insertion of fascia lata into the right vocal fold. In the other group, named G (from Grease), the rabbits underwent implantation of autologous fat “en bloc” in the right vocal fold, as well. All rabbits have undergone the same procedure in the left vocal fold, except for the graft insertion. The left vocal fold, therefore, formed the control group for each rabbit. Half the rabbits, from each group (F and G), was sacrificed after 90 days, while the other half was sacrificed after 180 days from the surgical procedure. The larynxes were removed and the vocal folds, right and left, were prepared for histology, using the method of picosirius-polarization for the coloration. The collagen fibers in the samples were analyzed using a computer software called Image Pro Plus. An increasing of the collagen was found in all the groups in which grafts have been placed, when compared to the control group. The collagen density found in those rabbits which underwent fat insertion was significantly higher than in those with muscular fascia insertion, for both periods of 90 and 180 days, as well. Fat and muscular fascia insertion in rabbits vocal fold resulted in a higher collagen deposition, when compared to the control group, being more abundant when fat was inserted.

**Key-words:** LARINX/anatomy & histology; RABBIT/surgery; AUTOLOGOUS TRANSPLANT/adverse effects.

## **Normas de publicação**

### ***Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology***

#### **INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

##### **SUBMISSION**

Send manuscripts to Richard J. H. Smith, MD, Editor, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, The University of Iowa Hospitals and Clinics, 200 Hawkins Dr, Iowa City, IA 52242. Original manuscripts dealing with clinical or scientific aspects of otolaryngology, 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

**Different patterns of fibrosis resulted from fascia and fat  
implantation into rabbit vocal folds**

Christiano de Giacomo Carneiro\*

Luiz Ubirajara Sennes\*

João Aragão Ximenes Filho\*

Paulo Hilário Nascimento Saldiva\*

Domingos Hiroshi Tsuji\*

\*Otolaryngology and Pathology Department of The University of São Paulo, Brazil

Address correspondence to:

Alameda Ministro Rocha Azevedo 644/144

01410-000 SÃO PAULO, S.P. - BRASIL

E-mail: christianocarneiro@terra.com.br

## **Abstract**

Several materials have been implanted into vocal folds as an attempt to solve glottal incompetence. However, there are a few studies that evaluate the scarring process resulting from the introduction of these materials. The aim of this study was to quantify the collagenous fibers formed in response to fascia and fat implantation rabbit vocal folds.

Twenty four rabbits, divided into four groups, underwent implantation of muscular fascia or fat into the right vocal fold, while the left one was used as a control group, in which the very same procedure was accomplished, except for the graft. The rabbits were sacrificed 90 and 180 days after the surgical procedure. Picosirius-polarization method was used for the analysis of the collagenous fibers, which were quantified using the Image Pro Plus software. An increase of collagen in all grafted groups was observed, when comparing them to the control group. When fat was implanted, the collagen concentration appeared to be greater than when fascia was used, for 90 and 180 days. This study suggests that muscular fascia represents a better option for vocal fold augmentation than fat.

**Key-words:** LARINGX/anatomy and histology; RABBIT/surgery; AUTOLOGOUS TRANSPLANTS/effects.



## INTRODUCTION

Glottic incompetence is one cause of dysphonia and can be related to: vocal fold mobility alterations, scars, atrophies or bowing. Among these causes, the scar or fibrosis may lead to greatest vocal impact with lack of effective treatments<sup>3</sup>.

Several synthetic or biological grafts were used in attempt of restoring the body-covering relationship of the vocal fold when the lamina propria is compromised, as Teflon<sup>®</sup> and Gelfoam<sup>®</sup><sup>6,8</sup>. More recently collagen<sup>1,9,10</sup> grafts were also used, however their high cost and reabsorption rates restricted its use.

Autologous grafts as fat and muscular fascia have been showing promising results and their safety encourage its use<sup>7</sup>.

There are several studies<sup>14,15,16,17,18</sup> about graft distribution, inflammatory process, type and cellular quantification, however there are few information about the scarring tissue generated after grafting<sup>19</sup>.

The objective of this research is to describe, compare and quantify the collagen deposition due to grafting of muscular fascia and fat into the vocal fold of rabbits, comparing with the control groups using picrosirius-polarization method.

## MATERIAL AND METHODS

Twenty-four white New Zealand male rabbits, healthy, weighing between 2.5 and 3.5kg were used. All rabbits underwent the same micro-surgery in both vocal folds. Fat was implanted in 12 rabbits (group G), while autologous muscular fascia graft was used in 12 (group F). The animals were sacrificed at 90 days after the

surgery (groups G1 and F1), and 180 days (groups G2 and F2). The left vocal fold in each animal was used as a control group for each animal (groups C1 and C2).

The fat graft was harvested from the cervical subcutaneous and the muscular fascia was harvested from antero-lateral area of the hip. After approaching the larynx through a longitudinal cervical incision, laringofissure was performed and the vocal folds were exposed. Using a surgical microscope, an 1.0mm incision accomplished in superior face up to 0.5mm of the free border of the vocal folds. Meticulous dissection was performed between the mucous membrane and the muscle with an elevator, creating a pocket to receive the graft. The 3x1mm graft was placed into the pocket of the right vocal fold. The left vocal fold was not grafted.

After rabbits' sacrifice, the larynx and the vocal folds were removed. The medium third of the folds measuring 5x5mm were fastened in formaline 10% and included in paraffin. Transverse slices were performed with microtome (3 $\mu$ m thick). The histologic sections were stained with Sirius Red and the analysis under light microscope using optical polarization, and a descriptive analysis of the six groups was performed, especially on the presence of graft and the collagen distribution in relationship with the adjacent muscular structure.

Morphometric study was also accomplished and the quantification of the collagenous fibers made through a digital system of images analysis (Image Pro Plus 4.0 Software), determining the concentration of the collagen fibers.

After gauging of the normal distribution of the data (Kolmogorov-Smirnov test), the groups were compared between themselves (Wald Wolfowitz Runs test).

## RESULTS

Collagen deposited on the vocal folds that received muscular fascia grafts (Groups F1 and F2) presented a spindle-shape aspect (Figures 1 and 2) while those which received fat grafts (Groups G1 and G2) presented a net aspect with thick collagen involving the fat blocks (Figures 3 and 4).

There was an increase of the collagen concentration per area in the grafted groups when compared with the control groups ( $p < 0.001$ ).

The collagen concentration was most observed in the group G when compared with the group F during the analysis at 90 days follow-up ( $p < 0.001$ ), and at 180 days follow-up ( $p < 0.001$ ) (Graphs 1 and 2).

## DISCUSSION

The picosirius-polarization method has contributed significantly to the identification of the collagenous fibers and to understanding its functions. The specificity of the method is based on the presence of basic amino-acids into the collagenous molecules that react strongly with the coloring acid (Sírius-Red)<sup>20,21</sup>.

When comparing the concentrations of collagen presented in the grafted groups, it is observed that there was a larger deposition of a peri-graft collagen in that groups submitted to fat implantation, after three months, as well as after six months. This fact suggests that the fat is metabolically more active than fascia and needs to be locally more vascularized<sup>13</sup>, stimulating the inflammatory process and consequently a larger deposition of scar collagen. This collagen is the main

component of the fibrotic scar tissue, remarkably responsible for the adherence of the lamina propria layers, and stiffness of the vocal fold. It differs physiologically from the exogenous collagen<sup>9,10</sup> originated from the grafting or injection, because it do not present primary biological adherence action, fixation, contraction and mobilization of the cicatricial boards<sup>22</sup>. On the other hand, the endogenous collagen, produced at the inflammatory bed by fibroblasts and miofibroblasts, acts as cicatricial cement, reducing the dead space of the wound through their adherence properties, fixation and contraction, phenomenon known as scar fibrosis<sup>5</sup>. Such fibrosis is formed by Type I (80%) and Type III (20%) collagen<sup>22</sup>. Therefore, this study also suggests that muscular fascia grafts placed into vocal folds are preferable to fat ones. This can be justified as fat grafts cause a lower fibrotic reaction, and consequently result in a better vibratory pattern of the vocal fold, in relation to the scar collagen. However, the fat and the fascia tissue reologic properties cannot be forgotten. Fat viscosity characteristics are similar to that human lamina propria superficial layer<sup>12</sup>, and therefore it would be a better substitute for a deficient lamina propria.

The presence of an abnormal arrangement of the collagenous fibers characterizes the development of a scar or fibrosis<sup>3</sup>. In the present study the collagenous disarrangement was frequent in the presence of grafts. This alteration was much more evident in the groups submitted to fat graft, characterized by thick "in net" collagen involving the fat blocks. In the groups F1 and F2 (fascia graft), the distribution was fusiform, less dense and parallel to the incision line of the vocal fold and graft placement. In the control group no alteration of the collagen deposition on the lamina propria and muscle was found.

During the vibration of the vocal fold, the longitudinal distribution of the collagen and the fascia graft should help the mucus-ondulatory movement, which promotes its displacement as unique and fusiform block. However, the fat pattern, with multiple blocks wrapped up with a net of collagen with disoriented fibers (transverse and oblique), can harm the regularity of that movement. Studies comparing the vocal folds vibratory pattern when implanted with fascia and fat are warranted to clarify the impact of the inflammatory reaction and collagen in the mucus-ondulatory movement.

There are several articles in literature that emphasize the resulting inflammatory process to vocal implantation. Normal phonation happens in agreement with some parameters as: glottic area without transglottic air flow (Ag0), subglottic pressure, stiffness of the vocal folds, and coaption between the superior and inferior part of the borders of the vocal fold<sup>23</sup>. Although, factors that change the lamina propria viscoelastic properties, especially its superficial layer, also notably modify the vibratory behavior of the vocal fold itself<sup>1</sup>. In the literature there are some clinical studies, in patients with alterations of the lamina propria, describing vocal folds vibratory patterns improvement after fat<sup>19</sup> and muscular fascia<sup>15</sup> grafting. Therefore, it is probable that the cicatricial damage in the lamina propria, after the grafting, has a smaller impact under the mucus-ondulatory movement than the improvement achieved by glottic closing caused by Ag0 decrease due to the reduction of the graft.

In histological and reologic study of scar produced in the lamina propria after surgical manipulation, found that the collagen, with small density and tissue disorganization causes modification in its reologic properties<sup>24</sup>. In the present study,

a larger density of collagen, as well its tissue disorganization was observed in the grafted groups when compared to the control group. Studies that can compare the reologic properties of the vocal folds (within normal situation, after a exclusive surgical manipulation and after surgical manipulation and enxertia), can elucidate the impact of the distribution pattern of the collagen and the graft on the vocal folds vibration.

## **CONCLUSION**

The study allows concluding that fat and fascia lata enxertia into the vocal pleat of rabbit promoted larger deposition of collagen than in the control group, being more exuberant when fat is inserted. Alteration in the distribution of the collagenic fibers, after fascia and fat graft, was observed, also more altered in the fat group.

## REFERENCES

1. Ford CN, Bless DM. Clinical experience with injectable collagen for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 1986; 96:863-869.
2. Benninger MS, Crumley RL, Ford CN, Gould WJ, Hanson DG, Ossoff RH, Sataloff RT. Evaluation and treatment of the unilateral paralyzed vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111:497-598.
3. Kriesel KJ, Thibealt SL, Vangroll PJ, Chan RW, Bless DM, Suzuki T, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111:884-889.
4. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4<sup>ed</sup>. Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1991.
5. Peacock EE. *Wound Repair*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1984.
6. Rubin HJ. Misadventure with injectable polytetrafluoroethylene (Teflon). *Arch Otolaryngol* 1975; 101:238-246.
7. Rosen CA. Phonosurgical vocal fold injection: indications and techniques. *Operat Techniq Otolaryngology Head Neck Surg* 1998; 9:203-209.
8. Schramm VL, May M, Lavorato AS. Gelfoam paste injections for vocal fold paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence. *Laryngoscope* 1978; 88: 1268-1273.
9. Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: A Preliminary Clinical Study. *Laryngoscope* 1995; 105:944-948.

10. Courey MS. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 2001; 111:747-758.
11. Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Laryngol* 1996; 105:602-606.
12. Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope* 1998; 108:725-731
13. Boyce RG, Nuss DW, Kluka EA. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am* 1994, 27:39-68.
14. Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long-term results of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Laryngol* 1995; 104:871-874.
15. Reijonen P, Leivo I, Nevalainen T, Rihkanen H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2001; 111:1068-1074.
16. Rihkanen H, Soderlund-Lehikoinen, S, Reijonen P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope* 1999; 109:1854-1857.
17. Imamura R, Sennes LU, Chung D, Bohadana S, Tsuji DH. Injeção de gordura na prega vocal: efeitos do local de injeção sobre a configuração glótica e a distribuição espacial da gordura injetada. *Rev Bras Otolaringol* 2003; 69:445-450.
18. 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.



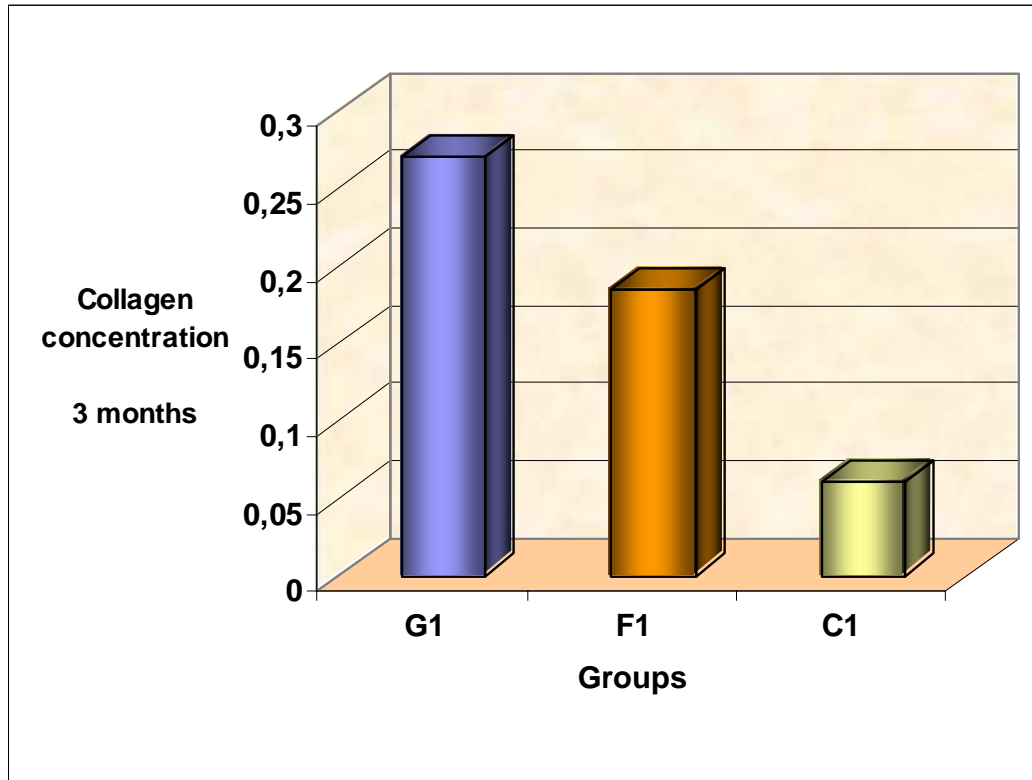
19. Duprat AC, Costa HO, Eckley CA, Pupo DB, Rossi HH. Implante de gordura no espaço de Reinke para correção de alterações histoestruturais das pregas vocais. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2001; 67:78-83.
20. Montes GS, Junqueira LCU. The use of picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(suppl III):1-11.
21. Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003, Dec;113(12):2187-91.
22. Mélega, J.M., Freitas, A.G. *Biologia da Cicatrização*. In: *Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte. Princípios Gerais*. 1 ed. Medsi, Rio de Janeiro, 2002.
23. Isshiki N, Tsuji DH, Sennes LU. *Tireoplastias*. 1.ed. São Paulo: Bioscience, 1999.
24. Thibealt SL, Gray SD, Bless DM, Chan, RW, Ford CN. Histologic and reologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002, 16:96-104.

