

Fabrício Scapini

Efeito da cola de fibrina na deposição de colágeno após enxertia autóloga de fáschia em pregas vocais de coelhos: estudo histomorfométrico

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Scapini, Fabrício

Efeito da cola de fibrina na deposição de colágeno após enxertia autóloga de
fáscia em pregas vocais de coelhos : estudo histomorfométrico / Fabrício Scapini.
-- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Adesivo tecidual de fibrina 2.Pregas vocais 3.Colágeno 4.Coelhos
5.Fáscia muscular 6.Cicatrização

USP/FM/DBD-364/10

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Cecilia Scapini e meu pai Hodato Scapini, pelo exemplo de vida e de luta, de amor e de carinho. Este trabalho é fruto de seus esforços incondicionais dedicados à nossa educação e formação. Tornei-me Doutor, graças a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de poder desenvolver esse trabalho, que representa um período ímpar em minha formação. Seus conselhos, seu apoio e incentivo, aliados ao profundo conhecimento, tornaram possível a concretização desse trabalho. Em minha caminhada, será minha referência.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela dedicação e competência na direção do Departamento.

Ao **Dr. Christiano Giácomo Carneiro**, Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia e Fonoaudiologia de Bauru, pela idealização deste trabalho e pelos ensinamentos e apoio incondicional em todas as fases desse trabalho, assim como pelo apoio e confiança em minha caminhada na Otorrinolaringologia.

Ao **Doutor Rui Imamura**, Médico contratado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos conselhos e sugestões imprescindíveis, reflexo de sua indiscutível competência e rigor científicos.

Ao **Doutor Alexandre Felippu**, pelo incentivo ao desenvolvimento desse trabalho, assim como pelos anos que passamos juntos durante minha formação na Otorrinolaringologia. Seus conselhos e ensinamentos fazem parte dos alicerces de minha formação profissional.

A **Prof^a Dr^a Marisa Dolhnikoff**, Professora Associada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação e apoio na avaliação histológica e morfométrica.

Ao **Doutor Luiz Fernando Ferraz da Silva** (Burns), Médico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela disposição e apoio imprescindível na avaliação histológica e morfométrica.

Ao **Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva**, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e disponibilização dos recursos de seu departamento para realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luis Cóser**, Professor Adjunto da disciplina de Otorrinolaringologia do Curso de Medicina da Universidade Federal de Santa Maria, por todo o apoio profissional e pessoal, desde o período da graduação.

Ao **Doutor Ernani Clóvis Bülow**, Médico Cirurgião Geral em Santa Maria, pela orientação e incentivo no princípio da minha caminhada na Otorrinolaringologia. Foram suas as palavras que abriram o horizonte da Otorrinolaringologia na minha vida profissional.

Aos colegas da Pós-Graduação e residentes, em especial **Reinaldo Fernando Cóser Neto, Guilherme Carvalho de Almeida, Luciano Rotella, Henrique Candeo Patrício, André Baraldo Rodrigues, Jan Alessandro Socher e Roberta Ismael Dias Garcia**, pelo companheirismo e atenção, nas alegrias e principalmente nas dificuldades desta caminhada.

Aos Funcionários da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **Marilede, Márcia, Lucy, Bárbara e Jorge**, pelo apoio e carinho que sempre recebi em todos os momentos junto à disciplina. Aos Funcionários do Museu de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **Reginaldo e Ana**, bem como à **Cássia e Kelly**, Funcionárias do Laboratório de Patologia, que muito ajudaram na confecção das lâminas e utilização da infra-estrutura dos laboratórios.

À **Sandra de Morais Fernezlían**, funcionária do Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e sempre gentil apoio na preparação das lâminas para análise histológica.

À **Vanise Fagan Zanon**, minha esposa, que me acompanhou por quase toda a minha trajetória na cidade de São Paulo, dividindo as alegrias e as tristezas. Seu carinho, amor e dedicação foram essenciais nessa caminhada. Obrigado por seu apoio fundamental.

À minha irmã **Fabíola Scapini**, que soube me apoiar, apesar da distância, assim como divide as alegrias com meus sobrinhos queridos **Gabriel e Lucas**.

A **Denise, Rubens** e minha querida afilhada **Júlia**.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**.

*A estirpe herda-se e a virtude conquista-se; e a
virtude vale por si só o que a estirpe não vale.*

Miguel de Cervantes Saavedra

NORMALIZAÇÃO

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha. Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva D. S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	08
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1 A prega vocal humana.....	11
3.2 As proteínas fibrilares.....	12
3.3 Colágenos.....	13
3.4 Método de identificação do colágeno e cortes histológicos.....	15
3.5 O colágeno nas pregas vocais humanas.....	18
3.6 A incompetência glótica e seu tratamento.....	24
3.7 Modelos animais em estudos experimentais.....	31
3.8 A cicatrização.....	33
3.8.1 Classificação dos processos biológicos da cicatrização.....	34
3.8.2 A fase inflamatória.....	34
3.8.3 Fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular.....	38
3.8.4 Remodelação.....	39

3.8.5	Mediadores do processo inflamatório na cicatrização.....	39
3.8.6	Mediadores do processo inflamatório e a cola de fibrina.....	40
3.9	Cicatrização e fibrose nas pregas vocais.....	42
3.10	Métodos de sutura em microcirurgia laríngea.....	51
3.11	A cola de fibrina.....	55
3.11.1	A cola de fibrina em Laringologia.....	60
4.	MÉTODOS.....	67
4.1	Amostra.....	68
4.2	Formação dos grupos de estudo.....	69
4.3	Técnica cirúrgica.....	72
4.3.1	Anestesia dos coelhos.....	72
4.3.2	Confecção do enxerto.....	72
4.3.3	Acesso à laringe e inserção do enxerto.....	73
4.3.3	Preparação das peças para estudo.....	78
4.4	Preparações histológicas.....	79
4.5	Análise histológica.....	79
4.6	Análise morfométrica.....	81
4.7	Análise estatística.....	86
5.	RESULTADOS.....	88
5.1	Os Coelhos.....	89
5.2	O estudo piloto.....	90
5.3	A identificação do enxerto de fásia.....	91
5.4	Análise da densidade de colágeno nas pregas vocais.....	94
6.	DISCUSSÃO.....	97
6.1	A utilização de coelhos em estudos experimentais.....	98

6.2 O método picrossirius-red na identificação do colágeno total.....	100
6.3 O colágeno e o processo de cicatrização.....	102
6.4 Considerações finais.....	109
7. CONCLUSÃO.....	111
8. ANEXOS.....	113
Anexo A – Aprovação da CAPPesq do Hospital das Clínicas da FMUSP.....	114
Anexo B – Ofício do Centro de Bioterismo da FMUSP.....	115
Anexo C – Planilha com os valores das análises morfométricas do G1.....	116
Anexo D – Planilha com os valores das análises morfométricas do G2.....	118
Anexo E – Planilha com os valores das análises morfométricas do G3.....	120
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AH	ácido hialurônico
ANOVA	do inglês <i>Analysis of Variance</i> , teste de análise de variância
CAPPesq	Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa
CF	cola de fibrina
cm	centímetro
COL1A1	gene que codifica a cadeia pro- α 1(I), integrante da molécula de pró-colágeno tipo I
COL1A2	gene que codifica a cadeia pro- α 2(I), integrante da molécula de pró-colágeno tipo I
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico
dp	desvio-padrão
ed	edição
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> , teste imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos
et al	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i> , agência reguladora dos EUA
FGF	do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> , fator de crescimento de fibroblasto
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FT	fator tecidual
FVIIa	fator de coagulação VII ativado

FVIIIa	fator de coagulação VIII ativado
FIXa	fator de coagulação IX ativado
FXa	fator de coagulação X ativado
FXIII	fator de coagulação XIII
GAGs	glicosaminoglicanos sulfatados
GP IIb/IIIa	receptor de glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas
G1	Grupo 1, sacrificado 7 dias após o enxerto de fáscia muscular
G2	Grupo 2, sacrificado 30 dias após o enxerto de fáscia muscular
G3	Grupo 3, sacrificado 90 dias após o enxerto de fáscia muscular
HE	Hematoxilina-eosina, método de coloração
HC	Hospital de Clínicas
HGF	do inglês <i>Hepatocyte Growth Factor</i> , fator de crescimento de hepatócitos
IL-1β	interleucina 1 β
KCl	cloreto de potássio
LCD	do inglês <i>Display Liquid Crystal</i> , tela de cristal líquido
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LP	lâmina própria
MEC	matriz extra celular
MHC	do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> , complexo maior de histocompatibilidade
mm	milímetro
ml	mililitro
MMP-1	matriz metaloproteinase 1
MMP-9	matriz metaloproteinase 9
ORL	Otorrinolaringologia

p	página
p	proporção, representação da significância estatística
PGDF	do inglês <i>Platelet Growth Derived Factor</i> , fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE-2	prostaglandina E2
PNM	células polimorfonucleares
PVD	prega vocal direita
PVE	prega vocal esquerda
PVP-I	polivinilpirrolidona-iodo
RNA_m	do inglês <i>Ribonucleic Acid Messenger</i> , ácido ribonucleico mensageiro
SP	Estado de São Paulo, Brasil
TGF-β	do inglês, <i>Transforming Growth Factor β</i> , fator de crescimento transformador β
TM	do inglês <i>Trademark</i> , marca registrada
U	unidade internacional, medida padronizada
USP	Universidade de São Paulo
vCJD	do inglês <i>variant of Creutzfeldt-Jakob Disease</i> , variante da Doença da vaca louca
°C	graus <i>Celsius</i>
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
®	marca registrada
Σ	somatório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sutura da prega vocal e execução do nó fora do laringoscópio de suspensão. Fonte: Nishiyama, 2002.....	53
Figura 2. Instrumentos para empurrar o nó nas suturas endolaríngicas: a) Tsunoda; b) Kitahara; c) Nishiyama. Fonte: Nishiyama, 2002.....	53
Figura 3. Confeção do nó dentro do laringoscópio de suspensão. Fonte: Nishiyama, 2002.....	54
Figura 4. Seqüência da confecção da sutura endolaríngica pela técnica de Tsuji. Fonte: Tsuji, 2009.....	54
Figura 5. Seqüência de ativação e formação da rede de fibrina.....	55
Figura 6. Desenho da aplicação e dos componentes da CF. Fonte: Draf, 1980.....	61
Figura 7. Aplicação da CF em laringologia. Fonte: Naumann e Lang, 1981.....	62
Figura 8. Acomodação do coelhos no Centro de Bioterismo da FMUSP.....	68
Figura 9. Vista da região cervical anterior. Sutura da cartilagem tireóide e da membrana cricotireoidea com Prolene 5-0.....	69

Figura 10. Endoscopia laríngea com identificação dos enxertos de fâscia (setas) e de reação inflamatória na região da sutura da laringofissura (asterisco).....	70
Figura 11. Retirada e confecção do enxerto de fâscia lata, através de incisão na face lateral da coxa do coelho.....	73
Figura 12. Instrumental cirúrgico e material de consumo estéreis, utilizados nos procedimentos cirúrgicos.....	74
Figura 13. Vista da região cervical anterior, com exposição do arcabouço laríngeo e acesso via laringofissura. *cartilagem tireóide; ** membrana cricotireoidea.....	74
Figura 14. Esculpidor de Hollenback 3s, utilizado para confecção do bolsão na LP das pregas vocais (marca <i>Factory</i> [®] , Brasil).....	75
Figura 15. Vista microscópica da colocação do enxerto no bolsão confeccionado na prega vocal direita (seta contínua). Pinça apreendendo a hemilaringe direita (seta tracejada).....	75
Figura 16. Fibrinotherm [®] (Baxter, Immuno AG, Vienna, Austria), utilizado para preparação dos componentes da CF.....	76
Figura 17. Kit do Tissucol [®] . O kit disponibiliza frasco-ampola de trombina com 4 UI (para solidificação lenta), e frasco-ampola com 500 UI (para solidificação rápida).....	77
Figura 18. Laringe aberta (vista posterior) com os enxertos de fâscia (setas).....	78