**Table 1.** Collagen concentration in the studied groups

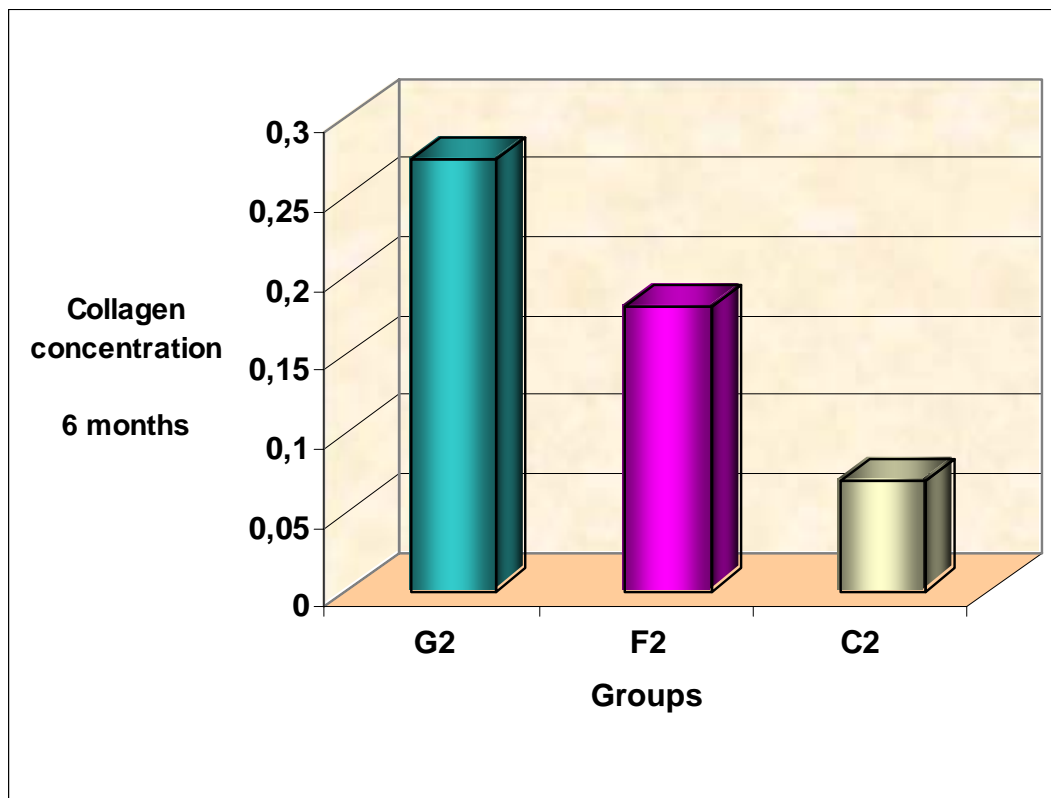
	<b>Groups</b>							
	<b>G1</b>		<b>G2</b>		<b>F1</b>		<b>F2</b>	
	<b>Fold</b>							
	<b>RVF</b>	<b>LVF</b>	<b>RVF</b>	<b>LVF</b>	<b>RVF</b>	<b>LVF</b>	<b>RVF</b>	<b>LVF</b>
Mean	0.363	0.066	0.273	0.061	0.185	0.074	0.174	0.067
Standard deviation	0.021	0.004	0.018	0.001	0.007	0.005	0.007	0.004

RVF Right vocal fold; LVF: Left vocal fold

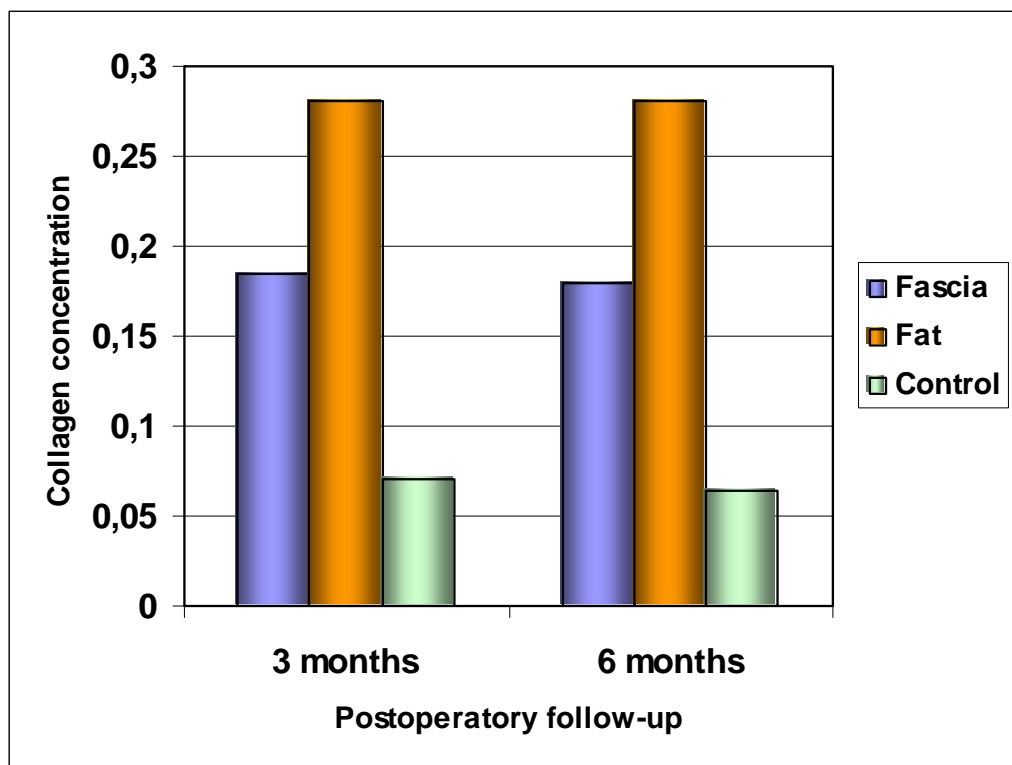
**Graph 1:** Comparison of collagen concentration for groups G1, F1 and Control, after 3 months of the surgery. Higher concentration was observed in the group grafted with fat ( $p < 0,001$ ).



**Graph 2:** Comparison of collagen concentration for groups G1, F1 and Control, after 6 months of the surgery. Higher concentration was observed in the group grafted with fat ( $p < 0,001$ ).



**Graph 3:** Comparison of collagen concentration at 3 months and 6 months of the surgery, showing that no significant statistical alteration in the groups was observed ( $p < 0,001$ ).



## 1 INTRODUÇÃO

Uma das alterações mais complexas que acometem as pregas vocais é a incompetência ou insuficiência glótica. Pode ser causada por alterações de mobilidade, fibroses, atrofias ou arqueamento das pregas vocais, e pode levar, entre outras situações como aspiração e tosse pouco efetiva, a graus variados de disфонia (Benninger et al., 1994). Entre as causas citadas, a cicatriz ou fibrose talvez seja a que mais se caracteriza pelo impacto social negativo e pela carência de tratamentos efetivos (Kriesel et al., 2002).

A partir do início do século 20, surgiram vários procedimentos cirúrgicos para a reabilitação da competência aerodinâmica e valvular da glote, por meio da injeção de substâncias heterólogas no espaço paraglótico (Zeitels, 2003). O primeiro material a ser usado foi a parafina, que seria brevemente abandonada em virtude das reações de corpo estranho.

O procedimento foi deixado de lado até que Arnold (1962), na década de 60, retomou a técnica ao injetar Teflon<sup>®</sup>. Os resultados iniciais foram extremamente animadores, porém as reações de corpo estranho, fibrose, formação de granuloma e a possibilidade de extrusão inviabilizaram a manutenção do procedimento. Outro material heterólogo usado é o Gelfoam<sup>®</sup> e que pela sua longevidade limitada, tem seu

uso restrito em tratamentos definitivos (Schramm et al., 1978). Os implantes biológicos, desta maneira, obtiveram seu espaço..

Segundo Ford et al. (1992), o colágeno bovino, por ser histologicamente similar à camada profunda da lâmina própria, permitiria melhor integração com o hospedeiro. Estudos ainda mais recentes propõem o uso do colágeno humano. As vantagens principais seriam durabilidade maior e a eliminação do risco de resposta imunológica. Inicialmente Ford et al. (1995) e posteriormente Remacle et al. (1999) utilizaram o colágeno autólogo, ou seja, retirado do mesmo indivíduo a ser implantado, 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.

Outros enxertos autólogos, como a gordura e a fáscia muscular, mostraram resultados promissores, com boa segurança e riscos mínimos de reações indesejadas. A gordura foi utilizada pela primeira vez na cirurgia reparadora, em 1893, por Neuber<sup>1</sup> apud Boyce et al. (1994), para correção da órbita após osteíte tuberculosa. Na prega vocal, foi utilizada experimentalmente em cães por Hill et al. (1991). Em 1992, Mikaelian et al. foram os pioneiros a utilizá-la no tratamento de paralisia unilateral em humanos.

A longevidade do enxerto gorduroso, entretanto, é variável (Shindo et al., 1996; Saccogna et al., 1997) dependendo de alguns fatores como: tamanho e grau de

---

<sup>1</sup> Neuber G. Fet transplantation. Chir Kongr Verhandl Dtsch Gesellsh Chir v. 22, p. 66, 1893.

manipulação do enxerto e da região anatômica de coleta e de implantação (Boyce et al., 1994).

A primeira utilização de fáschia muscular é atribuída a Bruns<sup>2</sup> apud Boyce et al. (1994) que, em 1905, corrigiu um prolapso retal usando fáschia lata. Na prega vocal, foi injetada lateralmente ao músculo vocal por Rhikanen (1998) e inserida na camada superficial da lâmina própria por Tsunoda et al. (1999). Segundo Boyce et al. (1994), apresenta as vantagens de ser um tecido delicado, composto por fibroblastos e colágeno, e que suporta tensão. A desvantagem principal é a sua mal-adaptação para preencher espaços tridimensionais como as pregas vocais.

A utilização da gordura e da fáschia muscular, na correção da incompetência glótica, tem sido estudada com relação à distribuição do enxerto (Imamura et al., 2003), do processo inflamatório (Bauer et al., 1995; Reijonen et al., 2001), e da melhora na qualidade vocal em estudos clínicos (Rhikanen et al., 1999; Duke et al., 2001; Duprat et al., 2001;). São raros, no entanto, os estudos do tecido fibrótico gerado após o enxerto desses materiais.

Os componentes principais do tecido cicatricial são os fibroblastos e o colágeno. Após a instalação do dano tecidual, a síntese do colágeno pelos fibroblastos inicia-se logo no terceiro dia e atinge seu pico máximo entre três e seis semanas, e segue-se um período de remodelação (Robbins, 1991). O colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, e é substituído pelo tipo I, à medida que

---

<sup>2</sup> Bruns. *Zur technik der operative heilung grosser bauchbruche and mastdarmprolapse*. Bruns Beitr. V. 77, p. 257, 1905. Cited by Peer L. A. *Transplantation of tissue*, v. 1. *Transplantation of fascia in humans*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1959, p. 258-276.



ocorre a maturação do tecido cicatricial (Peacock, 1984). Segundo Hom (1994), a presença de um enxerto pode alterar as fases da cicatrização normal por causa do estímulo inflamatório prolongado.

Ao considerar a necessidade de enxertia para a correção da insuficiência glótica e o impacto do tecido cicatricial, gerado na vibração das pregas vocais, este estudo foi idealizado com os objetivos seguintes:

1. Descrever a distribuição das fibras colágenas após enxerto microcirúrgico de gordura e de fáscia muscular na prega vocal de coelhos pelo método da Picrossírius-polarização.
2. Quantificar e comparar as fibras colágenas no músculo vocal das laringes dos coelhos que foram submetidos a enxerto unilateral de gordura ou fáscia muscular com a prega vocal contra-lateral, que foi submetida ao mesmo procedimento, com exceção da enxertia.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Uso de animais para estudos experimentais em laringologia**

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).

Inúmeros animais são utilizados em estudos experimentais em laringologia. Garret et al. (2000) avaliaram a histologia e os padrões vibratórios da prega vocal de porco, cachorro, macaco. Foi encontrado diferença entre a distribuição de colágeno e elastina entre os grupos e, segundo os autores, o cachorro foi o animal que mais se aproxima do ideal por apresentar a vibração das pregas vocais similar à dos humanos.

De acordo com Kurita et al. (1995), a prega vocal do coelho apresenta sua porção membranosa com aproximadamente quatro milímetros de comprimento. A mucosa apresenta 0,3 mm de espessura. 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 existe estrutura comparável ao cone elástico.

Segundo Harlow e Lane (1988), o coelho é um animal bastante utilizado em estudos imunológicos

## **2.2 Processo cicatricial**

As fases de resposta à agressão tecidual podem ser divididas em quatro: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Peacock, 1984; Robbins, 1991; Adzick, 1997; Glat, Longaker, 1997; Mélega, 2002).

A hemostasia compreende a vaso-constricção imediata, seguida por uma vasodilatação prolongada, com duração de minutos. Os componentes sanguíneos invadem o sítio manipulado e a cascata da coagulação é ativada. As plaquetas liberam mediadores (fatores de crescimento derivado das plaquetas, fator de crescimento do fibroblasto e fator de crescimento beta).

A fase inflamatória ocorre até três dias após a enxertia. Conforme a inflamação prossegue, existe 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, levam ao aumento do número de fibroblastos e de células endoteliais, e promovem a formação de granulação e formação de tecido.

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. O colágeno é uma proteína fibrosa, secretada por células do tecido conjuntivo, bem como por outros tipos celulares. São as proteínas mais abundantes do corpo humano, e constituem 25% do total da massa protéica nesses animais.

De acordo com Hom (1994), a presença de um enxerto prolonga as fases inflamatória e proliferativa por causa do estímulo antigênico contínuo. Os neutrófilos ao redor do enxerto promovem a degradação do mesmo. O produto desta degeneração, ativa os sistemas do complemento e imune. Os histiócitos aproximam-se da periferia do enxerto, liberam quimiotáticos e induzem a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e colagenase, que degradam o colágeno do tecido ao redor do enxerto.

### **2.3 Cicatriz na prega vocal**

Kriesel et al. (2002), em estudo experimental, injetaram colágeno homólogo na prega vocal de coelhos após cicatriz induzida previamente. Apesar do colágeno injetado não ter causado reação inflamatória exuberante, os autores não observaram

melhora nos padrões reológicos, sugerindo que o colágeno injetado pode ser usado para a medialização das pregas vocais, porém não apresentou melhora nas propriedades dinâmicas das pregas vocais.

Thibealt et al. (2002) estudaram histologicamente a lâmina própria de coelhos após cicatriz provocada. Houve diminuição do colágeno e uma desorganização tecidual. No mesmo estudo avaliaram as propriedades reológicas e encontraram aumento na rigidez. Os autores atribuem este fato à presença de um colágeno cicatricial e desorganizado.

#### **2.4 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, e as laringes foram 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.

Mikus et al. (1995) compararam a injeção de gordura na prega vocal de cães por meio de 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 foi observada diferença significativa entre os grupos. Ao compararem o rendimento do tecido enxertado, notaram que a técnica de lipossucção promoveu menores taxas de absorção.

Zaretsky et al. (1995) avaliaram a prega vocal de cães após injetar gordura, retirada da região supra-clavicular. 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, mas em menor quantidade no grupo dos seis meses.

Saccogna et al. (1997) utilizaram seis gatos domésticos para avaliar a injeção de gordura na prega vocal paralisada pós-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 seis semanas após o procedimento e também após quatro, seis, oito e 12 meses. Foi sacrificado um animal por grupo, exceto aos seis meses em 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 significativo 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 das pregas vocais.

Woo et al. (1999) realizaram estudo com laringe de cão, com implante de gordura autóloga mediante micro-cirurgia de laringe e sacrifício do animal após seis semanas. Os autores constataram a presença de células adiposas viáveis após este período, além de demonstrar um aumento no espaço de Reinke em comparação com a prega vocal contra-lateral.

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; 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.

## **2.5 Enxerto de gordura nas pregas vocais – estudos clínicos**

Sataloff et al (1997) estudaram quatro pacientes com cicatriz de prega vocal secundária submetida à manipulação cirúrgica prévia e que receberam implante de gordura. Os autores descrevem a criação de uma bolsa no espaço de Reinke seguida do preenchimento de gordura injetada com seringa de Bruning. Com auxílio da laringostroboscopia, os autores observaram melhora nos padrões vibratórios.

Duprat et al. (2001) relatam sua experiência com o uso da gordura no manejo de 11 pacientes com insuficiência glótica causada por sulco, cisto aberto e cicatriz pós-operatória. Observaram 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 micro-laringoscopia.

## **2.6 Enxerto de fásia muscular em prega vocal – estudos experimentais**

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 seguidos 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 realizada a laringectomia seguida 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 doze meses após a 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 e de fásia muscular nas pregas vocais. A gordura, previamente purificada, foi injetada em uma das pregas vocais e a fásia muscular picada na prega vocal contralateral. No presente estudo, não houve diferença estatística ao comparar a resposta inflamatória e o rendimento final entre os enxertos (gordura e fásia) ao final de 12 semanas.

## **2.7 Enxerto de fásia muscular em prega vocal – estudos clínicos**

Rihkanen (1998) foi pioneiro em 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 do autor-

Rihkanen et al. (1999) - avaliou dezoito pacientes com diagnóstico de paralisia unilateral de prega vocal de etiologia e duração variáveis. Dos 18 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 com auxílio do bisturi. A injeção foi feita sob micro-laringoscopia direta, com seringa de pressão, em três ou quatro pontos, de modo 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 nove meses e 29 dias. Os autores relatam que ocorreu melhora significativa nos níveis de *jitter*, *shirmer* e tempo máximo de fonação.

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” por 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 desta técnica proposta para 15 pacientes foram estudados e publicados pelo mesmo grupo (Tsunoda et al., 2001). Após o acompanhamento médio de um ano, ocorreu melhora gradual no tempo máximo de

fonação a partir do terceiro mês. Os autores ainda referem melhora do fechamento glótico e da onda mucosa.

## **2.8 Identificação histoquímica do colágeno pelo Método da Picrossírius-polarização**

O método da picrossírius-polarização consiste na coloração do tecido com Sírius Red e na análise das lâminas sob microscopia de luz, por meio da polarização óptica. Permite a localização e caracterização das fibras de colágeno nos tecidos, além de fornecer boa correlação entre as observações morfológicas e histoquímicas. É um método simples, confiável, específico e barato (Montes, Junqueira, 1991).

Sweat et al. (1964) foram os pioneiros na aplicação do corante Sírius Red F3BA para o estudo do colágeno, e este é utilizado desde então por diversos pesquisadores como Saldiva et al. (1989).

Junqueira et al. (1979) propõem o uso associado da microscopia de polarização. Os autores contribuíram significativamente para o estudo da biologia do colágeno. Este método foi utilizado em outros estudos para quantificar o colágeno em tecidos normais (Montes et al., 1985; Lemos et al., 1997) e também em modelos patológicos (Mauad et al., 1996).

A especificidade desse método fundamenta-se no fato das moléculas do colágeno serem ricas em aminoácidos básicos que reagem fortemente com o Sírius

Red, que é um corante ácido. Esta reação promove o aumento da birrefringência normal, que é específico das estruturas colagenosas, compostas por moléculas orientadas. Isso ocorre porque as moléculas do corante ficam alinhadas em paralelo com o eixo longo da cada molécula do colágeno. Apesar deste corante ligar-se inespecificamente aos componentes de caráter catiônico dos tecidos, o fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. Assim, o método da coloração com o Picrossírius associado à microscopia de polarização é um método específico para a detecção de estruturas compostas de colágeno orientadas (Junqueira et al, 1979).

Um fato amplamente conhecido é a diferença entre os padrões de agregação física dos colágenos tipos I, II e III (Montes, Junqueira, 1982; Hammond et al., 1997), o que repercute na diferença de cores e intensidade de birrefringência dos colágenos em um mesmo corte histológico (Junqueira et al., 1978). O colágeno tipo I é o principal componente das fibras grossas (fibras colágenas), compostas por fibrilas grossas densamente agrupadas e que conseqüentemente apresentam uma birrefringência intensa com coloração amarela ou avermelhada. O tipo III é o componente colagênico principal das fibras finas (fibras reticulares), compostas por fibras finas, frouxamente dispostas, que mostram birrefringência fraca de coloração esverdeada. O colágeno tipo II não forma fibras e, suas fibrilas muito finas estão dispostas em uma rede frouxa que interage fortemente com as glicosaminoglicanas. Esse tipo de interação física resulta em uma birrefringência fraca e coloração variável, ambas dependendo da interação das moléculas de colágeno com as glicosaminoglicanas (Melo, 2004).

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

Após a aprovação da pesquisa pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa 200/02) – anexo A -, foram estudados 35 coelhos albinos da raça New Zealand, todos sadios e do sexo masculino, com massa corporal entre 2500 g e 3500 g, submetidos a micro-cirurgia em ambas pregas vocais, com enxertia unilateral de gordura ou fáschia muscular autólogas.

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

Do total da amostra inicial restaram 24 animais: seis coelhos foram utilizados para o estudo piloto, ocorreram três perdas e dois coelhos foram excluídos por problemas técnicos durante a confecção das lâminas para estudo histológico. Estes 24 animais foram divididos em dois grupos, com 12 coelhos em cada um. No primeiro grupo denominado F (Fáschia), os coelhos foram submetidos à inserção de enxerto de fáschia lata autóloga na prega vocal direita. No outro grupo, denominado

G (Gordura), os coelhos foram submetidos a implante de gordura autóloga “em bloco” também na prega vocal direita. Todos os coelhos foram submetidos ao mesmo procedimento na prega vocal esquerda, com exceção da colocação do enxerto. A prega vocal esquerda, desta forma, constituiu o “controle” para cada coelho.

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 o biotério da Granja RG, localizado na cidade de Suzano, com supervisão de zootecnistas e veterinários onde permaneceram com cuidados diários de alimentação e submetidos a temperatura ambiente controlada até serem sacrificados com injeção endovenosa de 2,0 mL de cloreto de potássio (KCl) a 20%. Metade dos coelhos, de cada um dos grupos (F e G), foi sacrificada após 90 dias do procedimento cirúrgico, e as pregas vocais direitas dos mesmos formaram os **grupos Fáschia (F1) e Gordura (G1)** e as pregas vocais esquerdas o **grupo controle (C1)**. A outra metade dos coelhos dos grupos G e F foi sacrificada, após 180 dias do procedimento cirúrgico, e suas pregas vocais direitas formaram os **grupos Fáschia (F2) e Gordura (G2)** e as pregas vocais esquerdas o **grupo controle (C2)**.

### 3.3 Técnica cirúrgica

#### 3.3.1 Anestesia dos coelhos

Os animais foram anestesiados com Xilazina (5 mg/kg) associado a Quetamina (50 mg/kg) por via intramuscular. Foram mantidos em ventilação espontânea, sem necessidade de cânula traqueal, e fixos à mesa cirúrgica pelas quatro patas; as patas dianteiras foram mantidas ao longo do corpo. Mesmo durante a manipulação da laringe (laringofissura e seu fechamento), não foi necessário usar a cânula traqueal.

#### 3.3.2 Preparo do enxerto

##### 3.3.2.1 *Obtenção do enxerto de gordura*

Após a tricotomia e anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I tintura) a 10%, foi feita incisão na região cervical para acesso à laringe, expondo a gordura subcutânea e sendo removido um fragmento de 1x1cm da mesma. Este fragmento de gordura foi mantido em soro fisiológico a 0,9% sob uma cúpula em temperatura ambiente.

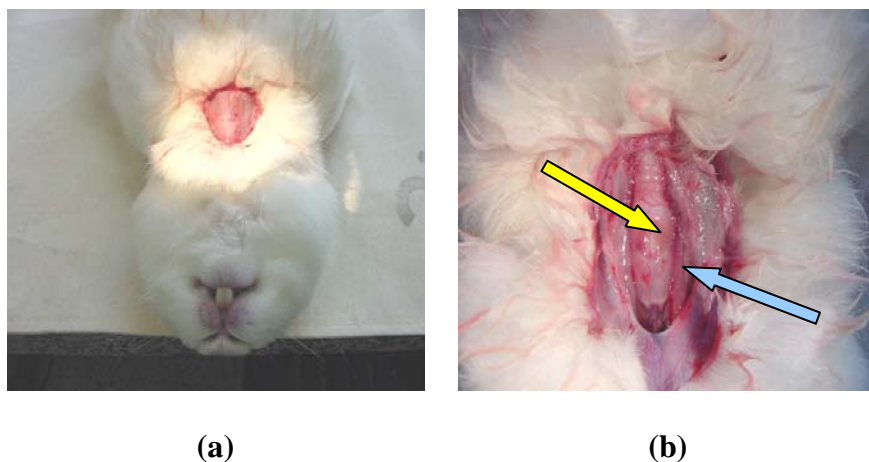
##### 3.3.2.2 *Obtenção do enxerto de fâscia lata*

Foram realizadas tricotomias nas faces anterior e lateral da coxa direita seguidas de anti-sepsia com PVP-I tintura a 10%. A incisão foi feita na pele da

região ântero-lateral da coxa, com 2 x 2 cm, seguido de hemostasia. A pele e o subcutâneo foram afastados para facilitar a exposição da fáscia muscular a qual foi dissecada delicadamente (1 x 1 cm). Ambos foram suturados com fio de Nylon 5-0. A fáscia removida foi imersa em soro fisiológico a 0,9%.

### 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 anti-sepsia com PVP-I tintura 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, com bisturi lâmina 15, na pele e subcutâneo, para expor as cartilagens tireóidea e cricóidea, como pode ser visto na Figura 1.



**Figura 1** - Imagens que mostram (a) incisão na pele e subcutâneo do coelho e identificação dos planos musculares; (b) identificação das cartilagens tireóidea (seta azul) e cricóidea (seta amarela)



Com o auxílio 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 V e 150 W), a membrana cricotireóidea foi incisada na linha média, com bisturi lâmina 15, que permitiu a visualização da subglote (Figura 2). A cartilagem tireóidea foi aberta anteriormente na linha média e permitiu a exposição das pregas vocais. Ambas pregas vocais foram submetidas à incisão longitudinal de 1 mm de extensão a 0,5 mm da borda livre. Realizou-se minucioso descolamento da mucosa ao longo da margem medial se estendendo também em direção inferior à sub-glote, com esculpador Holleback 3s, estilete empregado em odontologia (Figura 3). Dessa forma, foi confeccionado um bolsão na direção do eixo longitudinal da prega vocal, utilizando-se o músculo tireoaritenóideo como referência principal. Foi necessário todo cuidado no sentido de evitar a penetração do músculo tireoaritenóideo. O enxerto (fáscia muscular ou gordura), com aproximadamente 3 mm de diâmetro e 1mm de espessura (medidos com paquímetro, marca Factory), 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. A incisão da prega vocal não foi suturada. O fechamento da cartilagem tireóidea, da membrana cricotireóidea e da pele foi realizado com suturas de Nylon 5-0; com pontos separados. 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 100000UI, diluídas em 3 mL de água destilada, e aplicados 0,4 mL via intramuscular por dose. A primeira dose foi aplicada durante o procedimento, e duas outras, a cada 24 horas.



**Figura 2** – Imagens que mostram: (a) uso do microscópio; (b) manipulação microscópica da laringe que permite acessar as pregas vocais.



**Figura 3** – Esculpidor Holleback 3s usado em odontologia.

### 3.4 Isolamento da prega vocal

Após anestesia com Xilazina (50 mg/kg), os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de KCl. Foi realizada uma incisão cervical e retirada a laringe em um bloco que se estendia desde a base da língua até o quinto ou sexto anel traqueal. As peças foram dissecadas removendo-se as partes moles e isolando-se a laringe. A seguir, esta foi aberta, com incisão longitudinal posterior, entre as cartilagens aritenóideas. A cartilagem tireóidea, prega vocal e aritenóide de uma

hemilaringe foram ressecadas em bloco, entre o ventrículo laríngeo e a subglote. Por fim, foram isoladas as pregas vocais, direita e esquerda, entre a comissura anterior e o processo vocal da cartilagem aritenóidea..

### **3.5 Preparações histológicas**

Todas as peças medindo cerca de 0,5 x 0,5 cm foram fixadas em formalina a 10% e colocadas em cassetes próprios após identificação com o número do animal e origem anatômica da amostra (prega vocal direita – pvd, prega vocal esquerda – pve). Foram então encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para processamento. Neste laboratório foram desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas em xilol, impregnadas com parafina fundida em estufa a 60 °C, incluídas e a seguir cortadas com auxílio do micrótomo em lâminas com espessura de 3 µm. Os cortes iniciais foram sempre na porção média da porção membranosa da prega vocal. Em ambas pregas vocais, os cortes seriados foram realizados em direção à comissura anterior e ao processo vocal. Os cortes de tecido foram corados com hematoxilina eosina (HE).

O número de lâminas para cada animal foi variável. As lâminas das pregas vocais direitas foram preparadas de acordo com a identificação do enxerto presente nos cortes, enquanto que na prega vocal esquerda sempre foram confeccionadas três lâminas. As lâminas foram identificadas apenas com um código conforme a sua origem.

### **3.6 Análise histológica**

Os cortes corados pelo método da picrossírius-polarização foram utilizados para a visualização e análise das fibras colágenas. Este método consiste na coloração pelo Sírius-red dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. A análise das lâminas foi realizada sob microscopia de luz com polarização óptica.

Foi realizada análise descritiva dos quatro grupos, quanto a identificação do colágeno, bem como a distribuição do enxerto e sua relação à estrutura muscular adjacente ao enxerto.

### **3.7 Análise morfométrica**

Foi efetuado também estudo morfométrico com a quantificação das fibras colágenas (tipos I e III) com auxílio de um sistema digital de análise de imagens e o software Image Pro Plus versão 4.0 (for Windows, media Cybernetics S/N 41N4 1000-26671), e a concentração das mesmas por unidade de área medida. Foram analisadas amostras de ambas as pregas vocais para obtenção dos valores da concentração do colágeno.

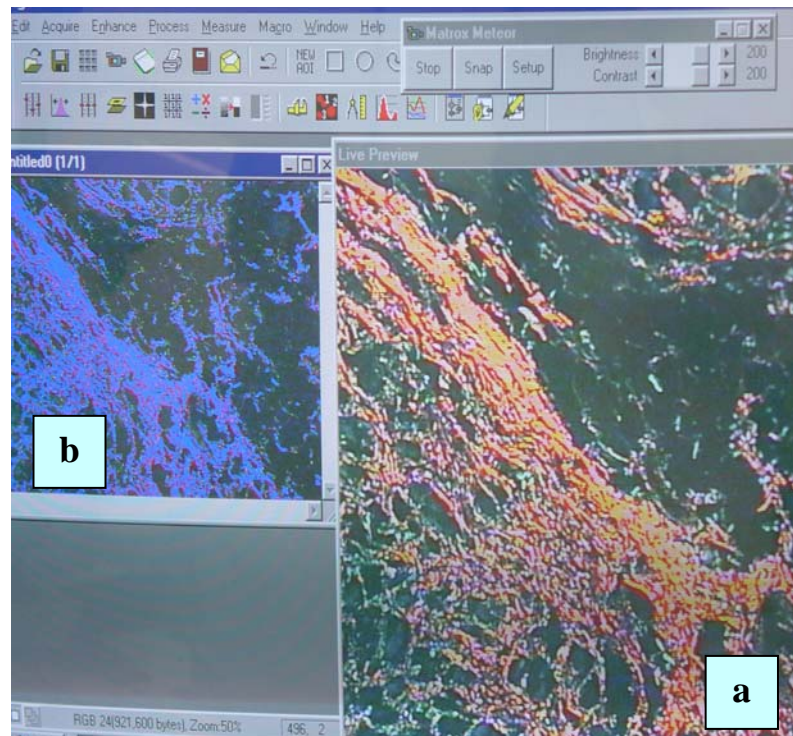
As medidas da concentração de fibras colágenas foram realizadas no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM / 05). O sistema

de análise (Figura 4) é composto por uma câmera digital (CCD Sony DCX-101), acoplada a um microscópio, que envia as imagens para um monitor (Trinitron, Sony).