Figura 19. Fotomicrografia de corte transversal ao nível do enxerto. Coloração HE (aumento de 10X à esquerda e 20X à direita).....	80
Figura 20. Fotomicrografia de corte transversal ao nível do enxerto. Coloração picrossirius (aumento de 10X à esquerda e 20X à direita).....	81
Figura 21. Fotomicrografia da lâmina corada com picrossirius (aumento de 50X). Representação da distribuição dos campos em torno do enxerto.....	83
Figura 22. Imagem da tela do sistema de análise do programa <i>Image-Pro Plus</i> [®] , com perímetro em torno do enxerto já selecionada (linha verde), e com a área correspondente ao colágeno já identificada (azul), expressa na janela ao lado (círculo amarelo, em μm^2).....	83
Figura 23. Imagem da tela do sistema de análise do programa <i>Image-Pro Plus</i> [®] , com a área peri-enxerto total marcada em azul, e calculada na janela ao lado (círculo amarelo, em μm^2).	84
Figura 24. Relação entre a área parcial (colágeno) e a área total delimitada, expressa em μm^2 , e o resultado (valor absoluto).....	85
Figura 25. Fotomicrografia representado os campos dispostos em torno do enxerto e seus respectivos valores representativos da densidade de colágeno. O valor final é calculado através da razão entre o somatório dos valores e o número de campos.....	85

Figura 26. Gaiolas para transporte dos coelhos entre o Centro de Bioterismo da FMUSP e o LIM-32.....90

Figura 27. a) Videoendoscopia laríngea. b) Vista endoscópica da laringe, sendo possível visualizar os enxertos de fásia muscular anterior aos processos vocais das cartilagens aritenóides (*), assim como processo inflamatório na região da laringofissura.....91

Figura 28. Laringe excisada. a) vista posterior. b) vista anterior. c) vista superior.....92

Figura 29. Laringe aberta (vista posterior). Identificação macroscópica dos enxertos (setas) e ilustração do bloco contendo a prega vocal com o enxerto, a ser removido para preparação histológica.....93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição das densidades de colágeno nos grupos com e sem a CF, nos períodos 7, 30 e 90 dias. As caixas representam ± 1 desvio padrão e as linhas horizontais representas as médias. Em azul as pregas vocais controles e em cinza as pregas vocais com CF.....95

Gráfico 2. Comparação entre as médias de densidade de colágeno para os grupos G1, G2 e G3 para as pregas vocais com a aplicação de CF, e para as pregas vocais controles.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as médias de concentração de colágeno entre as pregas vocais entre os grupos.....	95
---	----

RESUMO

Scapini, F. Efeito da cola de fibrina na deposição de colágeno após enxertia autóloga de fáscia em pregas vocais de coelhos: estudo histomorfométrico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 146p.

A incompetência glótica ainda representa um desafio para a laringologia. Implantes de biomateriais no espaço de Reinke ou no espaço paraglótico estão entre as opções de tratamento, e suturas e confecção de bolsões subepiteliais são normalmente utilizados para fixação desses implantes. Alternativamente, a cola biológica pode ser usada como adesivo nesses casos. A cola de fibrina (CF) é produto da reação de dois componentes do sistema de coagulação: o fibrinogênio e a trombina, que formam uma rede de fibrina, responsável, entre outros, pela adesão dos tecidos. Entretanto, além do efeito adesivo, a CF e seus componentes podem interferir no processo cicatricial, atuando sobre citocinas como o fator de crescimento transformador- β (TGF- β). O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da cola de fibrina na deposição de colágeno após enxertia de fáscia em pregas vocais de coelhos. Dezoito coelhos foram submetidos a enxerto de fáscia em ambas as pregas vocais, sendo o lado esquerdo fixado com CF. Os coelhos foram sacrificados após 7, 30 e 90 dias. As laringes foram removidas e as pregas vocais preparadas para estudo histomorfométrico através da coloração picrossirius, a fim de avaliar a deposição de colágeno total em torno do enxerto. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na densidade de colágeno em torno dos enxertos de fáscia nas pregas vocais que receberam a CF ($p=0,0102$) após 90 dias, em comparação com as pregas vocais controles. A aplicação da CF interferiu na deposição de colágeno em torno dos enxertos de fáscia, resultando em um aumento significativo na densidade de colágeno após 90 dias, possivelmente em decorrência da interação de seus componentes com citocinas e células envolvidas no processo de cicatrização.

Descritores: (1) adesivo tecidual de fibrina; (2) pregas vocais; (3) colágeno; (4) coelhos; (5) fáscia muscular; (6) cicatrização.

SUMMARY

Scapini, F. Effect of fibrin glue on collagen deposition after autologous fascia graft in rabbit vocal folds: histomorphometric study [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 146p.

The glottal incompetence is still a challenge in Laryngology. Implants of biomaterials in Reinke's space or paraglottic space are among the treatment options, and sutures and pockets dissections are usually used to set these implants. Alternatively, biological glue can be used as adhesive in these cases. Fibrin glue (FG) is the product reaction of two components of the coagulation system: the fibrinogen and thrombin that form a fibrin net, responsible for the tissues adhesion, among other functions. However, the FG and its components may interfere in wound healing, interacting with cytokines as the transforming growth factor- β (TGF- β). The objective is to study the effect of fibrin glue on collagen deposition after fascia grafting on the rabbits vocal folds. Eighteen rabbits were submitted to the fascia graft on both vocal folds, being the left side fixed with FG. The rabbits were sacrificed after 7, 30 and 90 days. The larynx were removed and vocal folds prepared for histomorphometric study through Picrosirius Red stain, in order to evaluate the collagen deposition around the graft. There was a significant increase in collagen density around the grafts on the vocal folds that received FG ($p=0.0102$) after 90 days, compared with the control. FG application interfered in collagen deposition around fascia grafts, resulting in a significantly increase of collagen density after 90 days, which possibly resulted from the interaction of FG and its components with the cytokines and cells involved in the wound healing.

Descriptors: (1) Fibrin tissue adhesive; (2) Vocal cords; (3) Collagen; (4) Rabbits; (5) Muscular fascia; (6) Wound healing.

***1* INTRODUÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

Entre as alterações que desafiam os laringologistas, a incompetência ou insuficiência glótica figura entre as mais difíceis de serem tratadas. Alterações de mobilidade, fibroses, atrofias ou arqueamentos das pregas vocais podem levar a graus variados de disfonia, bem como outras situações como aspiração e tosse pouco efetiva (Benninger et al., 1994). A busca de soluções duradouras ou, se possível, definitivas para restabelecer a função vocal com o máximo de qualidade é, atualmente, um dos objetivos da fonocirurgia (Ford, 2008).

A partir do século vinte, vários procedimentos cirúrgicos surgiram para a reabilitação da competência aerodinâmica e valvular da glote. O tratamento fonocirúrgico da disfonia paralítica começou com a injeção de substâncias no espaço paraglótico com objetivo de medializar a prega vocal paralisada e restabelecer o fechamento glótico.

As técnicas de injeção foram introduzidas por Bruennings em 1911 para paralisia unilateral de prega vocal, tendo o próprio autor desenhado uma seringa para a realização do procedimento (Bruennings, 1911). O material utilizado foi a parafina, que seria em seguida abandonada devido a reações de corpo estranho chamadas de “parafinoma” (Bradenburg, 1992).

Na década de 60, Arnold (1962, 1963) retomou as técnicas de injeção de materiais heterólogos nas pregas vocais com o uso do teflon. O mesmo acreditava que a substância ideal deveria apresentar boa tolerabilidade, passível de passar pela seringa, e perdurar ao longo do tempo (Arnold, 1962; Arnold, 1963; Ford, 2008). Os resultados iniciais foram extremamente animadores, porém as reações de corpo estranho, a fibrose, a formação de

granuloma e a possibilidade de extrusão inviabilizaram a manutenção do procedimento como tratamento definitivo (Sasai et al., 2005; Ford, 2008).

Na década de 70, Isshiki introduziu as técnicas de cirurgia do arcabouço laríngeo, conhecidas como tireoplastias. A tireoplastia tipo I consiste na medialização da prega vocal através da colocação de implante de silicone, Gore-Tex[®] ou mesmo cartilagem autóloga no espaço paraglótico no intuito de restabelecer o fechamento glótico adequado (Isshiki, 1974; Zeitels, 2000) Apesar de ser um procedimento realizado geralmente com anestesia local, requer acesso externo com incisão cervical e ainda há discussão quanto a sua indicação relacionada à causa da incompetência glótica. Paralisias e grandes fendas glóticas seriam as melhores indicações, ao passo que defeitos menores e especialmente defeitos na mucosa como sulcos e cicatrizes seriam melhores tratados com técnicas de injeção ou mesmo de implante no espaço de Reinke (Rihkanen, 1998; Remacle; Lawson, 2001; Giovanni et al., 2007; Reijonen et al., 2009).

Sendo assim os implantes biológicos obtiveram seu espaço. Inicialmente, Ford (1984) utilizou colágeno bovino. Após, Ford (1995), Remacle et al. (2000) e Courey (2001) publicaram os resultados iniciais com colágeno autólogo, cujas vantagens seriam maior durabilidade e eliminação de risco de resposta biológica.

A gordura também foi amplamente difundida como material autólogo, sendo atualmente parte do arsenal de opções do cirurgião pelo risco mínimo de reações de hipersensibilidade e principalmente pela sua biodisponibilidade (Shindo et al., 1996). A gordura ainda pode ser injetada ou mesmo inserida na prega vocal (Mikaelian et al., 1991; Bradenburg et al., 1992; Shindo et al., 1996; Sataloff et al., 1997; Woo et al., 1999).

O uso da fáschia muscular foi introduzido por Rihkanen em 1998. Ele descreveu um método de injeção através de corte da fáschia em pequenos pedaços capazes de serem injetados no músculo tireoaritenoideo. Tendo em vista a baixa taxa metabólica de seus elementos (matriz colágena e fibroblastos) e a grande biodisponibilidade, a fáschia tem sido considerada como uma boa opção (Rihkanen, 1998, Tsunoda et al.,1999; Tsunoda et al., 2001; Giovanni et al., 2007).

Tsunoda et al. (1999) foi o primeiro a descrever o transplante autólogo de fáschia para incompetência glótica, realizando procedimentos para tratar paralisias unilaterais, sulcos vocais, cicatrizes pós-radioterapia e atrofia da prega vocal (Tsunoda et al., 1999; Tsunoda et al., 2001).

As características ideais dos materiais para injeção nas pregas vocais devem incluir: 1) fácil preparação e aplicação; 2) propriedades biomecânicas similares às das pregas vocais; 3) mínima reação de corpo estranho; 4) mínima migração, e 5) manutenção do volume ao longo do tempo (Noordzij et al., 2008).

Quais sejam os materiais implantados, seus resultados sempre remetem a questionamentos em relação a diversos fatores como rendimento, absorção, propriedades viscoelásticas do enxerto, bem como em relação ao método de fixação dos mesmos, tendo em vista a possibilidade de extrusão. Nesse contexto, os métodos de fixação dos enxertos podem interferir direta ou indiretamente nas demais variáveis, tornando-se um fator importante no resultado final.

As alternativas para fixação de enxertos em pregas vocais são basicamente a sutura e a confecção de bolsões subepiteliais, onde os enxertos são inseridos através de uma abertura menor que seu tamanho, procurando assim prevenir sua extrusão.