**Figura 4** – Sistema de análise digital da imagem, composto por: (a) microscópio equipado com câmera de vídeo; e (b) acoplado a um monitor e a um computador com programa de análise de imagens.

O programa Image Pro Plus (Figura 5a e 5b) permitiu, por meio do estabelecimento prévio de um padrão de cores, criar um gradiente, a partir do qual o computador reconheceu o substrato em estudo (colágenos tipo I e III) e forneceu a área ocupada pelo mesmo.



**Figura 5** - Imagem capturada no monitor do sistema de análise digital: (a) a ser analisada; e, (b) cor (azul) estabelecida para identificar colágenos.

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.

Na prega vocal direita, todos os campos em que se visualizava o enxerto e sua região adjacente foram analisados tanto adjacente ao músculo quanto à lâmina própria. Sempre que foi possível, foram medidos até oito campos por lâmina, ou até terem sido esgotados os campos em que se identificava a presença do enxerto.

Na prega vocal esquerda foram analisados cinco campos entre a lâmina própria e o músculo. Nestas lâminas, sempre foi cinco o número de campos, ou seja, foi analisada toda a região entre a lâmina própria e o músculo.

Os dados morfométricos, obtidos para cada prega vocal analisada, foram tabulados separando-se os diversos grupos de estudo (F1, F2, G1 e G2) com o seu respectivo controle (C1 e C2).

### **3.8 Análise estatística**

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Obteve-se a distribuição normal em todas as variáveis estudadas. Foram utilizados a média e o desvio padrão como medidas de tendência central e dispersão, e empregado o teste de Wald Wolfowitz Runs Test (Snedocor, Cochran, 1989) na análise estatística dos atributos ao comparar os resultados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características dos coelhos

A massa média dos animais era de 2900 g (Tabela 1), e todos eram do mesmo sexo (masculino). Não ocorreram intercorrências com nenhum dos 24 coelhos incluídos neste estudo.

**Tabela 1** - Valores médios das massas corporais dos coelhos, enxertados com fásia ou com gordura, aos três e seis meses do pós-operatório.

Massa (g)	Fascia		Gordura	
	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
<b>Média ± dp*</b>	2916,7 ± 213,7	2933,3 ± 150,6	2800,0 ± 141,4	3033,3 ± 121,1
<b>Amplitude</b>	2700 - 3200	2800 - 3200	2600 - 3000	2900 - 3200

\* dp = desvio padrão

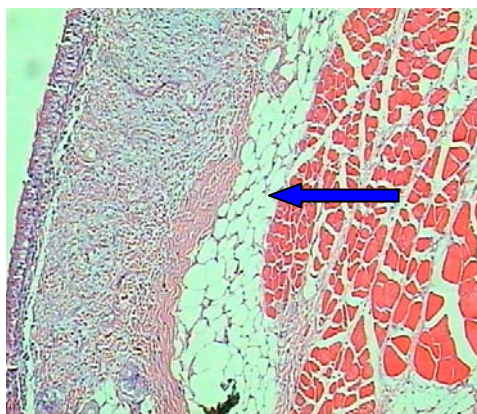
### 4.2 Identificação do enxerto

O enxerto, seja de gordura ou fásia, foi identificado em todos os animais em todos os grupos, na prega vocal direita (Figuras 6, 7, 8 e 9).

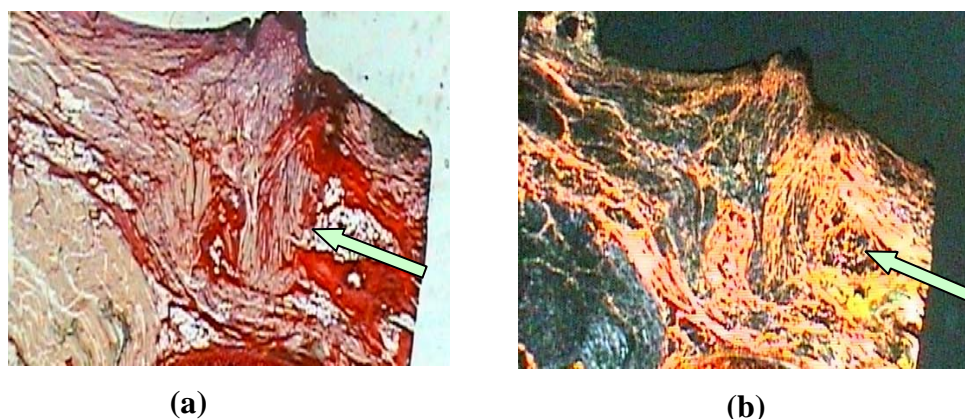




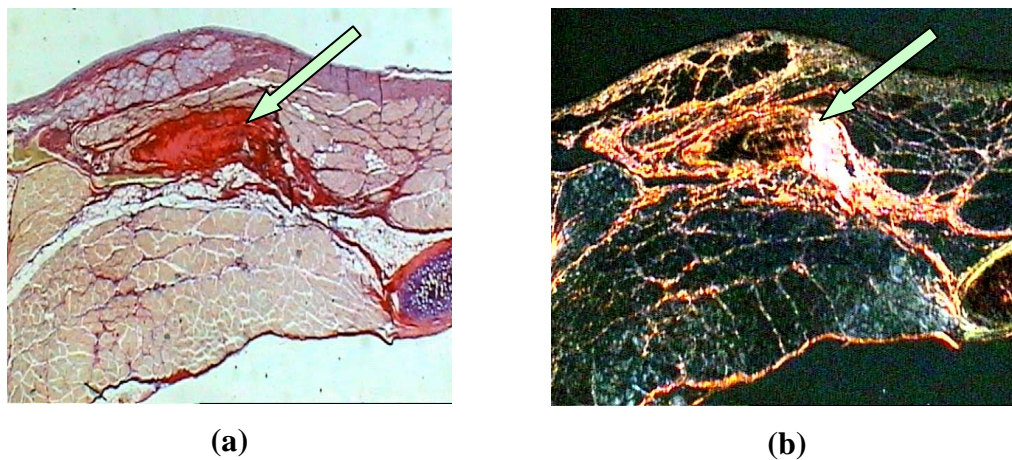
**Figura 6** – Fotomicrografia de corte histológico transversal da porção média da glote intermembranácea do coelho 11, corada com HE. A seta amarela mostra a presença da fásia muscular. Objetiva: 25x.



**Figura 7** – Fotomicrografia de corte histológico transversal da porção média da glote intermembranácea do coelho 6, corada com HE, objetiva: 25x. A seta azul mostra a presença da gordura



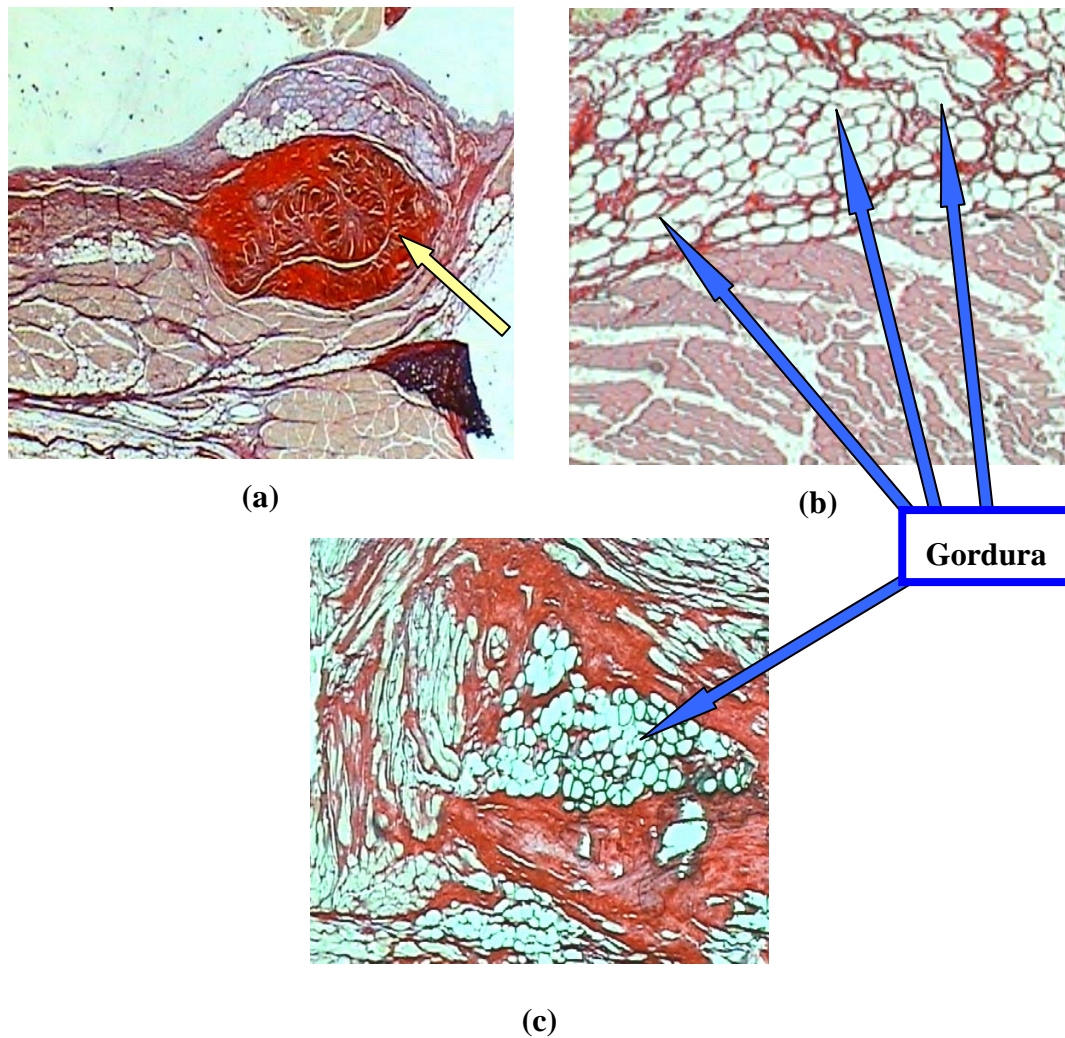
**Figura 8** - Fotomicrografia do corte histológico da porção intermembranosa do coelho 30, submetido a enxerto de gordura (setas verdes): (a) corada com picrossírius sob iluminação normal e (b) luz polarizada. Objetiva: 16 x. A seta verde mostra a presença da gordura



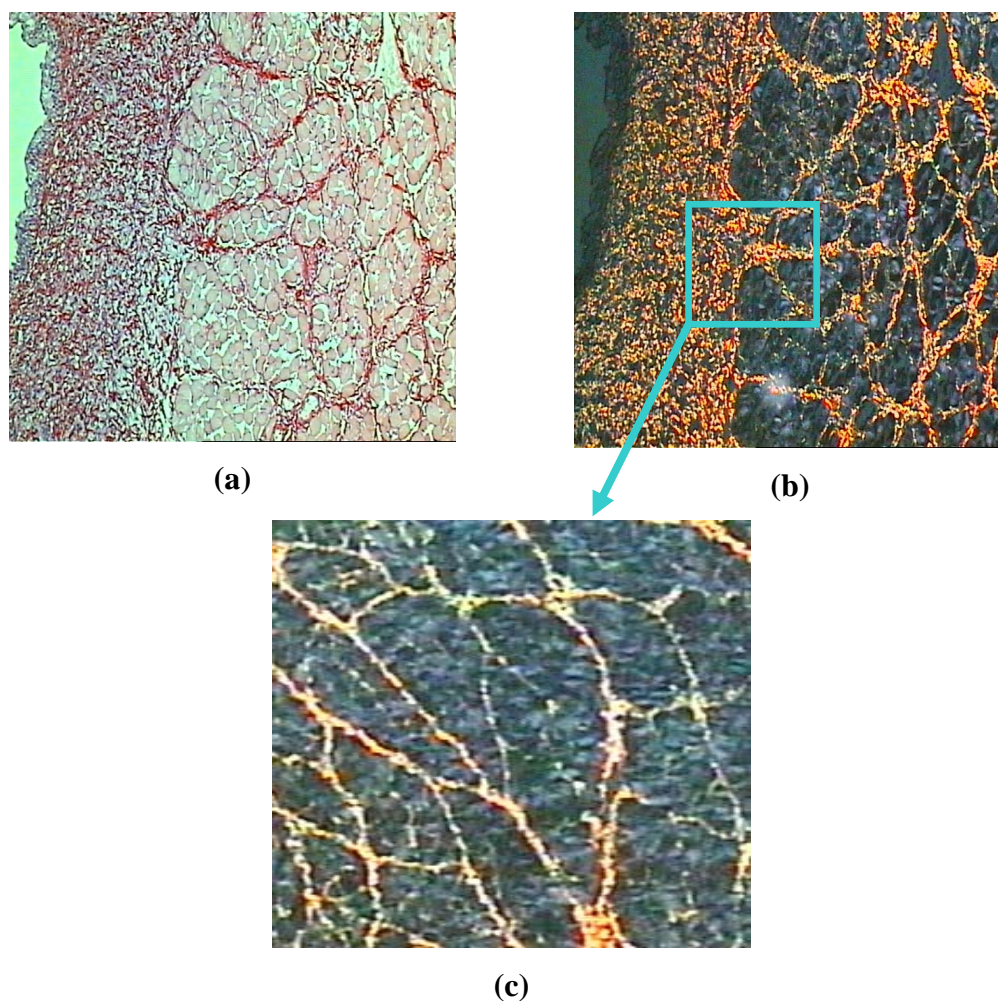
**Figura 9** - Fotomicrografia do corte histológico da porção intermembranosa do coelho 11 submetido a enxerto de fáscia muscular: (a) corada com picrossírius sob iluminação normal e (b) sob luz polarizada. Objetiva: 16x. A seta verde mostra a presença da fáscia muscular

#### 4.3 Relação do enxerto com as estruturas adjacentes

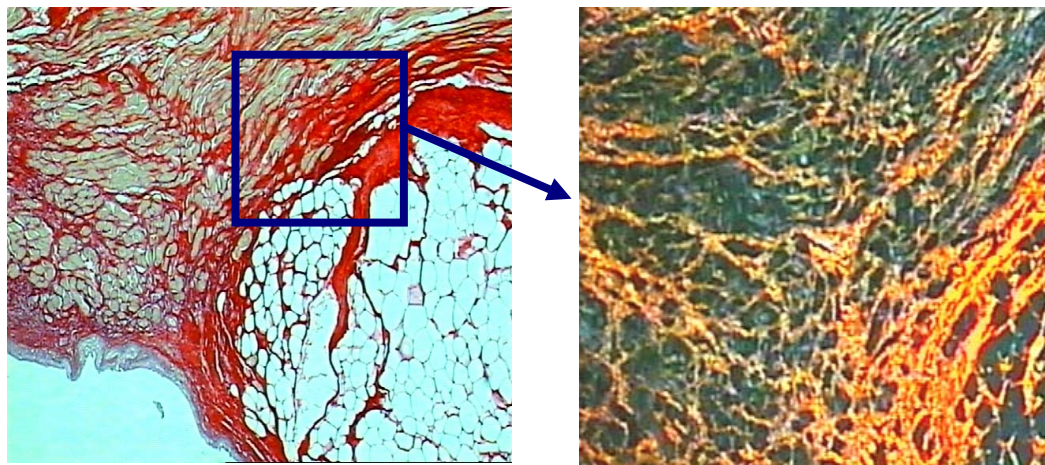
A fáscia muscular apresentou aspecto de distribuição “em fuso”, que foi identificado aos três e seis meses do pós-operatório. A gordura apresentou aspecto “em rede”, estava envolvida por colágeno espesso que se estendeu para o músculo tireoaritenóideo (Figuras 9 e 10)



**Figura 9** - Fotomicrografia do corte histológico transversal da porção intermembranosa de coelho, prega vocal direita: (a) coelho 14, enxerto da fáscia (seta amarela) com distribuição em fuso. Objetiva: 25x; (b) coelho 23; e, (c) coelho 31, submetidos a enxerto de gordura (identificados) com colágeno “em rede desorganizada” no bloco gorduroso (em vermelho). Objetiva: 50x.

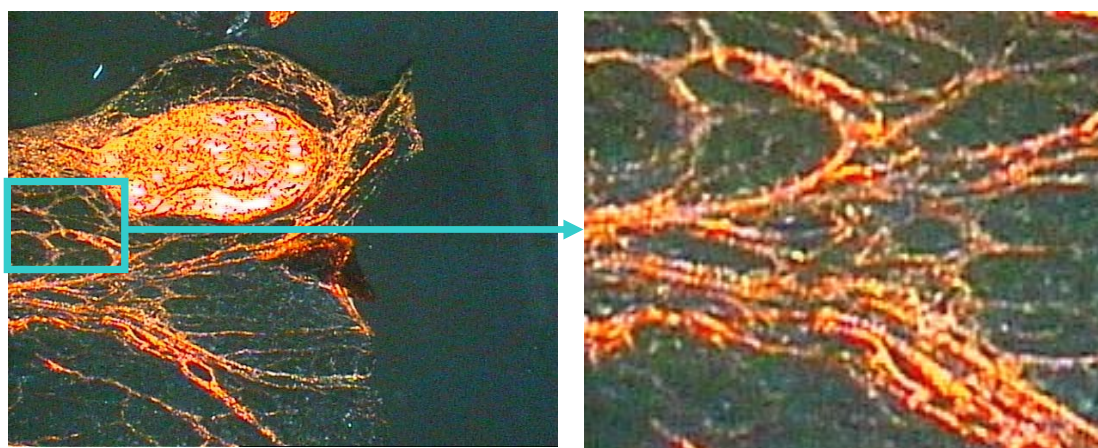


**Figura 10** - Fotomicrografia do corte histológico da porção intermembranosa do coelho, (a) prega vocal esquerda (controle), sob luz normal; (b) luz polarizada. Objetiva; 25x; e, (c) um dos campos entre a camada muscular e a lamina propria com aumento. Objetiva: 200x



(a)

**Figura 11** - Fotomicrografia do corte histológico da porção intermembranosa do coelho, (a) prega vocal direita, sob luz normal. Objetiva: 50x; e, (b) luz polarizada. Objetiva: 100x .



(a)

(b)

**Figura 12** - Fotomicrografia do corte histológico da porção intermembranosa do coelho, (a) prega vocal direita, sob luz normal. Objetiva: 25x; e (b) luz polarizada. Objetiva: 100x .

#### 4.4. Comparação da densidade do colágeno entre os grupos

Os dados relativos a cada uma das pregas vocais de cada um dos coelhos estudados está apresentado no Anexo B (para 90 dias) e Anexo C (para 180 dias).

A Tabela 3 apresenta a concentração média de colágeno e o desvio padrão em todos os grupos estudados, em ambas pregas vocais. A análise estatística da concentração de colágeno, por área, demonstrou aumento do colágeno em todos grupos enxertados quando comparados com os grupos controle ( $p < 0,001$ ).

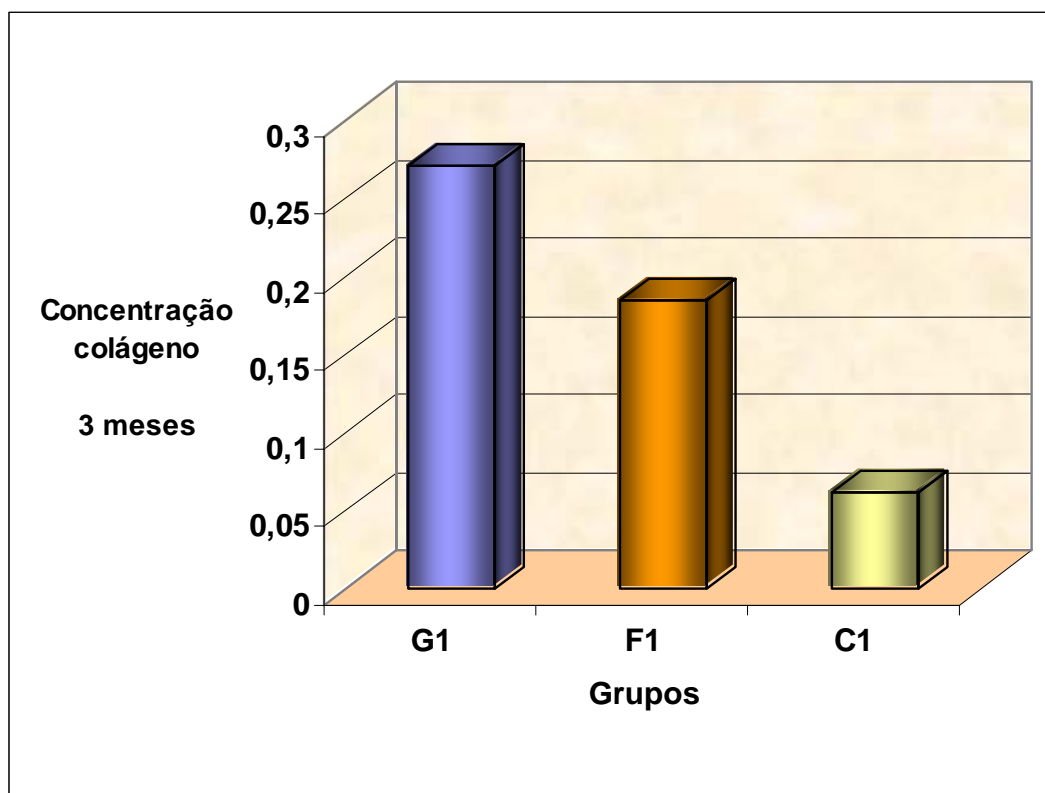
**Tabela 3** - Comparação entre a concentração de colágeno para 3 meses e 6 meses do pós-operatório para todos os grupos de coelhos estudados.

Grupo	Pós-operatório				p	
	3 meses		6 meses			
	média ± dp <sup>1</sup>				0,544	
<b>Fascia</b>	amplitude	<b>F1</b>	0,17 – 0,19	<b>F2</b>	0,17 – 0,19	n.s. <sup>2</sup>
	n		6		6	
	média ± dp		0,281 ± 0,016		0,281 ± 0,013	0,226
<b>Gordura</b>	amplitude	<b>G1</b>	0,26 – 0,31	<b>G2</b>	0,26 – 0,30	n.s.
	n		6		6	
	média ± dp		0,070 ± 0,004		0,064 ± 0,004	0,210
<b>Controle</b>	amplitude	<b>C1</b>	0,062 – 0,079	<b>C2</b>	0,060 – 0,071	n.s.
	n		12		12	

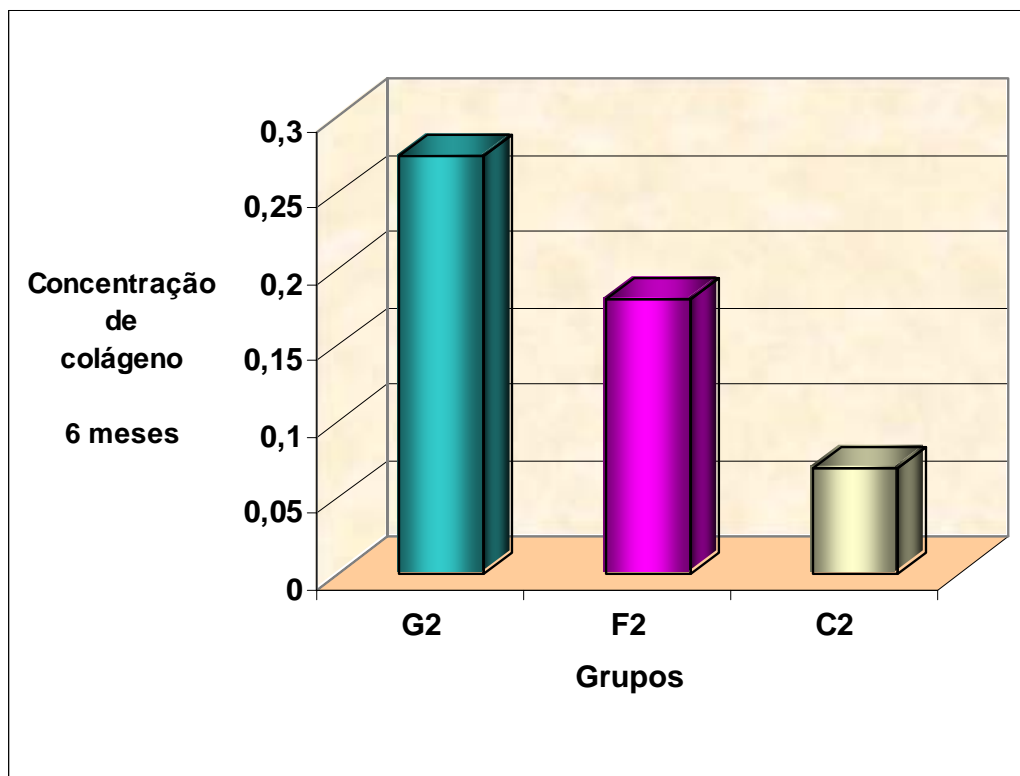
<sup>1</sup> dp = desvio-padrão; <sup>2</sup> n.s. = não significativo

Observou-se maior concentração de colágeno no grupo da gordura quando comparado com a fásia tanto na análise aos 90 dias ( $p < 0,001$ ), quanto aos 180 dias ( $p < 0,001$ ), respectivamente (Gráficos 1 e 2).

**Gráfico 1** - Comparação da concentração de colágeno (quantidade de colágenos/ $\mu\text{m}^2$ ) nos três grupos, após 3 meses da operação, em que pode ser observada maior quantidade no grupo enxertado com gordura ( $p < 0,001$ ).



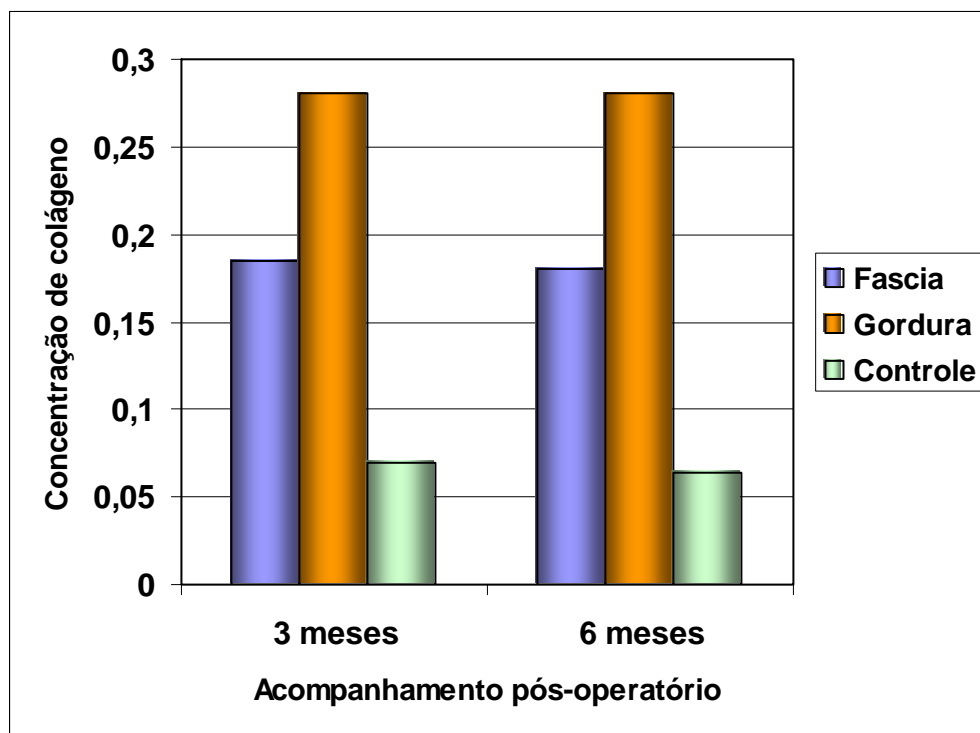
**Gráfico 2** - Comparação da concentração de colágeno (quantidade de colágenos/ $\mu\text{m}^2$ ) nos três grupos, após 6 meses da operação, em que pode ser observada maior quantidade no grupo enxertado com gordura ( $p < 0,001$ ).



Ao comparar os resultados no grupo “gordura”, aos 3 meses e 6 meses, não foi constatada diferença estatisticamente significativa da concentração de colágeno. No grupo “fáscia”, também não se observou diferença entre as amostras de 3 meses e 6 meses, igualmente no grupo controle, também não houve diferença entre 3 meses e 6 meses (Gráfico 3).



**Gráfico 3** - Comparação da concentração de colágeno após 6 meses da operação, demonstrando maior concentração no grupo enxertado com gordura ( $p < 0,001$ ).



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 A utilização do coelho em estudos experimentais na laringologia - método

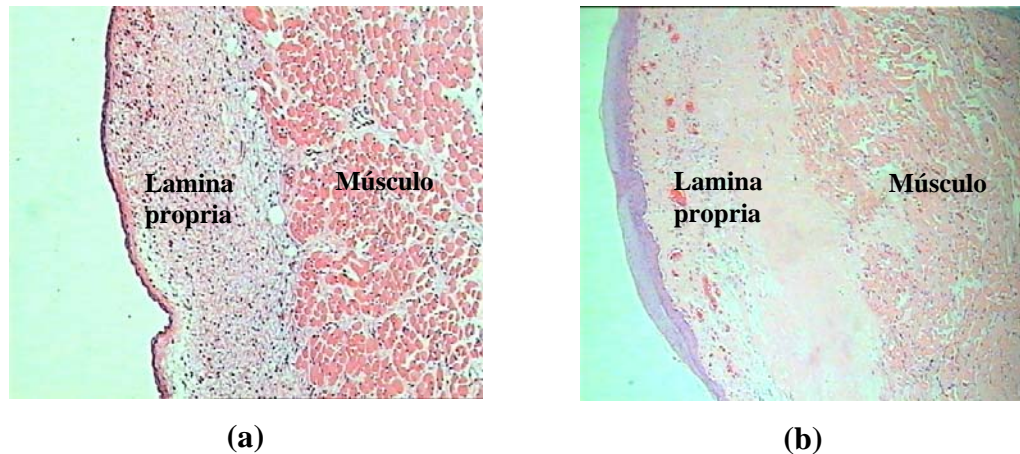
A partir das descrições de Hirano (1974) da estrutura da prega vocal em camadas e sua associação com o padrão vibratório, a laringologia transformou seus conceitos e possibilitou entendimento melhor sobre as alterações vocais. A teoria de corpo e cobertura de Hirano e Kakita (1985), permitiu a compreensão sobre os fundamentos da fisiologia da fonação, e mudou a filosofia dos conceitos cirúrgicos, e os trabalhos experimentais permitiram testar novas técnicas.