Tsunoda e Niimi (2000) descreveram um caso de extrusão do implante de fáschia autóloga. Um paciente com cicatriz severa decorrente de radioterapia e microcirurgia com *laser* havia recebido um implante de fáschia em sua prega vocal esquerda, dentro do músculo vocal, que acabou extruindo duas semanas após o procedimento, em função de tosse. No sentido de prevenir a extrusão dos enxertos, especialmente nesses casos, onde o enxerto é posicionado no músculo vocal, os autores desenvolveram um instrumento denominado “knot-pusher”, desenhado para facilitar a realização da sutura. O paciente foi novamente operado e o enxerto fixado em bolsão que então foi suturado com nylon 7-0. Em 2002, Nishiyama comparou quatro instrumentos criados para auxiliar a realização da sutura, que levam os nomes de seus idealizadores: Tsunoda, Kitahara e outros dois desenvolvidos pelo próprio Nishiyama (Nishiyama et al., 2002).

Considerando a sutura e a confecção de bolsões subepiteliais ou intramusculares, a cola de fibrina (CF) tornou-se uma alternativa para fixação de enxertos, assim como de micro retalhos de mucosa da laringe. (Naumann; Lang, 1981; Remacle et al., 2000, Pryor et al., 2004).

A CF é utilizada principalmente para hemostasia, sutura e adesão tecidual. Essas aplicações são alternativas úteis e muitas vezes mais eficientes que as tradicionais em diversas áreas cirúrgicas (Dunn; Goa, 1999; Yoo et al., 2008). O uso de selantes baseados na formação da rede de fibrina foi descritos inicialmente em 1940 por Young e Medawar (Young; Medawar, 1940). Trinta anos após, Matras e Hueston começaram seus estudos que resultaram

no desenvolvimento da CF que mais tarde seria comercializada com o nome Tissucol[®] (Lyons et al., 1989; Spotnitz; Prabhu, 2005).

Na Laringologia, os primeiros trabalhos utilizando a CF começaram a ser publicados no final da década de 70 e no início da década de 80, principalmente na literatura de língua alemã.

Em 1979, Staindl publicou sua experiência com a CF em laringectomias para prevenção de fistulas. Além dessa aplicação, o autor descreveu a aplicação da CF em diversas áreas da Otorrinolaringologia com bons resultados, como em miringoplastias, fechamento de fistulas liquóricas fronto-basais, tonsilectomias em coagulopatas, e em anastomoses de nervo facial. Já na época o autor concluiu que, indubitavelmente, outras aplicações seriam encontradas para o uso da CF em Otorrinolaringologia, tanto para hemostasia quanto para síntese tecidual.

Martin et al. (1981) descreveram o uso de cola de fibrina em 31 casos de cirurgias endolaríngicas, sendo 27 para tratamento de paralisia bilateral com aritenoidectomia. Os autores sugeriram a utilização da cola de fibrina, destacando o efeito hemostático, a boa compatibilidade tecidual, completa reabsorção, propriedades de aderência, boa elasticidade e alta estabilidade em saliva. Referiram ainda o efeito de estimulação da proliferação fibroblástica e capilar, mesmo em feridas infectadas. Os autores concluíram que, após cinco anos de testes clínicos e de aplicação, a cola de fibrina ganhou um lugar permanente em cirurgia otorrinolaringológica.

A CF é um produto resultante essencialmente da mistura de dois componentes do sistema de coagulação: o fibrinogênio e a trombina. O primeiro passo da coagulação

sanguínea é a agregação plaquetária, que leva através de reações químicas à clivagem da protrombina em trombina, enzima esta que cliva o fibrinogênio produzindo monômeros de fibrina. A trombina também ativa o fator XIII, que catalisa a formação de ligações covalentes entre as moléculas de fibrina para formar o coágulo estável. A rede de fibrina então se fixa aos tecidos lesados através de ligações com glicoproteínas e colágeno (Franco, 2001).

A CF também tem sido utilizada como veículo para liberação de medicamentos e fatores de crescimento, bem como suporte para linhagens celulares em estudos de reparação tecidual, de ossos e órgãos (Horch et al., 2001; Yamada et al., 2003; Spotnitz; Prabhu, 2005). Além disso, estudos têm demonstrado que a CF e seus precursores promovem alterações no processo de cicatrização através da interferência na produção de citocinas como o fator de crescimento transformador-*beta* (TGF- β) e na contração do colágeno durante o processo de cicatrização (Saed et al., 2004, Cox et al., 2004).

Atualmente há um interesse crescente em estudos baseados em técnicas de engenharia celular/tecidual e técnicas regenerativas com intuito de inibir o processo de fibrose e restaurar os componentes da matriz extra celular (MEC) das pregas vocais (Luo et al., 2006; Duflo et al., 2006; Ford, 2008; Chen; Thibeault, 2009; Kuttly; Webb, 2009). Entretanto, nenhum trabalho até o momento avaliou os efeitos biológicos da CF nas pregas vocais, especialmente na produção de colágeno, tendo em vista que além do efeito de adesão desejado, sabe-se que a CF interfere na produção de citocinas durante o processo de cicatrização, e essa interferência pode trazer efeitos positivos ou negativos nesse processo.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Considerando os efeitos biológicos que a cola de fibrina e seus componentes podem resultar no processo de cicatrização, esta pesquisa tem por objetivo:

- Quantificar e comparar as fibras colágenas em torno do enxerto nas pregas vocais de coelhos que receberam enxerto de fáscia muscular fixado com cola de fibrina com as pregas vocais que receberam o enxerto sem a fixação, através de estudo histoquímico e morfométrico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A PREGA VOCAL HUMANA

Desde o primeiro choro até as últimas palavras de uma pessoa, as pregas vocais são as estruturas do corpo que suportam o mais longo período de trauma de tecidos moles, colidindo em média de 120 a 200 vezes por segundo. A inervação dos músculos laríngeos encontra-se entre as mais densas do corpo, permitindo uma das mais sofisticadas habilidade motoras: o canto (Zeitels, Healy, 2003). Resultado de uma complexa interação de fatores representados pela pressão sub-glótica, onda mucosa e fechamento glótico, a voz humana permite variações em intensidade, *pitch* e qualidade, viabilizando assim a capacidade que temos em expressar emoções e pensamentos (Ford et al., 1986; Tietze, 1993).

Em 1974, Minoru Hirano descreveu a estrutura básica da prega vocal humana, sendo composta por músculo com ligamento vocal, e a camada mucosa. Em 1975, o mesmo autor, revisando as informações acerca da histologia das pregas vocais, dividiu a estrutura da prega vocal em cinco camadas: epitélio, lâmina própria (LP) com suas camadas superficial, intermediária e profunda, e músculo vocal.

Em 1981, novamente Minoru Hirano descreveu os componentes das camadas da LP, encontrando fibras colágenas finas na camada superficial, e fibras colágenas mais densas na camada profunda. Na camada intermediária, o autor encontrou um predomínio de fibras elásticas entrelaçadas com algumas fibras colágenas.

Baseados nesses estudos, Hirano e Katita (1985) formulam a teoria do corpo e cobertura, onde a estrutura é dividida em três regiões: 1) a cobertura, composta pelo epitélio e

pela camada superficial da lâmina própria; 2) região de transição, composta pelas camadas intermediária e profunda da LP (ligamento vocal); e 3) corpo, constituído pelo músculo vocal.

Desde então, diversos autores têm estudado a ultra-estrutura das pregas vocais e seus componentes, especialmente a LP. (Gray et al., 1993 ; Sato et al., 1998; Hammond et al., 2000; Ishii et al., 2000; Gray et al., 2000; Gray, 2000; Sato et al., 2002; Ximenes Filho et al., 2003; Melo et al., 2003; Buhler, 2008).

A LP é a estrutura mais importante da prega vocal, sendo responsável por sua vibração (Ishii et al., 2000), e essa capacidade vibratória é resultado de suas propriedades viscoelásticas (Sato, 1998).

A LP é composta pela MEC e por algumas células mesenquimais (fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos) (Catten et al., 1998).

A MEC é composta por proteínas fibrilares e intersticiais. As proteínas fibrilares são os colágenos e elastinas. Já as proteínas intersticiais preenchem os espaços entre as proteínas fibrilares. São os proteoglicans e as glicoproteínas. Essas proteínas aparentam ter influência na viscosidade, quantidade de água e tamanho tecidual, bem como no tamanho e densidade das fibras colágenas (Gray et al., 2000).

3.2 AS PROTEÍNAS FIBRILARES

As fibras que compõem a MEC podem ser elásticas, reticulares e colágenas. As fibras elásticas são formadas pela proteína elastina e por microfibrilas de fibrilina. Existem três tipos

de fibras elásticas: as fibras oxitalânicas, as fibras elaunínicas e as fibras elásticas maduras, sendo que cada uma delas representa uma fase distinta da elastogênese. As fibras oxitalânicas são as precursoras do fenômeno de elastogênese. São formadas por microfibrilas de fibrilina que são secretadas por fibroblastos existentes no meio extra-celular e que se dispõem paralelamente entre si. As fibras elaunínicas são fibras mais espessas que as precedentes, pois resultam da junção de elastina às microfibrilas. A elastina vai acumulando, formando fibras mais espessas, que são as fibras elásticas maduras (Montes, 1996; Junqueira; Carneiro, 2000).

As fibras colágenas e as fibras reticulares são ambas formadas por colágeno, diferindo umas das outras pelo arranjo e pela espessura de seus elementos fibrosos, isto é, o colágeno (Sato, 1998). As fibras colágenas são grossas e compostas por feixes de colágeno tipo I com até 20nm. As fibras reticulares são delgadas, com 1-4nm de espessura, formadas por colágeno tipo III (Montes, 1996, Junqueira; Carneiro, 2000).

3.3 COLÁGENOS

A palavra colágeno é um neologismo francês do século 19, utilizada para designar o constituinte do tecido conectivo que produzia cola (van der Rest; Garrone, 1991).

As proteínas mais abundantes da MEC pertencem à família dos colágenos. Uma característica comum a essas proteínas é a capacidade de formar polímeros altamente organizados. Por exemplo, o gene COL1A1 codifica uma cadeia chamada pro- α 1(I). Essa cadeia combina-se com outra cadeia pro- α 1(I) e ainda com outra cadeia pro- α 2(I) (produzida pelo gene COL1A2) para constituir a molécula de procolágeno tipo I. Essa molécula em forma de tripla hélice é processada por enzimas fora da célula formando fibrilas que se

conectam umas as outras. O resultado é uma rede de colágeno que propicia força de tensão e elasticidade ao tecido conjuntivo (Bhogal et al., 2005).

A família dos colágenos consiste em 26 proteínas geneticamente distintas (Bhogal, 2005). Os colágenos que são capazes de formar fibrilas são os do tipo I, II, III, V e IX. Outros colágenos formam redes (tipos IV, VIII e X), associam-se às superfícies de fibrilas (tipos IX, XII e XIV), ocorrem em proteínas transmembranas (tipos XIII e XVII), ou forma filamentos periódicos de 11-nm (tipo VI) (Hulmes, 2002).

- Colágeno Tipo I - é o mais comum da família dos colágenos e constitui as fibras colágenas; aparece nos tendões, na cartilagem hialina, ossos, pele e numerosos tecidos conjuntivos. Sua principal função é prover resistência e elasticidade ao tecido conjuntivo. Na prega vocal, Melo (2003) identifica a presença de colágeno tipo I na camada mais profunda da LP, próximo ao músculo vocal bem como superficialmente, junto ao epitélio. Esses achados são corroborados pelos estudos de Buhler (2008).

- Colágeno Tipo II - é produzido por condrócitos, aparece na cartilagem hialina e na cartilagem elástica. Não produz feixes. Presente nos discos intervertebrais, olhos e cartilagem.

- Colágeno Tipo III - constitui as fibras reticulares. Está presente especialmente em órgãos e regiões de flexibilidade e elasticidade, como pele, bexiga, aorta e pulmões. Gray (1993) evidencia que o colágeno tipo III predomina na lâmina própria da prega vocal. Esses achados são corroborados pelos trabalhos de Hahn (2006) e Tateya (2006).

- Colágeno Tipo IV - aparece na lâmina basal, um dos componentes da membrana basal dos epitélios. Presente nas lentes da cápsula ocular, glomérulos.