Na laringologia, utilizaram-se inúmeros animais para experimentação como porcos (Garret et al., 2000), gatos (Saccogna et al., 1997), macacos (Garret et al., 2000), coelhos (Duprat et al., 2001; Duprat et al., 2004) e, principalmente, cães (Hill et al., 1991; Mikus et al., 1995; Zaretsky et al., 1995; Woo et al., 1999; Stein et al., 2000). Mas, qual seria o melhor modelo experimental para estudos laringológicos?

Kurita et al. (1995) relatam que a histologia da prega vocal do porco, assim como as dimensões da laringe, são as que mais se aproximam da humana. De acordo com o mesmo autor, isso não indica que tal animal seja necessariamente o melhor modelo para estudos da fonação, pois devem ser considerados fatores como os

músculos intrínsecos da laringe, entre outros. Segundo Garret et al. (2000), apoiados nos aspectos histológicos e estroboscópicos, o cachorro é modelo que melhor se aproxima do ideal. Por outro lado, o coelho é um animal dócil, de fácil manejo anestésico, que se acomoda em gaiolas comuns de biotério e bastante utilizado em modelos para estudo de resposta imunológica (Harlow; Lane, 1988).

Ao analisar a histologia da lamina propria e do músculo tireoaritenóideo dos coelhos, observa-se sua similaridade com a prega vocal humana (Kurita et al., 1995), que demonstra divisão por camadas e presença de colágeno e células da matriz extracelular.



**Figura 13** - Fotomicrografia de corte histológico transversal demonstrando a estruturação em camadas da prega vocal: (a) prega vocal de coelho, corada com HE. Objetiva: 10x; e (b) Prega vocal humana, corada com HE. Objetiva: 5x.

No presente trabalho, o método utilizado para anestésiar os coelhos permitiu acessar as pregas vocais através da laringofissura com ventilação espontânea,

favorecendo a manipulação delicada e segura das pregas vocais e dos enxertos, sem que houvesse dano indesejado a qualquer estrutura.

A dissecação da lamina propria e do músculo tireoaritenóideo foi realizada com auxílio do microscópio cirúrgico, e não foi usada sutura ou cola biológica para evitar alteração na análise histológica. Como a lamina propria do coelho é muito fina e aderida ao epitélio (Kurita et al., 1995), optou-se confeccionar um bolsão entre a lamina propria e o músculo tireoaritenóideo, para reduzir a possibilidade de ruptura do retalho e extrusão do enxerto. Em humanos, Sataloff et al. (1997) foram os pioneiros a descrever a criação de uma bolsa no espaço de Reinke, entre o epitélio e o ligamento vocal, seguida do preenchimento de gordura injetada com seringa de Bruning e agulha grossa para evitar trauma e destruição do bloco. Enquanto Sataloff et al. (1997) utilizaram a seringa, Duprat et al. (2001) realizaram implante da gordura em bloco com o uso de instrumental convencional utilizado em micro-laringoscopia. Ambos não relatam o uso de suturas ou colas biológicas para melhor fixação do enxerto.

Por ser um estudo histológico, com o objetivo de observar a incorporação do enxerto, o acesso externo e a inserção do enxerto entre a lamina propria e o músculo não trouxeram nenhum inconveniente. Se o estudo enfocasse as características vibratórias após a enxertia, a metodologia mais fiel seria a laringoscopia direta e o posicionamento do enxerto nas camadas mais superficiais da lamina propria, ou seja, logo abaixo do epitélio.

## 5.2 Método estereológico

Neste estudo foram usados métodos estereológicos que são ferramentas precisas para obter informações quantitativas, estatisticamente balanceadas, a partir de amostras de tecido. A utilização de um programa de computador específico permitiu, por meio do estabelecimento prévio de um padrão de cores para o colágeno, criar um gradiente, a partir do qual o computador reconheceu o substrato em estudo e forneceu a quantificação e a densidade do colágeno sem que houvesse o viés da contagem feita pelo examinador. Trata-se de uma técnica simples, bastante empregada em patologia e permite, a partir de um plano bidimensional, estimar o que ocorre tridimensionalmente (Gundersen et al., 1988).

Outra vantagem do método é a obtenção de dados contínuos, que possibilitou encontrar resultados relevantes. Este método tem sido utilizado em inúmeros estudos relacionados às pregas vocais (Melo, 2004).

Para que o método seja adequadamente empregado, contudo, alguns critérios devem ser estabelecidos. Inicialmente o corte nos tecidos deve ser feito sempre da mesma forma. Adotou-se um corte perpendicular ao bordo livre, a exemplo de Hammond et al. (1997), realizado sempre pelo mesmo pesquisador.

O segundo critério foi a coleta dos dados em cinco ou mais campos diferentes. Neste estudo sempre foram analisados, no mínimo, cinco e, no máximo, oito campos em cada lamina.

O terceiro critério refere-se a seleção aleatória dos campos a serem estudados, ou seja, os campos não podem ser escolhidos pelo examinador. No presente estudo, na prega vocal direita foi analisado todo o tecido (muscular e lamina propria) em volta do enxerto contido na lamina, excluindo somente as regiões que continham o enxerto, uma vez que nossa análise se baseou na avaliação do processo cicatricial peri-enxerto. O programa permite tal exclusão sem que haja prejuízo da análise. Na prega vocal esquerda foram analisados cinco campos na região de transição entre a lamina propria e o músculo. Em todas as laminas, o número de campos, nessa região, foi sempre cinco, ou seja, todos os campos foram analisados sem que houvesse escolha pelo examinador.

Finalmente, para que o examinador não identificasse as laminas, “examinador cego”, todas foram diferenciadas apenas com o número do coelho, sem referência ao enxerto a que o animal fora submetido ou ao tempo de sacrifício. Desta forma, respeitamos os critérios para emprego dos métodos estereológicos.

### **5.3 Método da picrossírius-polarização**

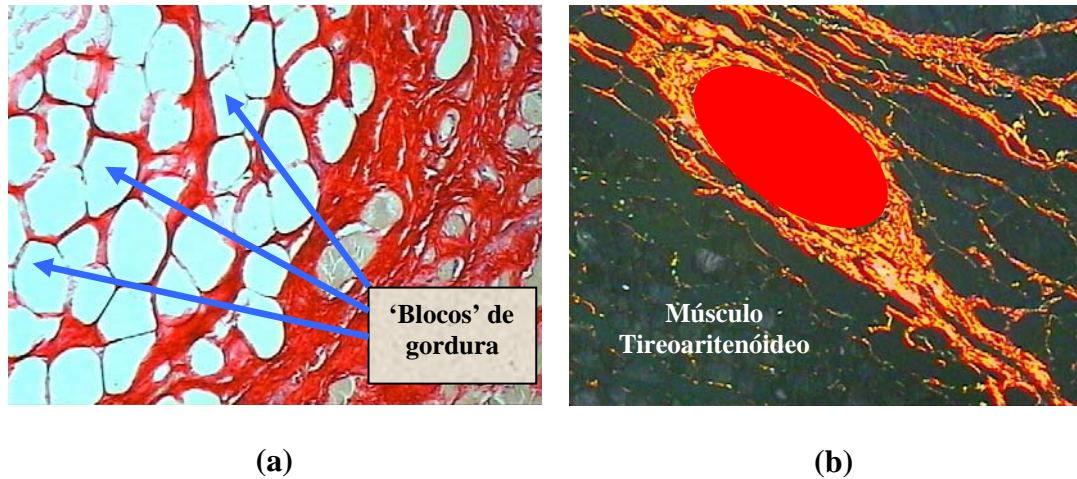
O método da picrossírius-polarização tem contribuído significativamente para a identificação e compreensão do colágeno e de suas funções. A especificidade do método apóia-se na presença de amino-ácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante ácido Sírius-Red (Sweat et al., 1964; Junqueira et al., 1979). Esta reação aumenta a birrefringência normal do colágeno, composto por

moléculas agregadas. A diferenciação dos tipos do colágeno também é possível, e o tipo I é fortemente birrefringente, com fibras espessas amarelas ou vermelhas e o tipo III pouco refringente e com fibras esverdeadas (Montes, Junqueira, 1991; Melo et al., 2003).

O picrossírius-red não depende de interações entre antígeno e anticorpo, pode ser utilizado sem inconvenientes para o estudo do colágeno em laringes excisadas (Melo et al., 2003). Montes et al. (1985) utilizaram esse método para analisar fragmentos teciduais de uma múmia com mais de 2.000 anos. É um método amplamente aplicado em estudos de correlação entre a arquitetura tecidual das fibras colágenas e a atividade funcional (Mauad et al., 1996; Lemos et al., 1997).

No presente trabalho, verificou-se nas pregas vocais submetidas a enxerto, um aumento na deposição do colágeno principalmente o tipo I (fortemente birrefringente) quando comparadas com as pregas vocais operadas, mas sem enxertia. O método da Picrossírius-polarização mede a birrefringência da molécula do colágeno, e permite determinar o grau de agregação celular na matriz extracelular (Saldiva et al., 1989; Montes; Junqueira, 1991). O aumento da birrefringência observado, portanto, pode refletir não só um aumento na quantidade de colágeno, como também uma maior agregação de suas moléculas. No grupo “gordura”, aos três e aos seis meses no pós-cirúrgico, foram identificados vários “blocos” entremeados por colágeno, que tinha o aspecto de rede. Nos grupos “fáscia” (três e seis meses), a distribuição foi mais regular, envolvendo “em fusão” um bloco único de enxerto. A

densidade do colágeno apresentou níveis mais elevados na gordura, embora fosse mais irregular na distribuição.



**Figura 14** - Fotomicrografia de corte histológico transversal de prega vocal direita de coelho corada com picrossírius: (a) submetida a enxerto de gordura (identificada) e nota-se a presença de colágeno espesso entremeando a gordura, sob luz normal. Objetiva 100x; (b) fuso do colágeno formado pela fásia removida e substituída pelo esquema (oval, em vermelho), sob luz polarizada. Objetiva: 25x

#### 5.4 Reação inflamatória e enxertia

Uma vez que a fibrose cicatricial é diretamente proporcional à reação inflamatória induzida pela substância de preenchimento, e que a mesma altera as propriedades viscoelásticas da prega vocal, acarretando prejuízo ao seu padrão vibratório, o ideal é que a reação inflamatória, causada pela substância de preenchimento, seja a menor possível. No processo normal de cicatrização e reparo, por volta do terceiro dia, surgem na ferida, células fusiformes produtoras de



colágeno: os fibroblastos. A produção de colágeno por sua vez cresce rapidamente até o 21º dia, continuando depois de forma menos intensa, até que seja atingido um equilíbrio dinâmico entre a produção e a destruição (Adzick, 1997). Nesta fase da cicatrização surgem também os miofibroblastos, os quais apresentam certas características de células musculares lisas, como possuir actina e capacidade de contração, responsáveis pela aproximação dos bordos da ferida, e, por conseguinte, pela contratura cicatricial (Glat; Longaker, 1997).

No presente estudo, ao serem comparadas as concentrações de colágeno por área, presentes entre os grupos estudados, observou-se que ocorreu uma deposição maior de colágeno peri-enxerto nos grupos submetidos à enxertia de gordura, tanto aos três meses quanto aos seis meses, quando comparados com os grupos submetidos à enxertia de fáscia muscular, e quando comparados ao grupo controle. Esse fato sugere que a gordura é metabolicamente ativa (Hom, 1994), e torna-se mais frágil em condições diferentes de seu leito primário, estimulando o processo inflamatório e conseqüentemente uma deposição maior do colágeno cicatricial. Tal colágeno é o principal componente da cicatriz fibrótica, marcadamente responsável pela aderência das camadas da lamina propria, e rigidez da prega vocal. Diferem fisiologicamente do colágeno exógeno proveniente da enxertia ou de preenchimentos, pois estes não apresentam ação biológica primária de aderência, fixação, contração e aproximação de bordos cicatriciais (Mélega, 2002). Por outro lado, o colágeno endógeno, produzido no leito inflamatório pelos fibroblastos e miofibroblastos, atua como cimento cicatricial, reduz o espaço morto da ferida mediante suas propriedades de aderência, fixação e contração - fenômeno conhecido como fibrose cicatricial

(Peacock, 1990). Tal fibrose apresenta em sua formação, colágeno do Tipo I (80%) e do Tipo III (20%) (Mélega, 2002).

Os dados analisados também sugerem que os enxertos de fáschia muscular na prega vocal são preferíveis aos enxertos de gordura sob a justificativa de que conduzem a uma reação fibrótica menos intensa, e conseqüentemente resultam em um melhor padrão vibratório da prega vocal, pelo menos em relação ao colágeno cicatricial. Não se pode esquecer, entretanto, das propriedades reológicas da gordura e da fáschia, e que a gordura tem características de viscosidade mais próximas à camada superficial da lamina propria humana (Chan, Titze, 1998). Seria, deste modo, um substituto melhor para uma lamina propria deficiente.

O uso do tecido gorduroso como enxerto, em laringologia, ainda é motivo de imprevisibilidade, em virtude da possibilidade de absorção e conseqüente perda do volume desejado. De acordo com a literatura, as taxas de absorção são variáveis o que sugere que a sobrevivência da gordura não depende de um, mas de vários fatores. Entre eles pode-se citar o local de coleta e, principalmente, o manuseio do tecido gorduroso a ser utilizado como enxerto (Boyce et al., 1994). Outra variável da longevidade do enxerto é a forma como é feito o manuseio antes da injeção ou da inserção em bloco pois a manipulação excessiva da gordura gerava maior processo inflamatório por causa da ruptura celular e liberação de ácidos graxos. Com a intenção de remover os produtos da ruptura dos adipócitos, Mikus et al. (1995) propuseram a purificação da gordura após a liposucção antes de ser injetada. Utilizaram prega vocal de cães para comparar a injeção de gordura mediante duas técnicas: (1) liposucção e (2) liposucção e purificação. Os resultados com relação à

---

absorção foram melhores com a gordura submetida apenas a liposucção. Os autores justificaram o achado sugerindo a ocorrência da perda do suporte fibrovascular e o dano às membranas celulares dos adipócitos.

Acredita-se que a baixa taxa metabólica e a ultra-estrutura composta principalmente por fibrócitos e matriz extracelular de colágeno, são as responsáveis principais da longevidade do enxerto de fásia muscular nas pregas vocais. Além disso, permanece estável mesmo em ambiente infectado como a cirurgia do ouvido crônico (Reijonen et al., 2001).

A fásia muscular pode ser injetada lateralmente ao músculo vocal ou transplantada em bloco para uma “bolsa” criada na lamina própria, e a opção da técnica a ser usada, normalmente depende da etiologia da insuficiência glótica. As técnicas de injeção são utilizadas preferencialmente para casos de paralisia unilateral de prega vocal enquanto o sulco vocal e as fibroses são as principais indicações do implante de fásia (Rhikanen, 1998; Tsunoda et al., 1999).

Vale ressaltar que os enxertos tanto de gordura quanto de fásia foram encontrados em todos os casos analisados no presente estudo, seja aos três como aos seis meses, fato que encontra opiniões semelhantes e contrárias na literatura. Duprat et al. (2004) ao enxertar gordura em prega vocal de coelhos, não encontraram reação inflamatória tecidual aos três meses, sugerindo que não deveria existir maior reabsorção da mesma após esse período. Woo et al. (1999), empregaram enxerto de gordura em cães, e em estudo histológico e estroboscópico, após seis semanas,

observaram a presença de gordura viável em todos os casos. Saccogna et al. (1997), entretanto, dentre seis gatos submetidos à enxertia de gordura em prega vocal, não identificaram a gordura viável em dois animais, aos 6 e 12 meses.