- Colágeno Tipo V - está presente nos ossos, tendões e sangue.
- Colágeno Tipo VI - está presente no sangue, camada íntima da placenta.
- Colágeno Tipo VII - está presente nas membranas corioamnióticas.
- Colágeno Tipo VIII - é endotélio.
- Colágeno Tipo IX - está presente na cartilagem, córnea e retina.
- Colágeno Tipo X, XI e XII - está presente na cartilagem.

3.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO EM CORTES HISTOLÓGICOS

O corante Sirius Red para estudo do colágeno tem sido utilizado desde 1964. O princípio de sua utilização baseia-se na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante Sirius Red, de natureza ácida (Sweet; Rosenthal; 1964; Junqueira et al., 1979a,b). Esta reação cora em tons de vermelho as estruturas colágenas quando utilizada luz convencional. A técnica Sirius Red cora igualmente colágenos intersticiais, endoteliais e da membrana basal. Essa característica deve-se a semelhança entre a quantidade de moléculas corantes que se ligam aos diferentes tipos de colágeno (cerca de 126 moléculas por molécula de colágeno). Isso pode ser observado pelo fato de que todos os colágenos apresentam coloração vermelha e há similaridade entre cores equivalentes (variação de $\pm 10\%$) encontradas em tecidos contendo diferentes quantidades e tipos de colágenos. Além disso, essas diferenças entre cores equivalentes indicam que o grau

de polimerização e a estrutura tridimensional das proteínas fibrilares também influenciam na ligação das moléculas corantes.

As moléculas alongadas do corante Sirius Red, quando reagem com as moléculas do colágeno ricas em aminoácidos básicos, promovem um aumento na sua birrefringência, devido ao fato de que muitas das moléculas corantes alinham-se paralelamente ao eixo das moléculas de colágeno. Dessa forma, Junqueira et al. (1978a, b) postulou que os tipos de colágenos poderiam ser diferenciados em função de suas diferentes birrefringências quando corados com Sirius Red e observados sob luz polarizada. Seus resultados demonstraram que o colágeno tipo I (componente das fibras espessas chamadas de fibras colágenas) apresentava-se como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de coloração vermelha, alaranjada ou amarelada, ao passo que o colágeno tipo III (principal componente das fibras reticulares) formava finos feixes, fracamente birrefringentes, de coloração esverdeada ou amarelo-esverdeada (Junqueira et al., 1979a, b)

Entretanto, Leon e Rojkind (1985) observaram que o grau de polimerização e a estrutura tridimensional das proteínas fibrilares também influenciam na ligação das moléculas corantes, conseqüentemente na cor resultante.

Dayan et al. (1989), estudando diferentes tipos de colágeno através do método picrossirius-polarização, observaram que não apenas a espessura das fibras de colágeno influenciam no padrão de polarização, mas também a densidade dos feixes, visto que moléculas de colágeno densamente agrupadas apresentavam cores também vermelhas ou amarelo-alaranjadas.

Esses aspectos relacionados à especificidade do método picrossírius-polarização para determinar os tipos de colágenos poderiam influenciar nos resultados de estudos do colágeno em pregas vocais, visto que Tateya et al. (2006), observaram, através de método imunoistoquímico, uma configuração atípica das proteínas fibrilares na LP de pregas vocais humanas. No tecido conjuntivo frouxo de mamíferos, as fibras com maior diâmetro são predominantemente formadas por colágeno tipo I, enquanto fibras mais finas, chamadas reticulares, são constituídas principalmente por colágeno tipo III. Entretanto, na LP das pregas vocais, os autores observaram que os feixes maiores são formados predominantemente pelo colágeno tipo III. Essa diferença poderia ser a maior característica histológica da LP que ajudaria a explicar a propriedade de vibração das pregas vocais.

Com o advento da imunoistoquímica, as técnicas de detecção e quantificação de moléculas específicas, como os tipos de colágeno, foram aprimoradas, tendo em vista principalmente sua especificidade. O marco inicial da imunoistoquímica foi o trabalho publicado por Coons et al. (1941), onde os autores descreveram uma técnica de imunofluorescência para detecção de antígenos celulares. Desde então a imunoistoquímica tem sido uma valiosa ferramenta de trabalho e pesquisa.

As bases da imunoistoquímica são simples e agrupam três disciplinas científicas: imunologia, histologia e química. O princípio fundamental por trás da imunoistoquímica está na ligação de anticorpos específicos à antígenos nas secções histológicas, e sua demonstração através de reações de coloração histoquímicas visíveis ao microscópio, tanto com luz convencional quanto com fluorocromos em luz ultravioleta. Embora o conceito seja simples, a metodologia tem se tornado cada vez mais complexa, a fim de aumentar progressivamente a sensibilidade e especificidade (Ramos-Vara, 2005).

Os estudos para determinação da distribuição dos tipos de colágenos e outros componentes da MEC na LP das pregas vocais têm utilizado os métodos imunistoquímicos (Hahn et al., 2006; Tateya et al., 2006; Buhler, 2008). Além disso, os estudos sobre o comportamento das proteínas fibrilares e intersticiais no processo de cicatrização têm sistematicamente utilizado esse método (Thibeault et al., 2002; Hirano et al., 2003; Thibeault et al., 2003; Rousseau et al., 2004; Hirano et al., 2004).

Dessa forma, o método histoquímico Sirius Red possui limitações já anteriormente expostas para determinação dos tipos de colágenos presentes em uma secção histológica, porém, por sua alta afinidade com as moléculas de colágeno, torna-se um método bastante sensível e específico para estudo do colágeno total através da morfometria, sem a necessidade de utilização da luz polarizada (Araujo et al., 2008; Egging et al., 2007). Além disso, é um método simples e barato, já bastante sedimentado em nosso meio (Montes, Junqueira, 1991; Melo et al., 2003; Melo, 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005, Socher, 2009; Campagnolo, 2009).

3.5 O COLÁGENO NAS PREGAS VOCAIS HUMANAS

O colágeno é um importante constituinte da MEC nas pregas vocais humanas, respondendo por cerca da metade de todas as proteínas da LP (Hahn et al., 2006). Nas pregas vocais, o colágeno é responsável por prover resistência à tensão e manter a geometria tecidual (Gray et al., 2000; Tateya et al., 2006).

A identificação e distribuição dos tipos de colágeno na LP têm sido investigados por diversos autores. Hirano (1981) descreveu os componentes de suas camadas encontrando

fibras colágenas finas na camada superficial, e fibras colágenas mais densas na camada profunda. Na camada intermediária, o autor encontrou um predomínio de fibras elásticas entrelaçadas com algumas fibras colágenas.

Gray et al. (1993) revisaram a estrutura celular e molecular da prega vocal humana evidenciando a predominância de colágeno tipo III na LP.

Ishii et al., (1996), estudando pregas vocais através de microscopia eletrônica de varredura, encontraram agrupamentos de fibras colágenas e finas fibras elásticas na camada superficial da LP. Na camada intermediária, os autores encontraram espessos feixes de fibras colágenas e elásticas correndo longitudinalmente, associados a finas fibras elásticas. Na camada profunda, observaram densos feixes de colágeno com fibras elásticas.

Sato (1998), também utilizando microscopia eletrônica de varredura, estudou as fibras reticulares em 3 dimensões (3-D), tendo em vista que seus trabalhos prévios que haviam revelado que o colágeno tipo III era o tipo predominante na LP (Gray et al., 1993), e que esse colágeno possui um arranjo fibrilar delgado, tradicionalmente conhecido como fibras reticulares. O autor encontrou fibras reticulares nas camadas superficial (mais abundante) e intermediária da lâmina própria. Observou que as fibrilas formam uma delicada rede em 3-D, sendo que os espaços entre as fibrilas são relativamente grandes. Glicoproteínas e proteoglicans situaram-se ao redor das fibras reticulares, bem como as fibras elásticas. Esse conjunto em 3-D teria grande importância para a manutenção estrutural e nas propriedades viscoelásticas, especialmente da cobertura da prega vocal.

Hammond et al. (2000) estudaram a distribuição das fibras colágenas na LP de pregas vocais humanas provenientes de necropsias de crianças, adultos e idosos de ambos os sexos, através da análise histomorfométrica de lâminas coradas com ácido pícrico. Os autores observaram que além de uma faixa superficial de colágeno, imediatamente abaixo do epitélio em todos os grupos etários, a maioria das fibras colágenas encontrava-se na camada profunda da LP. Notaram ainda que houve aumento na quantidade de colágeno nos adultos em relação à população pediátrica estudada, bem como aumento dessa quantidade quando comparados os gêneros na população adulta e geriátrica, sendo encontrado mais colágeno no sexo masculino. Entretanto, não foi observado diferença quando comparados adultos com a população geriátrica estudada, sendo que os autores ponderam essa ausência de diferença estatística em função do tamanho de sua amostra (18 adultos e 10 idosos).

Em trabalho semelhante, também no ano de 2000, Ishii et al. estudaram o desenvolvimento das fibras do tecido conjuntivo na LP de pregas vocais provenientes de autópsias de fetos a partir de 20 semanas gestacionais até adultos jovens de 22 anos de idade. Observaram que em fetos e neonatos há áreas esparsas e densas de fibras colágenas e elásticas, não sendo identificado o ligamento vocal. Em indivíduos de 5 anos de idade, uma área densa foi encontrada nas mácula flava anterior e posterior, com fibras longitudinais em ter as máculas. Uma estrutura composta por camadas superficial e profunda foi observada em crianças maiores de 10 anos, e a estrutura em três camadas por volta dos 17 anos.

Sato et al., (2002) também estudaram as alterações das fibras colágenas nas pregas vocais humanas relacionadas à idade, através de microscopia óptica e eletrônica. Os autores compararam as pregas vocais de 2 adultos jovens com outras 10 laringes de pessoas com 70 a 97 anos, e encontraram um aumento nas fibras colágenas (colágeno tipo I), com aumento

também na densidade de seus feixes bem como diminuição nos espaços entre as fibras da camada superficial no grupo geriátrico. Notaram ainda uma diminuição nas fibras reticulares, que são formadas pelo colágeno tipo III, e que representam o tipo predominante nas camadas superficial e intermediária da LP. Com a diminuição dos espaços entre as fibras colágenas com a idade, há também decréscimo nas proteínas intersticiais, como os proteoglicans. Tendo em vista que um dos principais papéis dos proteoglicans é dar viscosidade ao tecido, tal diminuição poderia resultar em menor viscosidade nas pregas vocais de idosos. Além disso, as fibras elásticas, especialmente encontradas na camada intermediária da lâmina própria, também aparentam diminuir sua função com a idade, resultando numa menor elasticidade e capacidade de voltar à forma original (Sato; Hirano, 1997).

Em 2003, Ximenes Filho et al., através de estudo histomorfométrico, correlacionaram a espessura da LP com a idade e observaram uma diminuição da mesma com a idade, sugerindo que essa alteração poderia contribuir para o padrão vocal observado na população geriátrica.

Melo et al. (2003) estudaram o arranjo das fibras colágenas na LP de pregas vocais em 20 laringes humanas através do método picrossirius-polarização. Os autores observaram duas populações de fibras colágenas distribuídas em três camadas: duas camadas de fibras fortemente birrefringentes (então consideradas como colágeno tipo I) presentes uma delas numa porção imediatamente abaixo do epitélio e outra na porção mais profunda junto ao músculo vocal; e outra camada de fibras fracamente birrefringentes (consideradas como colágeno tipo III) localizada entre as camadas de fibras fortemente birrefringentes. Além disso, os autores observaram um arranjo característico das fibras denominado “cesta de vime”, que melhor explicaria a elasticidade da LP. Os autores ainda formulam hipóteses para

o papel biomecânico do colágeno na prega vocal: 1) a região profunda com fibras colágenas espessas (provavelmente colágeno tipo I) está em contato íntimo com o músculo vocal, o que favoreceria a transmissão da tensão gerada pelo músculo ao ligamento vocal; 2) a região intermediária consiste em fibras finas (provavelmente colágeno tipo III) e aparenta ser o elemento vibrátil da estrutura; 3) a estreita faixa superficial próxima ao epitélio, que também consiste em fibras espessas (provavelmente colágeno tipo I), permitiria a transmissão da energia do músculo vocal para o epitélio, bem como do epitélio para as camadas mais profundas da LP.