Com relação à fáscia muscular, Reijonen et al. (2001), em estudo em cães, encontraram tecido viável após 12 meses de enxertia de fáscia lata em prega vocal, sugerindo também que não existe absorção após esse período. Em contrapartida, Rodgers et al. (2001), após injeção de fáscia lata em laringe de cães, não identificaram a presença do enxerto em nenhum caso, até doze meses do pós-operatório.

Duke et al. (2001) publicaram estudo comparando o rendimento final e o processo inflamatório entre os enxertos de fáscia muscular e gordura em cães, e observaram que, ao final de três meses, não houve diferença significativa entre os enxertos, embora não tenham apresentado grupos controle, ou metodologia histomorfométrica de quantificação do processo inflamatório. Os achados do presente trabalho não mostraram aumento do colágeno entre 3 e 6 meses, em nenhum grupo (G, F e C) o que sugere que após o terceiro mês o processo cicatricial, decorrente da presença do enxerto, se estabilize e que a alteração fibrótica, se ocorrer, seja mínima.

### 5.5 Arranjo das fibras colágenas

Kriesel et al. (2003) afirmam que o arranjo anormal das fibras do colágeno caracteriza o desenvolvimento de uma cicatriz ou fibrose.

No estudo aqui desenvolvido, foi observado que este desarranjo, peri-enxerto e no músculo tireoaritenóideo adjacente, foi freqüente quando comparado com a distribuição desse colágeno no grupo controle, que não mostrou alteração no padrão de distribuição do mesmo na lamina propria e no tecido muscular. Essa alteração foi muito mais identificada nos grupos submetidos a enxerto de gordura, caracterizada por desarranjo em que se formaram vários blocos envoltos, principalmente, por colágeno tipo I. Nos grupos submetidos a enxertia de fásia muscular, tanto com três quanto com seis meses de evolução, a distribuição foi fusiforme e mais compacta.

A distribuição dos blocos da fásia muscular sugere a mesma age, no movimento muco-ondulatório, como um bloco único na vibração. A gordura, com suas “ilhas” envoltas por colágeno, parece que forma pequenas unidades e pode contribuir para uma desorganização maior na lamina propria. Estudos que compararem o padrão vibratório nesses dois tipos de enxerto poderão elucidar o impacto dessa relação entre enxerto e colágeno.

De acordo com Isshiki et al. (1999), a fonação normal ocorre de acordo com alguns parâmetros: área glótica sem fluxo de ar transglótico ( $Ag0$ ), pressão

subglótica, rigidez das pregas vocais e coaptação entre a parte superior e inferior das bordas da prega vocal. Embora fatores que alteram as propriedades viscoelásticas da lamina propria, especialmente de sua camada superficial, alteram significativamente o comportamento vibratório da própria prega vocal (Sataloff et al., 1997). Na literatura, alguns estudos clínicos em pacientes com alterações da lamina propria relatam melhora nos padrões vibratórios das pregas vocais após enxerto de gordura (Sataloff et al., 1997; Duprat et al., 2001), e de fáscia muscular (Tsunoda et al., 1999). Mesmo com o provável prejuízo cicatricial na lamina propria, portanto, a provável justificativa para esses achados clínicos é a melhora do fechamento glótico com redução do Ag0.

Thibealt et al. (2002), em estudo histológico e reológico da cicatriz produzida na lamina propria, após manipulação cirúrgica, encontraram menor densidade do colágeno associado à desorganização tecidual. O presente estudo faz uma avaliação do processo cicatricial, ao comparar a região de transição entre a lamina propria e o músculo após cirurgia com ou sem inserção do enxerto. Foi encontrada densidade maior de colágeno na presença do enxerto, além de desorganização tecidual mais pronunciada. Estudos que possam comparar as propriedades reológicas das pregas vocais (em situação normal, após manipulação cirúrgica exclusiva e após manipulação cirúrgica e enxertia), poderão elucidar o impacto deste padrão de distribuição do colágeno e do enxerto nas pregas vocais.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

- A fásia lata foi envolvida como uma peça única com colágeno distribuído em fuso, contornando-a. Na gordura, o colágeno a envolveu em vários blocos distintos, como se fossem unidades independentes, tendo uma distribuição em “rede”. No grupo controle, não foi observada alteração no padrão de distribuição do colágeno na lâmina própria e no tecido muscular.
- A enxertia de gordura e fásia lata na prega vocal de coelho promoveu maior deposição de colágeno do que no grupo controle, e é mais exuberante no enxerto de gordura.

**ANEXO A****HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

**DIRETORIA CLINICA****Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa*****APROVAÇÃO***

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.04.02, APROVOU o Protocolo de Pesquisa' n° 200/02, intitulado: "Implante de fásia lata na prega vocal de coelho - Estudo experimental da vibração das pregas vocais através da videoquimeografia", apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA.

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. LUIZ UBIRAJARA SENNES**

Pesquisador(a) Executante: **DR. CHRISTIANO DE GIACOMO**

**CARNEIRO**

CAPPesq, 25 de Abril de 2002.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO

Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

**OBSERVAÇÃO:** Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n°196, de 10.10.1996, inciso IX2, letra "c").



## ANEXO B

## LEITURA DAS LÂMINAS PARA O GRUPO G1

Grupo	Amostra	PVD	Controle	
G1	1	0.31	0.05	
G1	2	0.17	0.07	
G1	3	0.29	0.08	Lâmina A: amostras 1 a 6
G1	4	0.36	0.08	
G1	5	0.31	0.06	
G1	6	0.30		
G1	7	0.36	0.09	
G1	8	0.21	0.07	
G1	9	0.28	0.05	
G1	10	0.35	0.06	
G1	11	0.29	0.09	Lâmina B: amostras 7 a 12
G1	12	0.28		
G1	13	0.23	0.10	
G1	14	0.39	0.08	
G1	15	0.21	0.06	
G1	16	0.38	0.09	
G1	17	0.42	0.08	Lâmina C: amostras 13 a 19
G1	18	0.28		
G1	19	0.35		
G1	20	0.30	0.05	
G1	21	0.27	0.06	
G1	22	0.27	0.04	Lâmina D: amostras 20 a 24
G1	23	0.25	0.10	
G1	24	0.25	0.09	
G1	25	0.37	0.08	
G1	26	0.30	0.06	
G1	27	0.29	0.05	Lâmina E: amostras 25 a 29
G1	28	0.38	0.10	
G1	29	0.37	0.10	
G1	30	0.30	0.05	
G1	31	0.35	0.07	
G1	32	0.26	0.07	Lâmina F: amostras 30 a 34
G1	33	0.21	0.06	
G1	34	0.19	0.05	
G1	35	0.31	0.08	
G1	36	0.29	0.06	Lâmina G: amostras 35 a 39
G1	37	0.35	0.07	
G1	38	0.28	0.07	
G1	39	0.29	0.07	
G1	40	0.38	0.10	
G1	41	0.31	0.07	
G1	42	0.34	0.09	
G1	43	0.31	0.08	Lâmina H: amostras 40 a 45
G1	44	0.21	0.07	

---

G1	45	0.32		
G1	46	0.29	0.06	
G1	47	0.33	0.05	Lâmina I: amostras 46 a 50
G1	48	0.28	0.08	
G1	49	0.29	0.07	
G1	50	0.27	0.07	
G1	51	0.36	0.06	
G1	52	0.24	0.08	
G1	53	0.23	0.06	
G1	54	0.37	0.07	Lâmina J: amostras 51 a 56
G1	55	0.30	0.06	
G1	56	0.30		
G1	57	0.28	0.08	
G1	58	0.27	0.06	
G1	59	0.26	0.07	Lâmina K: amostras 57 a 61
G1	60	0.25	0.07	
G1	61	0.37	0.07	
G1	62	0.33	0.05	
G1	63	0.27	0.08	
G1	64	0.28	0.06	
G1	65	0.23	0.07	Lâmina L: amostra 62 a 66
G1	66	0.29	0.06	
G1	67	0.33	0.07	
G1	68	0.27	0.07	
G1	69	0.21	0.08	
G1	70	0.33	0.05	
G1	71	0.26	0.07	Lâmina M: amostras 67 a 73
G1	72	0.35		
G1	73	0.26		
G1	74	0.26	0.08	
G1	75	0.25	0.05	
G1	76	0.27	0.06	Lâmina N: amostras 74 a 78
G1	77	0.22	0.07	
G1	78	0.26	0.07	
G1	79	0.34	0.07	
G1	80	0.25	0.08	Lâmina O: amostras 79 a 83
G1	81	0.30	0.08	
G1	82	0.25	0.05	
G1	83	0.36	0.06	
G1	84	0.26	0.07	
G1	85	0.37	0.06	
G1	86	0.2	0.06	Lâmina P: amostras 84 a 89
G1	87	0.36	0.06	
G1	88	0.25	0.07	
G1	89	0.31		
G1	90	0.27	0.08	
G1	91	0.24	0.05	
G1	92	0.35	0.06	Lâmina Q: amostras 90 a 94
	93	0.31	0.07	
	94	0.24	0.07	
	95	0.28	0.06	
	96	0.34	0.07	

---

97	0.16	0.08	Lâmina R: amostras 95 a 100
98	0.15	0.09	
99	0.45	0.06	
100	0.41		
101	0.36	0.08	
102	0.23	0.06	
103	0.27	0.06	
104	0.14	0.06	Lâmina S: amostras 101 a 105
105	0.4	0.05	
106	0.34	0.08	
107	0.26	0.05	
108	0.33	0.06	Lâmina T: amostras 106 a 111
109	0.31	0.07	
110	0.27	0.07	
111	0.3		
112	0.33	0.07	
113	0.31	0.06	Lâmina U: amostras 112 a 117
114	0.34	0.08	
115	0.22	0.06	
116	0.21	0.07	
117	0.26		
118	0.27		

### LEITURA DAS LÂMINAS PARA O GRUPO F1

Grupo	Amostra	Pvd	controle	
F1	1	0.17	0.07	
F1	2	0.21	0.06	
F1	3	0.17	0.07	Lâmina 1: amostras 1 a 7
F1	4	0.15	0.05	
F1	5	0.16	0.08	
F1	6	0.28		
F1	7	0.28		
F1	8	0.21	0.06	
F1	9	0.14	0.07	
F1	10	0.17	0.08	Lâmina 2: amostras 8 a 13
F1	11	0.16	0.07	
F1	12	0.2	0.06	
F1	13	0.18		
F1	14	0.18	0.08	
F1	15	0.2	0.06	
F1	16	0.17	0.08	Lâmina 3: amostras 14 a 20
F1	17	0.18	0.06	
F1	18	0.2	0.07	
F1	19	0.25		
F1	20	0.26		
F1	21	0.19	0.06	
F1	22	0.16	0.07	
F1	23	0.19	0.07	Lâmina 4: amostras 21 a 27

F1	24	0.16	0.08		
F1	25	0.21	0.08		
F1	26	0.18			
F1	27	0.19			
F1	28	0.2	0.06		
F1	29	0.18	0.07		
F1	30	0.15	0.07	Lâmiana 5: amostra 28 a 33	
F1	31	0.2	0.08		8
F1	32	0.18	0.07		a
F1	33	0.2	0.06		32
F1	34	0.18	0.08		
F1	35	0.19	0.09		
F1	36	0.18	0.05		
F1	37	0.18	0.06		
F1	38	0.19	0.06	Lâmiana 6: amostras 34 a 39	
F1	39	0.21	0.06	3 a 37	
F1	40	0.2	0.06		
F1	41	0.19	0.07		
F1	42	0.2	0.07		
F1	43	0.18			
F1	44	0.17	0.05	Lâmiana 7: amostra 40 a 44	
F1	45	0.2	0.08	38 a 43	
F1	46	0.18	0.07		
F1	47	0.19	0.08		
F1	48	0.24	0.06	Lâmiana 8: amostras 44 a 49	
F1	49	0.14			
F1	50	0.21	0.06		
F1	51	0.24	0.05		
F1	52	0.13	0.09		
F1	53	0.22	0.07		
F1	54	0.22	0.06	Lâmiana 9: amostras 50 a 54	
F1	55	0.17	0.05		
F1	56	0.18	0.07		
F1	57	0.15	0.07		
F1	58	0.21	0.05	Lâmiana 10: amostras 55 a 59	
F1	59	0.17	0.07	55 a 60	
F1	60	0.21			
F1	61	0.18	0.05		
F1	62	0.19	0.06		
F1	63	0.17	0.07		
F1	64	0.16	0.08		
F1	65	0.13	0.07	Lâmiana 11: amostras 61 a 65	
F1	66	0.23		61 a 67	
F1	67	0.17			
F1	68	0.29	0.06		
F1	69	0.16	0.07		
F1	70	0.17	0.07		
F1	71	0.18	0.06		
F1	72	0.29	0.07	Lâmiana 12: amostras 68 a 72	
F1	73	0.2	0.06		
F1	74	0.13	0.07		
F1	75	0.21	0.07		

---

F1	76	0.2	0.07	
F1	77	0.18	0.06	Lâmina 13: amostras 73 a 77
F1	78	0.17	0.05	
F1	79	0.17	0.07	
F1	80	0.15	0.08	
F1	81	0.18	0.06	
F1	82	0.16	0.07	Lâmina 14: amostras 78 a 83
F1	83	0.17		
F1	84	0.26	0.06	
F1	85	0.29	0.05	
F1	86	0.13	0.07	
F1	87	0.16	0.08	
F1	88	0.17	0.07	Lâmina 15: amostras 84 a 89
F1	89	0.11		
F1	90	0.24	0.05	
F1	91	0.25	0.06	
F1	92	0.15	0.07	
F1	93	0.16	0.08	
F1	94	0.17	0.07	Lâmina 16: amostra 90 a 94
F1	95	0.18	0.05	
F1	96	0.17	0.06	
F1	97	0.16	0.08	
F1	98	0.18	0.07	
F1	99	0.18	0.08	Lâmina 17: amostra 95 a 99
F1	100	0.26	0.07	
F1	101	0.25	0.06	
F1	102	0.16	0.07	
F1	103	0.15	0.06	Lâmina 18: amostra 100 a 106
F1	104	0.17	0.05	00 a 105
F1	105	0.27		
F1	106	0.16	0.05	
F1	107	0.17	0.06	
F1	108	0.18	0.07	
F1	109	0.15	0.05	
F1	110	0.19	0.07	Lâmina 19: amostra 107-111
F1	111	0.16		06-111
F1	112	0.26	0.07	
F1	113	0.16	0.07	
F1	114	0.15	0.06	
F1	115	0.18	0.07	Lâmina 20: amostra 112-116
F1	116	0.24	0.08	
F1	117	0.18	0.06	
F1	118	0.19	0.07	
F1	119	0.19	0.07	Lâmina 21: amostra 117-121
F1	120	0.17	0.06	
F1	121	0.18	0.06	

---

## ANEXO C

## LEITURA DAS LÂMINAS PARA O GRUPO G2

Grupo	Amostra	PVD	controle	
G2	1	0.31	0.07	
G2	2	0.24	0.06	
G2	3	0.24	0.06	Lâmina 1: amostras 1 a 6
G2	4	0.26	0.08	
G2	5	0.3	0.07	
G2	6	0.27		
G2	7	0.30	0.07	
G2	8	0.26	0.08	
G2	9	0.23	0.08	Lâmina 2: amostras 7 a 11
G2	10	0.27	0.07	
G2	11	0.27	0.06	
G2	12	0.27	0.05	
G2	13	0.32	0.06	
G2	14	0.23	0.07	Lâmina 3: amostras 12 a 19
G2	15	0.30	0.06	
G2	16	0.24	0.08	
G2	17	0.25		
G2	18	0.24		
G2	19	0.25		
G2	20	0.25	0.07	
G2	21	0.26	0.06	
G2	22	0.26	0.07	Lâmina 4: amostras 20 a 24
G2	23	0.28	0.06	
G2	24	0.27	0.05	
G2	25	0.32	0.08	
G2	26	0.29	0.05	
G2	27	0.25	0.06	
G2	28	0.23	0.05	Lâmina 5: amostras 25 a 30
G2	29	0.29	0.07	
G2	30	0.24		
G2	31	0.30	0.08	
G2	32	0.23	0.09	
G2	33	0.29	0.05	Lâmina 6: amostras 31 a 35
G2	34	0.22	0.07	
G2	35	0.34	0.06	
G2	36	0.20	0.08	
G2	37	0.30	0.05	
G2	38	0.31	0.08	
G2	39	0.24	0.07	Lâmina 7: amostras 36 a 41
G2	40	0.24	0.06	
G2	41	0.26		
G2	42	0.32	0.05	
G2	43	0.25	0.08	
G2	44	0.25	0.07	
G2	45	0.26	0.06	Lâmina 8: amostras 42 a 48
G2	46	0.26	0.06	

---

G2	47	0.27		
G2	48	0.21		
G2	49	0.23	0.07	
G2	50	0.25	0.07	
G2	51	0.30	0.07	Lâmina 9: amostras 49 a 53
G2	52	0.25	0.06	
G2	53	0.25	0.07	
G2	54	0.27	0.08	
G2	55	0.33	0.09	
G2	56	0.23	0.07	Lâmina 10: amostras 54 a 58
G2	57	0.34	0.08	
G2	58	0.26	0.06	
G2	59	0.27	0.05	
G2	60	0.30	0.06	
G2	61	0.26	0.07	
G2	62	0.23	0.08	Lâmina 11: amostras 59 a 65
G2	63	0.34	0.07	
G2	64	0.24		
G2	65	0.25		
G2	66	0.25	0.06	
G2	67	0.31	0.06	
G2	68	0.33	0.05	Lâmina 12: amostras 66 a 70
G2	69	0.33	0.05	
G2	70	0.21	0.06	
G2	71	0.34	0.06	
G2	72	0.27	0.07	
G2	73	0.24	0.06	Lâmina 13: amostras 71 a 77
G2	74	0.31	0.07	
G2	75	0.31	0.06	
G2	76	0.26		
G2	77	0.27		
G2	78	0.29	0.08	
G2	79	0.31	0.05	Lâmina 14: amostras 78 a 82
G2	80	0.24	0.04	
G2	81	0.29	0.05	
G2	82	0.27	0.06	
G2	83	0.29	0.06	
G2	84	0.27	0.08	Lâmina 15: amostras 83 a 87
G2	85	0.22	0.06	
G2	86	0.32	0.05	
G2	87	0.33	0.06	
G2	88	0.31	0.05	
G2	89	0.21	0.05	
G2	90	0.26	0.07	Lâmina 16: amostras 88 a 92
G2	91	0.27	0.06	
G2	92	0.34	0.07	
G2	93	0.33	0.06	
G2	94	0.32	0.08	
G2	95	0.31	0.07	
G2	96	0.24	0.06	Lâmina 17: amostras 93 a 97
G2	97	0.20	0.07	
G2	98	0.25	0.05	

---

G2	99	0.30	0.07	
G2	100	0.22	0.07	
G2	101	0.26	0.06	
G2	102	0.26	0.08	Lâmina 18: amostras 98 a 106
G2	103	0.27		
G2	104	0.28		
G2	105	0.28		
G2	106	0.27		
G2	107	0.27	0.08	
G2	108	0.26	0.06	
G2	109	0.27	0.06	Lâmina 19: amostras 107 a 113
G2	110	0.27	0.06	
G2	111	0.27	0.07	
G2	112	0.23		
G2	113	0.30		
G2	114	0.26	0.08	
G2	115	0.27	0.06	
G2	116	0.28	0.05	Lâmina 20: amostras 114 a 118
G2	117	0.26	0.07	
G2	118	0.27	0.07	

### LEITURA DAS LÂMINAS PARA O GRUPO F2

Grupo	Amostra	PVD	controle	
F2	1	0.16	0.07	
F2	2	0.14	0.06	
F2	3	0.22	0.06	
F2	4	0.22	0.08	Lâmina A: amostras 1 a 7
F2	5	0.16	0.08	
F2	6	0.20		
F2	7	0.20		
F2	8	0.19	0.07	
F2	9	0.17	0.07	
F2	10	0.19	0.07	Lâmina B: amostras 8 a 12
F2	11	0.16	0.09	
F2	12	0.17	0.05	
F2	13	0.16	0.06	
F2	14	0.19	0.07	
F2	15	0.15	0.06	Lâmina C: amostras 13 a 17
F2	16	0.20	0.08	
F2	17	0.18	0.08	
F2	18	0.16	0.07	
F2	19	0.20	0.07	Lâmina D: amostras 18 a 24
F2	20	0.17	0.09	
F2	21	0.17	0.06	
F2	22	0.19	0.07	
F2	23	0.21		
F2	24	0.15		
F2	25	0.26	0.08	



---

F2	26	0.24	0.07	
F2	27	0.13	0.06	
F2	28	0.15	0.07	Lâmina E: amostras 25 a 31
F2	29	0.17	0.07	
F2	30	0.16		
F2	31	0.18		
F2	32	0.22	0.09	
F2	33	0.21	0.05	
F2	34	0.14	0.07	Lâmina F: amostras 32 a 36
F2	35	0.17	0.06	
F2	36	0.15	0.08	
F2	37	0.16	0.07	
F2	38	0.15	0.08	
F2	39	0.18	0.07	Lâmina G: amostras 37 a 41
F2	40	0.15	0.06	
F2	41	0.19	0.07	
F2	42	0.16	0.07	
F2	43	0.19	0.08	
F2	44	0.17	0.07	Lâmina H: amostras 42 a 46
F2	45	0.16	0.06	
F2	46	0.18	0.06	
F2	47	0.19	0.08	
F2	48	0.16	0.08	
F2	49	0.20	0.07	
F2	50	0.16	0.07	Lâmina I: amostras 47 a 54
F2	51	0.17	0.07	
F2	52	0.16		
F2	53	0.19		
F2	54	0.17		
F2	55	0.18	0.09	
F2	56	0.17	0.07	
F2	57	0.18	0.08	Lâmina J: amostras 55 a 60
F2	58	0.16	0.06	
F2	59	0.17	0.07	
F2	60	0.17		
F2	61	0.18	0.07	
F2	62	0.16	0.08	
F2	63	0.15	0.07	Lâmina K: amostras 61 a 65
F2	64	0.18	0.06	
F2	65	0.17	0.07	
F2	66	0.17	0.07	
F2	67	0.17	0.07	
F2	68	0.22	0.07	Lâmina L: amostras 66 a 72
F2	69	0.13	0.06	
F2	70	0.15	0.07	
F2	71	0.19		
F2	72	0.16		
F2	73	0.17	0.06	
F2	74	0.18	0.07	
F2	75	0.17	0.06	Lâmina M: amostras 73 a 77
F2	76	0.16	0.08	
F2	77	0.16	0.06	

---

---

F2	78	0.17	0.08	
F2	79	0.17	0.08	
F2	80	0.16	0.08	Lâmina N: amostras 78 a 83
F2	81	0.21	0.07	
F2	82	0.21	0.06	
F2	83	0.14		
F2	84	0.16	0.08	
F2	85	0.19	0.06	
F2	86	0.17	0.07	Lâmina O: amostras 84 a 88
F2	87	0.21	0.06	
F2	88	0.17	0.08	
F2	89	0.22	0.08	
F2	90	0.19	0.07	
F2	91	0.19	0.06	
F2	92	0.18	0.07	Lâmina P: amostras 89 a 95
F2	93	0.17	0.09	
F2	94	0.21		
F2	95	0.23		
F2	96	0.16	0.09	
F2	97	0.16	0.07	
F2	98	0.17	0.05	Lâmina Q: amostras 96 a 100
F2	99	0.19	0.07	
F2	100	0.16	0.07	
F2	101	0.16	0.06	
F2	102	0.19	0.08	
F2	103	0.16	0.08	Lâmina R: amostras 101 a 105
F2	104	0.18	0.07	
F2	105	0.18	0.07	
F2	106	0.17	0.07	
F2	107	0.16	0.08	Lâmina S: amostras 106 a 110
F2	108	0.17	0.06	
F2	109	0.20	0.06	
F2	110	0.15	0.09	
F2	111	0.17	0.07	
F2	112	0.18	0.08	
F2	113	0.15	0.07	Lâmina T: amostras 111 a 118
F2	114	0.16	0.08	
F2	115	0.19	0.06	
F2	116	0.16		
F2	117	0.21		
F2	118	0.12		

---

## ANEXO D

**EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA DOS DIFERENTES GRUPOS DE  
COELHOS QUE RECEBERAM ENXERTOS DE FASCIA LATA E  
GORDURA NA PREGA VOCAL.**

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Enxerto</b>	<b>Pós-operatório (dias)</b>	<b>Intercorrência</b>
<b>G1</b>	<b>3</b>	2600	<b>Gordura</b>	<b>90</b>	<b>Não</b>
	<b>4</b>	2700			
	<b>5</b>	2800			
	<b>6</b>	3000			
	<b>30</b>	2800			
	<b>31</b>	2900			
<b>F1</b>	<b>7</b>	3000	<b>Fáscia</b>	<b>90</b>	<b>Não</b>
	<b>9</b>	2700			
	<b>11</b>	2800			
	<b>32</b>	3100			
	<b>33</b>	2700			
	<b>34</b>	3200			
<b>G2</b>	<b>15</b>	3000	<b>Gordura</b>	<b>180</b>	<b>Não</b>
	<b>16</b>	3200			
	<b>21</b>	3100			
	<b>23</b>	3100			
	<b>24</b>	2900			
	<b>26</b>	2900			
<b>F2</b>	<b>13</b>	2800	<b>Fáscia</b>	<b>180</b>	<b>Não</b>
	<b>14</b>	3200			
	<b>25</b>	3000			
	<b>27</b>	2900			
	<b>28</b>	2800			
	<b>29</b>	2900			

---

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Arnold GE. Vocal rehabilitation of paralytic disphonia. *Arch. Otolaryngol.* 1962; 76:358-68.

Adzick NS. Wound healing: biologic and clinical features. In: Sabiston, Textbook of Surgery. *The Biological Basis of Modern Surgical Practice.* 15 ed. WB. Saunders Company, 1997.

Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long term results of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:871-74.

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

Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today.* 1998;4(2):69-75.

---

<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.*

Boyce RG, Nuss DW, Kluka EA. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994; 27(1):39-68.

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

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

Chhetri DK, Gerratt, BR, Kreiman J, Berke, GS. Combined arytenoid adduction and laryngeal reinnervation in the treatment of vocal fold paralysis. *Laryngoscope.* 1999; 109:1928-36.

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

Duke, SG, 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.* 2001;111:759-64.

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. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* 2001;67:78-83.

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

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

Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: A Preliminary Clinical Study. *Laryngoscope.* 1995;105:944-48.

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

Glat PM, Longaker MT. Wound healing. In: Aston SJ, Beasley, RW, Thorne CNM. *Grabb and Smith's Plastic Surgery.* 5 ed., Lippincott-Raven, 1997, chap 1.

Gray S. D., Hirano, M., Sato, K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze I. R. *Vocal fold Physiology: frontiers of basis science.* San Diego: Singular publishing group, p. 1-34, 1993.

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

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

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

Harlow E, Lane D. In *Antibodies: a laboratory model*. Cold Spring Harbour Laboratory, Capítulo 5, p. 92-112, 1988.

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

Hill DP, Meyers AD, Harris J. Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine larynx. *Laryngoscope.* 1991;101:344-48.

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

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

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

Hsiung M, Chen Y, Pai L, Lin Y, Kang B, Wang H. Fat augmentation following microsurgical removal of the vocal nodules. *Laryngoscope.* 2002;112: 1414-19.

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

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

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

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



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

Junqueira, L. C., Carneiro, J. *Biologia celular e molecular.* 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Kriesel RJ, Thibault SL, Chan RW, Suzuki T, Van Groll TJ, Bless DM, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2002;111:884-89.

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

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

Kuttan R, Di Ferrante N. Sirius red-collagen interaction: a method for the measurement of collagen and bacterial collagenase activity. *Biochem Int.* 1980;1(5):455-62.

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

Lopes-De-Leon A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(8):737-43.

Mauad T, Leick-Maldonato EA, Lemos M, Dohnnikoff M, Caldini G, Montes GS, Saldiva PHN. The role of collagenous and elastic fibers in modulation bronchoconstriction. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(9):1995-99.

Melo ECM. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

Mélega JM, Freita, AG. Biologia da Cicatrização. In: Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte. Princípios Gerais. 1 ed. Medsi, Rio de Janeiro, 2002.

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

Mikaelian DO, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope.* 1991;101:465-68.

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

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

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

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

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

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

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

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

Nishiyama K, Hirose H, Iguchi Y, Nagai H, Yamanaka J, Okamoto M. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold as a treatment for recurrent nerve paralysis. *Laryngoscope*. 2002;112:1420-25.

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

Peacock EE, Cohen, IK. Wound healing. In: McCarthy Plastic Surgery. WB Saunders Company, vol 1, 1990: pg 161-83.

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Méd*. 1979;301(1):13-23.

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*. 2001;111:1068-74.

Reijonen P, Lehtikoinen-Söderlund S, Rihkanen H. Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 2002;111:523-29.

Remacle M, Lawson G, Keghian J, Jamart J. Use of injectable collagen for correcting glottic gaps: initial results. *J. Voice*. 1999;13(2):280-87.

---

Rihkanen H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope*. 1998;108:51-4.

Rihkanen H, Soderlund-Lehikoinen S, Reijonen P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope*. 1999;109:1854-57

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;112:729-33.

Rodgers BJ, Abdul-Karim FW, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope*. 2000;110:2012-15.

Rosen CA. Phonosurgical vocal fold injection: indications and techniques. *Operative techniques in otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1998a;9:203-09.

Rosen CA. Complications of phonosurgery: results of a national survey. *Laryngoscope*. 1998b;108:1697-1703.

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 (5):465-70.

Saldiva PHN, Delmonte VC, Carvalho CRR, Kairalla RA, Auler Junior JOC. Histochemical evaluation of lung collagen content in acute and chronic interstitial diseases. *Chest*. 1989;95(5):953-57.

Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Rosen DC, Heuer RJ. Autologous Fat implantation for vocal fold scar: A Preliminary Report. *J. Voice*. 1997;11(2):238-46.

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

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

Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann. Otol. Laryngol*. 1996;105:602-06.

Snedecor, G. W. Cochran, W. G. Statistical methods. 8 ed. Iowa, Iowa State University Press, Cap 4, p. 38-63, 1989

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

---

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

Stasney CR, Beaver ME, Rodriguez M. Minifenestration type I thyroplasty using an expanded polytetrafluorethylene implant. *J Voice.* 2001;15:151-57.

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

Suarez-Nieto R, Casas A, Vigil M. Morfología comparada del músculo tiroarritnoideo. *Anales O.R.L. Iber-Amer. XIII*, 1986;1:39-63.

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.*, 2002;122:537-540.

Thibealt SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal folds scarring. *J Voice.* 2002;16(1):96-104.

Tsunoda K, Baer T, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: long term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope.* 2001;111:453-57.

---

Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: A new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope*, 1999;109:504-08.

Wexler DB, Gray S, Jiang, J, Titze, I. Phonosurgical studies: fat-graft reconstruction of injured canine vocal cords. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*, v. 98, p. 668-673, 1989..

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

Ximenes Filho, J. <sup>a</sup> [tese]. Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo, 2002

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

Zeitels SM. The evolution of the assessment and treatment of paralytic dysphonia. *Otolaryngol Clin. North Am*. 2000;33(4):803-53.