Hahn et al. (2006) estudaram, através da coloração com picrossirius e métodos imunistoquímicos, a distribuição de colágenos tipo I, II, III e IV em pregas vocais humanas, de cães, porcos e furões. Além disso, os autores estudaram o procolágeno tipo I e matriz metaloproteinase-1, marcadores estes da síntese e degradação de colágeno. Os autores observaram que a proporção de colágeno em humanos correspondeu a 43% das proteínas totais da LP, e que em homens houve concentração 30% maior de colágeno em relação às mulheres, corroborando os achados de Hammond et al. (2000). Analisando a concentração de colágeno na LP, os autores notaram que a LP dos cães era mais semelhante à LP humana. Entretanto, a distribuição do colágeno na LP dos porcos foi mais semelhante à distribuição na LP humana. Sob esse aspecto, estudos com cães e furões teriam a limitação relacionada à distribuição do colágeno. Em relação ao procolágeno tipo I, que pode ser utilizado como marcador da síntese colágena, o mesmo foi mais observado na porção mais superficial da LP em humanos e porcos, sugerindo uma maior renovação do colágeno nessa região. Em relação ao colágeno tipo IV, novamente o porco mostrou maior similaridade na distribuição. A matriz metaloproteinase-1, que está relacionada à degradação do colágeno em seu processo de

renovação, foi curiosamente observada nas regiões onde houve menor densidade de procolágeno tipo I, fato que não foi totalmente compreendido.

Tateya et al. (2006) estudaram, através de métodos imunistoquímicos, a presença e distribuição de colágenos tipo I, III, IV e V e elastina em pregas vocais humanas provenientes de 5 cadáveres de menos de 65 anos. Os autores observaram que o colágeno tipo III foi predominante em toda a LP, formando fibras onduladas tanto finas quanto grossas. Seus achados foram semelhantes aos de Gray et al. (1993), sugerindo que o colágeno tipo III é o principal colágeno que auxilia a manter a estrutura da LP, permitindo sua flexibilidade e elasticidade. Além disso, a distribuição do colágeno tipo I foi observada na região próxima a membrana basal e na camada profunda da LP, como previamente reportado por Melo et al. (2003). Os autores ainda discutiram a respeito das fibras colágenas e reticulares. No tecido conjuntivo frouxo de mamíferos, as fibras com maior diâmetro são predominantemente formadas por colágeno tipo I, enquanto fibras mais finas, chamadas reticulares, são constituídas principalmente por colágeno tipo III. Entretanto, na LP essa constituição não é típica, onde os feixes maiores são formados predominantemente pelo colágeno tipo III. Essa diferença poderia ser a maior característica histológica da LP que ajudaria a explicar a propriedade de vibração das pregas vocais.

Sivasankar e Ivanisevik (2007), utilizando microscópio de força atômica, estudaram pregas vocais de porcos e observaram a presença de colágeno denso e abundante na camada profunda da lâmina própria, de superfície heterogênea, que poderia ser decorrente da combinação de colágenos do tipo I e III.

Buhler (2008) estudou a distribuição de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal de fetos e adultos através de estudo histomorfométrico com métodos histoquímico e imunoistoquímico. O versican é uma proteína intersticial pertencente a classe dos proteoglicanos e tem a habilidade de regular o conteúdo de água nos tecidos afetando assim sua elasticidade. O autor observou que o colágeno tipo I encontrava-se em menor quantidade na camada intermediária da LP em comparação com as camadas superficial e profunda. O colágeno tipo III foi encontrado em menor quantidade na camada intermediária quando comparado com a camada profunda, porém não houve diferença na camada superficial. Houve menor densidade de versican na camada superficial em relação às demais camadas. Houve ainda uma correlação positiva da densidade de versican e de colágeno tipo III.

3.6 A INCOMPETÊNCIA GLÓTICA E SEU TRATAMENTO

A incompetência ou insuficiência glótica caracteriza-se pela perda da capacidade de fechamento glótico durante a fonação. As causas da incompetência glótica podem ser decorrentes de alterações da mobilidade das pregas vocais, como nos casos de paralisia, subluxações cricoaritenóideas, distrofias e atrofia muscular, bem como alterações na lâmina própria das pregas vocais, como sulcos, cicatrizes e atrofia. A apresentação clínica consiste basicamente em disfonia caracterizada pela voz soproza, áspera, fraca, com diminuição da extensão vocal e por vezes afonia. O diagnóstico é dado pela laringostroboscopia, que pode revelar além da falha de coaptação glótica, alterações nas características da onda mucosa (Damrose; Berke, 2003).

As incompetências glóticas decorrentes de alterações de mobilidade costumam resultar em fendas glóticas maiores e são melhores tratadas com técnicas de medialização da prega vocal. Os sulcos e cicatrizes afetam primariamente a onda mucosa e constituem um desafio para o restabelecimento da LP e conseqüentemente da onda mucosa.

A partir do século vinte, vários procedimentos cirúrgicos surgiram para a reabilitação da competência aerodinâmica e valvular da glote. O tratamento fonocirúrgico da disфонia paralítica começou com a injeção de substâncias no espaço paraglótico com objetivo de medializar a prega vocal paralisada.

As técnicas de injeção foram introduzidas por Bruennings em 1911 para paralisia unilateral de prega vocal, tendo o próprio autor desenhado uma seringa para a realização do procedimento (Bruennings, 1911). O material usado foi a parafina, que seria em seguida abandonada devido a reações de corpo estranho chamadas de “parafinoma” (Bradenburg, 1992).

Na década de 60, Arnold (1962, 1963) retomou as técnicas de injeção de materiais heterólogos nas pregas vocais com o uso do teflon. O mesmo acreditava que a substância ideal deveria: 1) apresentar boa tolerabilidade; 2) ser passível de passar pela seringa; 3) perdurar ao longo do tempo (Arnold, 1962; Arnold, 1963; Ford, 2008). Os resultados iniciais foram extremamente animadores, porém as reações de corpo estranho, a fibrose, a formação de granuloma e a possibilidade de extrusão inviabilizaram a manutenção do procedimento como tratamento definitivo (Sasai et al., 2005; Ford, 2008).

Na década de 70, Isshiki introduziu as técnicas de cirurgia do arcabouço laríngeo, conhecidas como tireoplastias. A tireoplastia tipo I consiste na medialização da prega vocal através da colocação de implante de silicone, Gore-Tex[®] ou mesmo cartilagem autóloga no espaço paraglótico no intuito de restabelecer o fechamento glótico adequado (Isshiki, 1974; Zeitels et al., 2002) Apesar de ser um procedimento realizado geralmente com anestesia local, requer acesso externo com incisão cervical e ainda há discussão quanto a sua indicação relacionada à causa da incompetência glótica. Paralisias e grandes fendas glóticas seriam as melhores indicações, ao passo que defeitos menores e especialmente defeitos na mucosa como sulcos e cicatrizes seriam melhores tratados com técnicas de injeção ou mesmo de implante no espaço de Reinke (Rihkanen, 1998; Isshiki, 2000; Remacle; Lawson, 2001; Giovanni et al., 2007; Reijonen et al., 2009).

Sendo assim os implantes biológicos obtiveram seu espaço. Inicialmente, Ford (1984) utilizou colágeno bovino (Phonagel[®], Zyplast, McGhan Medical Corp. Santa Barbara, CA). Apesar de reações alérgicas ao colágeno bovino serem raras, o receio de utilizar produtos de origem bovina aumentaram com os casos da doença de Creutzfeldt-Jakob (doença da vaca louca). Após, novos colágenos passaram a ser utilizados: autólogo (Vocalogen[®], Collagenesis, Beverly, MA) (Ford, 1995), homólogo (Courey, 2001) e colágeno autólogo (Alloderm[®], Cymetra, Life-Cell, Branchburg, New Jersey, EUA) (Pearl et al., 2002), cujas vantagens seriam maior durabilidade e eliminação de risco de resposta biológica. Remacle e Lawson (2007) revisaram as indicações, técnicas e resultados com o uso do colágeno microlizado (Cymetra) e concluíram ser adequado para tratamento da imobilidade de prega vocal com fenda glótica moderada, bem como para tratamento de sulcos, cicatrizes e presbifonia, podendo ser útil em casos de doença de Parkinson.

Além do colágeno, a hidroxiapatita e o ácido hialurônico (AH) têm sido estudados. A hidroxiapatita (Radiesse[®], formerly Radiance, Bioform, San Mateo, California), que é o componente mineral dos ossos, consiste em microesferas de hidroxiapatita de cálcio de 25 a 45 µm de diâmetro suspensas em gel de glicerina e carboxicelulose. Possui textura similar ao tecido frouxo e pode ser injetável. Tem se observado que há excelente biocompatibilidade com mínima migração tecidual (Chhetri et al., 2004; Owens, 2005).

O AH é um glicosaminoglicano de alto peso molecular presente na LP das pregas vocais. Possui propriedades viscoelásticas e regula a hidratação dos tecidos frouxos. Hertegard et al. (2002) comparou o AH (Hylan B[®] gel, Hylaform, Genzyme Biosurgery Inc.) com o colágeno bovino (Zyplast[®], Collagen Corporation, Palo Alto, CA) no tratamento de incompetência glótica decorrente de paresia unilateral, atrofia unilateral ou arqueamento bilateral. Os resultados mostraram que ambos os tratamentos foram seguros e melhoraram significativamente a voz, entretanto, os paciente tratados com Hylan B[®] gel mostraram melhores resultados nos parâmetros estroboscópicos avaliados e maior tempo máximo de fonação.

A gordura também foi amplamente utilizada, sendo esse material autólogo atualmente parte do arsenal de opções do cirurgião, com vantagens pelo risco mínimo de reações de hipersensibilidade e principalmente pela sua biodisponibilidade (Shindo et al., 1992). A gordura ainda pode ser injetada ou mesmo inserida na prega vocal (Mikaelian et al., 1991; Bradenburg et al., 1992; Shindo et al., 1996; Sataloff et al., 1997; Woo et al., 1999).

Mikaelian et al. (1991) e Bradenburg et al. (1992), tratando casos de paralisia de prega vocal unilateral através de injeção intracordal, obtiveram melhora significativa na voz

que se sustentou por 12 e 42 meses, respectivamente. Entretanto apenas a análise da voz foi utilizada como indicador de persistência da gordura. Hill et al.(1991) estimou que 20% a 50% da gordura injetada reabsorve. Assim, quantidades maiores que as necessárias para o fechamento glótico seriam recomendadas (Sataloff et al., 1999).

Laccourreye et al. (2003) publicou resultados a longo prazo da injeção intracordal para tratamento de paralisia unilateral de prega vocal, sob a perspectiva dos pacientes. Em um seguimento de 12 meses, os autores obtiveram 62,2% de taxa de sucesso. Entretanto, a impossibilidade de prever o volume de reabsorção da gordura e a duração dos resultados, associado com o alcance de bons resultados com a tireoplastia tipo I de Isshiki, levaram os autores a diminuir a utilização da gordura.

O uso da fásia muscular foi introduzido por Rihkanen em 1998. Ele descreveu um método de injeção através de corte da fásia em pequenos pedaços capazes de serem injetados no músculo tireoaritenóideo. Em seu estudo, nove pacientes foram submetidos a injeção da fásia lata para correção de incompetência glótica decorrente de paralisia de prega vocal. Nesse estudo não foi realizada correção além da necessária (*over-correction*). Todos os pacientes tiveram melhora do tempo máximo de fonação bem como referiram melhora por escala analógica de disfonia, sendo o tempo de seguimento de 10 meses. Tendo em vista a baixa taxa metabólica de seus elementos (matriz colágena e fibroblastos) e a grande biodisponibilidade, a fásia tem sido considerada como uma boa opção (Rihkanen, 1998, Tsunoda et al.,1999; Tsunoda et al., 2001; Giovanni et al., 2007).

Tsunoda et al. (1999) foi o primeiro a descrever o transplante autólogo de fásia para incompetência glótica. O autor descreveu sua técnica de transplante de fásia temporal em um

paciente que havia sido submetido a quatro procedimentos de injeção de colágeno bovino para corrigir a incompetência glótica decorrente de sulco vocal bilateral, tendo em vista que a melhora nesse caso com a injeção do colágeno bovino foi sendo efêmera após cada procedimento, durando de 1 a 2 meses. A cirurgia foi realizada inicialmente na prega vocal esquerda, e após 6 meses também na prega vocal direita. Com 7 meses de seguimento, o tempo máximo de fonação aumentou de 5 para 22 segundos.

Em 2000, Tsunoda e Niimi detalharam a técnica de transplante de fásia dividindo-a em dois tipos: Tipo-I, que consiste no implante da fásia em um bolsão submucoso, sendo utilizado para tratamento de sulco vocal; e Tipo-II, onde o bolsão é confeccionado dentro do músculo vocal, sendo esse tipo de procedimento reservado para casos onde não é possível confeccionar o bolsão submucoso em função de aderência severa da mucosa. Nesse artigo os autores ainda relatam dois casos de insucesso, sendo um deles decorrente de extrusão total, sugerindo que é necessária a sutura após o implante da fásia em bolsões dentro do músculo vocal, para prevenir a extrusão. Os autores descrevem ainda um instrumento denominado “knot-pusher” (empurrador de nó) desenhado para facilitar a confecção da sutura.

Em 2001, Tsunoda et al. publicaram seus resultados com o transplante de fásia a longo prazo. Nove pacientes foram submetidos ao procedimento Tipo-I e outros 3 pacientes ao Tipo-II, com seguimento de 1 a 3 anos. Os autores observaram uma melhora progressiva no tempo máximo de fonação e a estroboscopia mostrou melhora na coaptação glótica principalmente nos primeiros 3 meses. Essa melhora progrediu nos meses subseqüentes em todos os casos operados com a técnica tipo-I e em 2 dos 3 pacientes operados com a técnica tipo-II. Os autores especularam a possibilidade de que o transplante de fásia levaria a

regeneração do tecido vocal, funcionando como transplante de células-tronco como em outros órgãos.

Contrapondo os resultados publicados por Rihkanen (1998) e Tsunoda (1999), Rodgers et al. (2000) publicaram um estudo experimental em cães utilizando injeção de fásia temporal em pregas vocais previamente paralisadas por lesão ao nervo laríngeo recorrente. Nesse estudo, os autores analisaram as pregas vocais após 3 a 12 meses da injeção de fásia, não evidenciando a presença da mesma nos cortes histológicos, sugerindo então que a fásia não seria um bom bioimplante a curto e longo prazo.

Duke et al. (2001) compararam o rendimento dos implantes de fásia e gordura em estudo experimental em cães, e observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois implantes após 12 semanas. Ainda nesse estudo, os autores publicaram seus resultados preliminares com a injeção de fásia em 40 pacientes com arqueamentos, paresias, paralisias e cicatrizes. Trinta e oito pacientes reportaram melhora da voz.

Reijonen et al. (2001) estudaram a histologia das pregas vocais de cães submetidos à injeção de fásia unilateral associada a secção do nervo laríngeo recorrente ipsilateral. Um total de 9 cães foram operados, sendo que 2 foram sacrificados com 3 dias, um animal foi sacrificado com 10, e dois grupos com 3 animais cada foram sacrificados 6 e 12 meses após o procedimento. Foram realizadas secções histológicas coradas com HE e van Gieson, e analisadas por um patologista acerca da morfologia geral do enxerto, neovascularização, remodelamento do colágeno e quantidade de fibroblastos, bem como inflamação, edema e hemorragia. Também foi avaliada a formação de reação de corpo estranho decorrente da

presença de fragmentos do disco de poliamida usado de suporte para preparar a fásia. Os autores concluíram que a injeção de fásia autóloga gerou reação inflamatória moderada, sem formação de granulomas ou inflamação crônica, demonstrando a segurança do procedimento.

Nishiyama et al. (2006) relataram seus resultados com implante de fásia temporal através de uma técnica modificada, que consiste em implantar a fásia próxima ao processo vocal da cartilagem aritenoide para promover a medialização da prega vocal paralisada. Nessa técnica os autores também realizam a sutura do bolsão com fio absorvível, para prevenir a extrusão do implante. Após o seguimento de 1 ano, houve melhora do tempo máximo de fonação nos oito pacientes operados.

Reijonen et al. (2009) publicaram seus resultados a longo prazo (3 a 10 anos) com a injeção de fásia para paralisia unilateral de prega vocal em um total de 94 pacientes. Análises acústica computadorizada e perceptual da voz foram realizadas, bem como exame clínico e laringostroboscópico. Os resultados a longo prazo foram estáveis. Embora a maioria dos valores dos parâmetros vocais foram significativamente melhorados, resultados individuais foram difíceis de prever, possivelmente relacionados ao rendimento variável dos enxertos. Os autores concluíram que incompetências glóticas amplas não devem ser tratadas com injeção de fásia. Entretanto a fásia é um enxerto estável e mais adequado para incompetências glóticas menos severas.

3.7 MODELOS ANIMAIS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

As pesquisas na área da Laringologia, principalmente em relação ao processo de cicatrização e fibrose, têm sido desenvolvidas principalmente em modelos experimentais em

animais (Hansen; Thibeault, 2006). A compreensão dos processos biológicos que envolvem a cicatrização e a fibrose pode levar ao desenvolvimento de abordagens sistemáticas e objetivas que poderão interferir positivamente nesses processos.

Kurita et al. (1995) estudaram a LP de 10 espécies de animais diferentes, com o objetivo de compará-las com a estrutura em camadas da prega vocal humana, descrita por Hirano (1975). Cão, cavalo, macaco, porco, coelho, cobaia, boi, rato e ovelha foram os animais estudados, sendo analisadas 5 laringes de cada. Cortes histológicos transversais no ponto médio da porção membranosa foram corados com hematoxilina-eosina (HE), van Gieson, Azan e Weigert, procurando avaliar as densidades de fibras colágenas e elásticas, bem como a espessura da mucosa. Em relação às pregas vocais dos coelhos, os autores observaram que a LP poderia ser dividida em 2 camadas, sendo a camada superficial pobre em componentes fibrosos, ao passo que a camada profunda apresentava-se densa em fibras elásticas e colágenas. Os autores ainda descrevem a LP como fina, sendo assim mais rígida, o que poderia interferir em estudos de fonação. A prega vocal que mais se assemelha estruturalmente com a humana entre os animais investigados foi a dos porcos, entretanto os autores referem que esse fato necessariamente represente que o porco é o melhor modelo experimental em estudos de fonação.

A partir de 2002, quando Thibeault et al. iniciaram seus estudos acerca do processo de cicatrização e fibrose em prega vocais, vários autores passaram a utilizar o coelho como modelo experimental para estudar as variações dos componentes da MEC em resposta à lesão tecidual aguda. Esses estudos resultaram em informações detalhadas tanto em relação às fases precoces (horas e dias) quanto às fases tardias (2 a 6 meses) do processo cicatricial nas pregas vocais dos coelhos, (Thibeault et al., 2003; Rousseau et al., 2004; Hirano et al., 2004; Branski

et al., 2005; Duflo et al., 2006; Rousseau et al., 2008), inclusive em estudos com fonação evocada *in vivo*, através de fluxo aéreo por traqueostomia e estimulação elétrica para promover adução das pregas vocais (Ge et al., 2009).

Em nosso meio, Carneiro (2005), Murta (2005) e Socher (2009) utilizaram o coelho como modelo experimental, reforçando as vantagens de ser um animal dócil, de fácil manejo anestésico, e de fácil cuidado e alojamento nos biotérios. Além disso, a técnica de laringofissura permitiu a realização dos procedimentos de enxerto da fáschia sem inconvenientes, (Carneiro; Scapini, 2009).

3.8 A CICATRIZAÇÃO

Os processos cicatriciais requerem uma série de eventos altamente organizados que compreendem a cascata de coagulação, inflamação, reepitelização, proliferação, deposição de matriz, angiogênese e contração da ferida. Juntos, esses processos resultam na restauração da integridade tecidual e funcional. A resposta inicial à lesão é o extravasamento dos componentes do sangue pelos vasos lesados, o que inicia a resposta inflamatória caracterizada pela liberação de mediadores químicos, citocinas e fatores de crescimento. Esses agentes possuem múltiplos papéis incluindo recrutamento de neutrófilos e monócitos ao tecido lesado através da quimiotaxia, e estimulação de queratinócitos e fibroblastos, levando-os a assumir fenótipo reparador (Hackam; Ford, 2002).

A deposição de componentes da MEC é uma etapa crítica da cicatrização, e é governada por citocinas liberadas pelos macrófagos, incluindo o TGF- β , que estimula os

fibroblastos a produzirem colágeno e portanto prover o arcabouço para a nova matriz (Hackam; Ford, 2002).

3.8.1 CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DA CICATRIZAÇÃO

Tendo em vista que a cicatrização é um complexo e dinâmico processo, diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento desse processo que possui fases tão interdependentes como a cicatrização.

Existem autores que dividem os processos biológicos da cicatrização em cinco fases principais: 1) coagulação; 2) inflamação; 3) proliferação; 4) contração da ferida; 5) remodelação (Fazio et al., 2000). Outros autores consideram três estágios no processo de cicatrização: 1) estágio inflamatório 2) fase de fibroplasia e deposição de MEC, 3) estágio de remodelação (Clark, 1993; West, 1998; Balbino et al., 2005).

3.8.2 A FASE INFLAMATÓRIA

A primeira reação do organismo frente ao dano tecidual consiste na formação de um coágulo. O início do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (por ex., liberação de citocinas). Qualquer que seja o evento desencadeante, o início da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), e sua exposição ao espaço intravascular (Franco, 2001).

Em indivíduos normais, níveis mínimos da forma ativada do fator VII da coagulação (FVIIa) estão presentes em circulação, correspondendo a aproximadamente 1% da concentração plasmática total de fator VII. O FVIIa é capaz de se ligar ao FT expresso em membranas celulares. Dessa forma, a exposição do FT ao plasma resulta na sua ligação ao FVII e FVIIa, formando o complexo FT-FVIIa. Esse complexo possui a capacidade de auto-ativação, ativando mais quantidade de FVII. O complexo FT-FVIIa tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação de FIXa e FXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina. A trombina é capaz de ativar o fator V em fator Va, e o fator VIII em fator VIIIa. Um complexo denominado “tenase” intrínseco, composto por fator IXa/fator VIIIa, converte o fator X em fator Xa. Outro complexo chamado “protrombinase”, composto por fator Va/fator Xa converte a protrombina em trombina. Um importante aspecto dessas reações é que o complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo FT-FVIIa. O produto principal das citadas reações, a trombina (FIIa), exibe atividades procoagulantes, convertendo o fibrinogênio em fibrina.

Além da polimerização da fibrina, a adesão plaquetária também tem papel fundamental na formação do coágulo. A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esse receptor possui sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina. O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da ativação e agregação plaquetárias (Ambrose; Weinrauch, 1996). Além disso, a plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase, que promove maior produção da trombina, a partir da protrombina, criando assim, condições para a amplificação

da adesão. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com proteínas da matriz extracelular somados à massa de corpos plaquetários agregados, ao se estabilizarem, formam uma matriz provisória. Esta se torna mais consistente à medida que a fibrina se polimeriza pelas vias intrínseca ou extrínseca da coagulação (Balbino et al., 2005).

A ativação da cascata da coagulação e a deposição das plaquetas resulta na formação de um trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este trombo, além de limitar a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz provisória que dará suporte para a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (Balbino et al., 2005). A interação da rede de fibrina com as proteínas da MEC, como colágeno e fibronectina, viabiliza a matriz provisória, possibilitando que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida, além das células inflamatórias (Clark et al., 1982; Clark, 2001).

Além de inúmeros mediadores químicos, a inflamação depende das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados. Ao final de um dia após a lesão eles constituirão 50% das células migradas ao local (Engelhard et al., 1998).

As próximas células que surgem na região são os macrófagos derivados de monócitos (segundo ao quinto dia) que, ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, é o elemento mais crítico na indução do processo de reparo (DiPietro, 1995). Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose, após fagocitá-los e processá-los nos fagossomas, apresenta seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares (DiPietro, 1995). Desta forma, a fagocitose destas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo. Além disso, é a célula mais eficiente na eliminação de fragmentos teciduais inclusive removendo pela fagocitose os neutrófilos que perderam função (Newman et al., 1992).

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos.

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias (Clark, 1998).

3.8.3 FASE FIBROBLÁSTICA E DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR

Os macrófagos, derivados de monócitos, e seus mediadores químicos liberados intensificam a migração e ativação dos fibroblastos. Esse processo é facilitado pela matriz provisória formada pelo coágulo (Balbino et al., 2005).

A matriz extracelular, que inicialmente era composta principalmente por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, passa por modificações em sua composição. Os fibroblastos passam a produzir grandes quantidades de fibronectina que, entre outras funções, promove a fixação da própria célula. Além da fibronectina, o AH, que é um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de se ligar à água, começa a ser produzido em grande quantidade, auxiliando na resistência do tecido à compressão. Esse ambiente propicia o reparo, pois esta combinação facilita a movimentação das células, necessária nesta etapa. À medida que o processo de maturação da ferida avança, a concentração de AH passa a diminuir ao passo que aumenta a síntese proteoglicanos e glicoproteínas. Essa modificação na composição da matriz extracelular diminui a mobilidade celular favorecendo a diferenciação para fenótipos mais maduros, então encarregados da produção principalmente do colágeno. Este processo é denominado de fibroplasia. O colágeno aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação (Mandelbaum et al., 2003; Balbino et al., 2005). Além de produzir colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (Gentilhomme, et al., 1999).

A fase final dessa etapa é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Num primeiro momento as células endoteliais migram para a

área ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (Mandelbaum et al., 2003).

3.8.4 REMODELAÇÃO

Essa é a última das fases. Ocorre no colágeno e na matriz, dura meses, e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. A neovasculatura diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular (Mandelbaum et al., 2003).

3.8.5 MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA CICATRIZAÇÃO

Na regulação das fases do processo de cicatrização estão envolvidos mediadores derivados da circulação (frações livres do complemento, fatores de coagulação, moléculas do sistema fibrinolítico e hormônios como os esteroidais, tireoidianos e a insulina), cininas (histamina, bradicinina e serotonina), mediadores peptídicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e estruturas da matriz extracelular) e mediadores lipídicos (eicosanóides e fator ativador das plaquetas). Há uma grande diversidade de natureza química, origem e forma de influência sobre as células. Nota-se ainda uma interdependência, e mesmo a redundância de efeitos também pode ser observada. Entretanto, alguns mediadores são críticos para um determinado evento e sua ausência termina por comprometer seriamente o reparo dos tecidos.

Dentre os mediadores, destaca-se o TGF- β . O TGF- β constitui-se de uma família de proteínas com três isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) que apresenta função de sinalização em processos como apoptose, ciclo celular e no sistema imunológico. A isoforma mais estudada da família é o TGF- β 1, que é liberado em grandes quantidades pelas plaquetas logo após a lesão tecidual. O TGF- β 1 possui diversas características funcionais, dependendo do tipo celular em questão. O TGF- β 1 exerce função quimioatraente para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Além disso, induz vários tipos celulares a produzir mais TGF- β 1 o que eleva sua concentração no foco inflamatório (Balbino et al., 2005).

No processo de cicatrização, os fibroblastos possuem papel chave na produção, deposição e remodelação da MEC, e o TGF- β 1 atua como fator mitogênico para fibroblastos, induzindo sua proliferação, migração e síntese dos constituintes da MEC, como colágenos tipo I e III e fibronectina. Assim, o TGF- β 1 tem sido considerado como a principal citocina no mecanismo de fibrose (Bhogal et al., 2005).

3.8.6 MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E A COLA DE FIBRINA

O coágulo fornece a matriz provisória para as fases de fibroplasia e deposição da MEC. Entretanto, além do suporte mecânico, a rede de fibrina e seus componentes (em especial o fibrinogênio e a trombina), interferem na regulação dessas fases, atuando principalmente sobre os fibroblastos, podendo influenciar o resultado final da cicatriz.

Cox et al. (2004) estudaram a proliferação de fibroblastos em diferentes formulações de coágulos de fibrina. Os autores observaram que houve menor proliferação em coágulos ricos em fibrinogênio e pobres em trombina, ao passo que formulações com menor

concentração de fibrinogênio e média/alta concentração de trombina resultaram em proliferação celular mais intensa.

Nien et al. (2003) procuraram determinar como a fibrina e seu precursor, o fibrinogênio, afetam a capacidade de fibroblastos da derme humana de contrair o colágeno no processo de cicatrização *in vitro*. Nesse estudo foi observado que o fibrinogênio inibe a contração do colágeno em uma razão dose-dependente direta. Além disso, não houve efeito nessa observação em função da presença dos outros componentes da cola de fibrina (Tisseel[®] Baxter AG, Vienna, Austria), nem na ação enzimática da trombina.

Kalomenidis et al. (2005) estudaram a indução de pleurodese em resposta à injeção intrapleural de TGF- β 3 em coelhos. Os autores quantificaram a expressão de RNAm de colágeno I pelas células mesoteliais pleurais *in vitro*, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Houve marcado aumento da expressão de RNAm de colágeno I em resposta à administração do TGF- β 3.

Saed et al. (2004) estudaram o efeito da cola de fibrina (Tisseel[®]) sobre a expressão de RNAm *in vitro* de TGF- β 1, fibronectina e colágenos tipo I e III em células mesoteliais de peritônio e fibroblastos de peritônio normal e de adesões. Observaram que houve redução nas expressões de TGF- β 1 RNAm e colágeno tipo I, bem como aumento na expressão de colágeno tipo III RNAm. Entretanto a ausência de aprotinina (inibidor de protease sérico) promoveu a redução na expressão de colágeno tipo III RNAm.

Gille et al. (2004), estudando padrões de migração, morfologia e viabilidade celular em diferentes colas de fibrina, também observaram diminuição de TGF- β 1 e 2 quando as

células eram expostas às apresentações comerciais dos selantes de fibrina, em comparação com colas parcialmente autólogas.

3.9 CICATRIZAÇÃO E FIBROSE NAS PREGAS VOCAIS

Fibroses nas pregas vocais resultam em rigidez e retrações da cobertura mucosa e representam uma das principais causas de incompetência glótica (Isshiki, 2000), levando a graus variados de disfonia, bem como representa também um dos principais desafios para o futuro (Hirano, 1995).

Em geral, acredita-se que a fibrose decorre do aumento da deposição de colágeno, principalmente do tipo I, porém novos estudos têm relacionado outros componentes da MEC, como AH, fibronectina e decorina, visto que o colágeno não é a única substância que determina as propriedades viscoelásticas dos tecidos (Hirano, 2005).

As características das proteínas fibrilares nos processos cicatriciais das pregas vocais começaram a ser estudados por Thibeault et al. (2002). Nesse trabalho, os autores procuraram caracterizar a histologia e a reologia da fibrose em pregas vocais. Em um modelo experimental em coelhos, foram realizadas lesões nas pregas vocais direitas com uma pinça saca-bocado e, 2 meses após, os animais foram sacrificados e suas pregas vocais excisadas para estudo histológico do colágeno, procolágeno, elastina e AH. Utilizando o método de Tricromo para coloração do colágeno, os autores observaram que houve uma diminuição em sua densidade e uma desorganização em sua distribuição, quando comparado com a prega vocal normal. O procolágeno I, precursor do colágeno utilizado como marcador de sua síntese e estudado através de método imunistoquímico, mostrou-se com densidade

significativamente maior no grupo lesado. Houve decréscimo na densidade de elastina nas pregas vocais lesadas. Em relação ao AH, os autores não encontraram diferenças no estudo. A análise reológica mostrou aumento significativo na rigidez das pregas vocais lesadas, tornando-as mais viscosas que o tecido normal.

Tendo em vista que a fibrose altera as propriedades viscoelásticas das pregas vocais, que tais propriedades são diretamente ligadas a distribuição em 3 camadas da MEC, e que os fibroblastos são primariamente os responsáveis pela síntese da MEC, Hirano et al. (2003) estudaram as alterações morfológicas e funcionais de fibroblastos provenientes de pregas vocais humanas causadas pelo Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF). O HGF possui potente atividade antifibrótica, inibindo a deposição de MEC, incluindo o colágeno, com potencial terapêutico em fibroses hepáticas e pulmonares. Obtendo pregas vocais de 2 pacientes que foram submetidos a laringectomia total por neoplasia avançada, os autores estudaram *in vitro* o efeito do HGF na produção de colágeno tipo I, fibronectina e AH pelos fibroblastos do espaço de Reinke e da mácula flava (visto que estudos prévios sugeriram diferenças importantes na ultraestrutura desses dois tipos de fibroblasto, podendo repercutir na síntese de DNA, crescimento e funcionalidade dos mesmos). Os autores observaram que os fibroblastos provenientes do espaço de Reinke foram mais suscetíveis aos efeitos do HGF, produzindo mais AH e menos colágeno tipo I, sugerindo que o HGF poderia ser útil na prevenção ou tratamento de cicatrizes fibróticas nas pregas vocais.

Seguindo a linha de pesquisa que procurou determinar as alterações na MEC decorrentes de lesões nas pregas vocais, e suas implicações, Thibeault et al. (2003) avaliaram as alterações nas proteínas intersticiais promovidas por lesão aguda nas pregas vocais de coelhos após 2 meses. Foram analisadas fibronectina, fibromodulina e decorina, através de

estudo histomorfométrico. A decorina, também conhecida como proteoglican II, é uma proteína intersticial que interage com as fibrilas colágenas, formando pontes que mantêm a posição e organização das mesmas. Ratos sem o gene da decorina possuem pele frágil e pobre organização do colágeno, e níveis diminuídos de decorina têm sido encontrados em cicatrizes hipertróficas. Além disso, a decorina interage com o TGF- β , implicado na síntese da MEC nos processos cicatriciais. Na prega vocal, a decorina tem sido encontrada na camada superficial da lâmina própria, sendo sugerido que sua presença seria uma das razões para menor fibrose quando apenas a camada superficial é lesada. A fibromodulina é um glicosaminoglicano que possui atividade inibitória sobre o TGF- β . Uma relação inversa tem sido demonstrada na expressão de fibromodulina e fibrose em modelos experimentais. Nas pregas vocais, está presente nas camadas superficial e profunda da LP. A fibronectina é uma glicoproteína relacionada à adesão de células e macromoléculas na MEC, funcionando como agente quimiotático e como suporte para migração fibroblástica. Sua capacidade de promover migração celular e síntese de MEC tem sido implicada no desenvolvimento da fibrose. Na prega vocal, a fibronectina é encontrada na região da membrana basal e na camada superficial da LP. Os autores observaram uma diminuição na densidade de decorina e fibromodulina nas pregas vocais lesadas, em contraste com a fibronectina que apresentou significativamente maior densidade nessas pregas vocais. Assim, a diminuição da fibromodulina favorece a atividade do TGF- β , que ativa a síntese de colágeno (em sua forma de procolágeno). A diminuição da decorina leva a desorganização das fibrilas, contribuindo para a fibrose. Visto que as 3 proteínas têm em comum a relação com o TGF- β , os autores sugerem que investigações acerca desse fator e sua interação com as proteínas intersticiais serão certamente realizadas.

Em 2004, Rousseau et al., do mesmo grupo de Thibeault, Bless, e Ford, caracterizaram a cicatriz no modelo experimental em coelhos, porém com 6 meses de evolução, novamente analisando as densidade de colágeno, procolágeno I, elastina e AH. Thibeault et al. (2002) já havia estudado as alterações desses componentes da MEC nesse modelo experimental, observando, após dois meses, diminuição na densidade de colágeno e elastina e aumento na densidade de procolágeno I. No presente estudo, os autores encontraram um aumento na densidade de colágeno nas pregas vocais lesadas, ao passo que o procolágeno e a elastina já se encontrava em níveis semelhantes em ambas as pregas vocais. Novamente, a densidade de AH não havia sido diferente nos grupos. Em relação às proteínas fibrilares, o colágeno, além da densidade aumentada, apresentou-se organizado em feixes espessos, em contraste com a elastina que se apresentou de forma desorganizada.

Hirano et al. (2004) novamente estudaram o efeito do HGF, porém desta vez e modelo animal *in vivo*. Utilizando um modelo de pesquisa com 20 coelhos, os autores produziram uma lesão em uma das pregas vocais através de uma pinça saca-bocado, sendo que 10 animais receberam injeção de HGF no sítio da lesão imediatamente após sua realização, ao passo que os demais receberam solução salina. Foram avaliadas as densidades de colágeno, elastina e AH, e as propriedades reológicas, e comparadas com as pregas contralaterais, não lesadas. Além disso, utilizando um dispositivo que permitiu simular a vibração das pregas vocais nas laringes excisadas, os autores estudaram a vibração das pregas vocais por meio de imagens capturadas através de uma câmera digital de alta velocidade. Após 6 meses, os autores não observaram diferenças nas densidades de colágeno, elastina e AH entre os lados tratados com HGF e os lados normais. Entretanto, no grupo controle, que não recebeu HGF após a lesão, houve significativo aumento na densidade de colágeno nas pregas vocais lesadas quando comparado com a prega vocal contralateral não lesada. Novamente, a densidades de elastina e

AH não foram diferentes, apesar de a elastina apresentar-se fragmentada e desorganizada. Em relação às características reológicas, houve rigidez e viscosidade significativamente maiores no grupo controle, em comparação com o grupo tratado com HGF. Não houve diferenças entre o grupo que recebeu HGF e um outro controle que não foi submetido às lesões. Em relação à vibração mucosa, os autores observaram um resultado melhor nos aspectos de limiar pressórico de fonação, amplitude de onda mucosa, fechamento glótico e eficiência vocal. Dessa forma, os autores concluem que o HGF mostrou ser útil na prevenção da fibrose em pregas vocais e na manutenção da viscoelasticidade.

Chhetri et al. (2004) estudaram a terapia de reposição celular utilizando fibroblastos autólogos na cicatrização de lesões nas pregas vocais de cães provocadas por *laser*. A terapia celular autóloga tem sido empregada com melanócitos em vitiligo, com queratinócitos em úlceras e queimaduras e com fibroblastos autólogos em rugas faciais. Os animais receberam fibroblastos cultivados provenientes de biópsia de mucosa oral, em 3 injeções com intervalo semanal, e foram sacrificados entre 22 e 39 semanas após a lesão induzida na prega vocal. Utilizando um modelo de fonação canino *in vivo*, os autores observaram uma melhora significativa nos parâmetros acústicos e na onda mucosa. Mais uma vez os autores observaram aumento na densidade de colágeno, bem como de fibroblastos, além de diminuição na densidade de elastina. Não houve diferença em relação ao AH.

Em 2005, Branski et al. estudaram o processo cicatricial em seus estágios iniciais em modelo experimental em coelhos. Os autores produziram lesões nas pregas vocais que foram analisadas através de cortes histológicos corados com tricromo Masson. Os animais foram sacrificados com 12 horas, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após a lesão. Um coágulo de fibrina foi identificado no primeiro dia. Proliferação celular massiva foi observada no dia 3,

provavelmente atribuída a células inflamatórias e fibroblastos. Hipertrofia das bordas da lesão e migração epitelial foram observadas, com cobertura epitelial primitiva. No quinto dia, a hipertrofia epitelial foi mais evidente, e a deposição de colágeno iniciou, bem como a formação de canais vasculares no interior da lâmina própria. A deposição de matriz colágena mais madura foi notada ao sétimo dia. A hipertrofia epitelial manteve-se, com substituição do epitélio necrótico por epitélio novo. Dez dias após a lesão, uma deposição densa e desorganizada de colágeno foi observada, já com cobertura epitelial completa. Houve pouca diferença entre os achados em 10 e 14 dias. Com 21 dias, a nova matriz já apresentou aspecto laminar, apesar de ainda não ter recuperado sua característica de dupla camada. Os autores sugerem que em função do intenso infiltrado celular ao terceiro dia, esse momento pode ser crítico no processo de cicatrização no sentido de interferir na resposta tecidual.

Ainda em 2005, Branski et al. avaliaram a capacidade do método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) em detectar, nas secreções das pregas vocais, marcadores inflamatórios, e descrever a resposta tecidual aguda a lesões em modelo experimental em coelhos. Inicialmente os autores revisam a cadeia de eventos da resposta inflamatória aguda após lesões. Após o extravasamento dos componentes sanguíneos dos vasos lesados, agentes quimiotáticos, citocinas e fatores de crescimento são liberados. Com isso, neutrófilos e monócitos são recrutados para o sítio da lesão, e queratinócitos e fibroblastos são estimulados, assumindo fenótipo reparador. Os macrófagos continuam seu trabalho limpando e debridando a ferida, bem como liberando citocinas quimiotáticas e proliferativas para os fibroblastos. Essas citocinas incluem o fator ativador de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF), fator de crescimento fibroblástico (*fibroblast growth factor* – FGF), e o TGF- β . Além disso, a interleucina-4 (IL-4), derivada dos macrófagos também promove a produção de colágeno pelos fibroblastos. Esse processo inicia-se tipicamente nas primeiras 24-48 horas após a lesão.

Nesse trabalho os autores quantificaram a presença de interleucina-1 β (IL-1 β) e prostaglandina-E2 (PGE-2) nas secreções junto às pregas vocais através de *swabs* de Gelfoam. A IL-1 β e a PGE-2 também são marcadores inflamatórios que podem ser detectados nas secreções, permitindo assim a realização de métodos menos invasivos para acompanhamento do processo inflamatório. Os autores observaram que houve marcado aumento nos níveis de IL-1 β , principalmente no primeiro dia, ao passo que a PGE-2 teve seu pico de elevação no sétimo dia, sugerindo que esses marcadores podem ser detectados através do método ELISA e possuem um padrão de expressão temporal, características que podem ser indicativos do processo de cicatrização.

Hansen e Thibeault (2006) publicaram uma revisão da literatura acerca dos aspectos até então estudados no processo de cicatrização das pregas vocais. Os artigos revisados abordaram principalmente as alterações nas proteínas fibrilares (colágeno e elastina) e intersticiais (decorina, fibromodulina, fibronectina, AH e Syndecan) da MEC, além do comportamento de fatores de crescimento como o TGF- β 1 e HGF. Especificamente em relação às proteínas fibrilares, o colágeno, como já descrito anteriormente, apresentou densidades menores ao segundo mês após a lesão, mostrando-se desorganizado, ao passo que no sexto mês houve aumento de sua densidade e organização em feixes espessos. O procolágeno-I teve aumento de densidade ao segundo mês, voltando aos níveis semelhantes aos níveis dos controles ao sexto mês. A elastina apresentou menor densidade ao segundo mês, voltando aos níveis normais ao sexto mês, porém mantendo-se desorganizada e fragmentada.

Visando o reparo tecidual das pregas vocais, Duflo et al. (2006) estudaram os efeitos do CarbylanTM-SX e do Carbylan-GSX na expressão de RNAm para o procolágeno-I,

fibronectina, fibromodulina, TGF- β 1, hialuronidase 2 (HAse 2) e ácido hialurônico sintetase 2 (HAS 2), bem como as características reológicas em modelo experimental de lesão aguda em pregas vocais em coelhos. Os animais foram submetidos a lesão bilateral nas pregas vocais, sendo que em um lado receberam as substâncias em estudo. O CarbylanTM-SX é um hidrogel semi-sintético derivado do AH, que quando injetado imediatamente após lesões nas pregas vocais, mostrou melhora na cicatrização e nas propriedades viscoelásticas, secundários a melhor deposição de colágeno. Entretanto os biomateriais derivados do AH limitam a ligação e migração fibroblástica, dificultando a regeneração tecidual nos casos de lesões. Nesse trabalho, os autores adicionaram ao derivado do AH (o CarbylanTM-SX) a gelatina, em concentrações de 2,5 a 20%), formando o Carbylan-GSX, que melhorou significativamente a adesão celular. Em relação à expressão de RNAm das proteínas acima citadas, os autores não observaram diferenças entre os grupos tratados e os controles, após 20/21 dias da lesão. Os autores comentam esse resultado como decorrente da avaliação ter sido realizada no final da terceira semana, quando esses marcadores já poderiam estar em níveis normalizados. Já os resultados reológicos mostraram que a diferença mais significativa foi encontrada nos coelhos que receberam o Carbylan-GSX com gelatina a 5%, sugerindo que esse material seria o mais promissor veículo para regeneração tecidual da prega vocal.

Tendo em vista que os marcadores estudados no trabalho anterior (RNAm de procolágeno-I, fibronectina e TGF- β 1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em 20/21 dias após a lesão, os autores estudaram esses marcadores em pregas vocais lesadas e tratadas ou não com Carbylan-GSX em 1, 3, 5 e 10 dias após a cirurgias nos coelhos. Nesse estudo os autores observaram uma aumento significativo na expressão dos marcadores de procolágeno-I, fibronectina e TGF- β 1 no 5º dia nas pregas vocais que receberam o Carbylan-GSX.

Partindo do princípio de que fatores de crescimento influenciam a síntese das proteínas da MEC pelos fibroblastos, podendo levar a melhorias na cicatrização e regeneração tecidual, Luo et al. (2006) estudaram os efeitos do HGF, FGF e TGF- β 1 na síntese de AH, colágeno, elastina e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) por fibroblastos humanos em uma matriz de hidrogel sintética tridimensional (3-D). À microscopia, os autores observaram que o TGF- β 1 aparentou induzir contração da matriz e agregação celular. Em relação ao volume da matriz, todos os fatores promoveram alguma diminuição no volume, entretanto apenas o TGF- β 1 promoveu redução significativa em relação aos controles ($35 \pm 1\%$). A população celular mostrou-se duas vezes maior nas matrizes estimuladas com FGF e três vezes maior com a estimulação do TGF- β 1. Baseando-se na avaliação da quantidade de hidroxiprolina, os níveis de colágeno apresentaram-se maiores em relação aos controles nas matrizes tratadas com TGF- β 1. Em contraste, os níveis de colágeno nas matrizes tratadas com HGF e FGF mostraram-se cerca de 1/3 menores. Os níveis de AH foram significativamente maiores com o tratamento do HGF que os controles, não acontecendo o mesmo com TGF- β 1 e FGF. Nenhum dos tratamentos resultou em produção de elastina, porém o FGF resultou em significativamente menor elastina que os demais. Apesar disso, o HGF mostrou uma regulação positiva na expressão genética relacionada à elastina, em uma avaliação complementar da expressão genética. Em relação aos GAGs, os resultados foram similares aos resultados do colágeno, com aumento pelo TGF- β 1 e diminuição com HGF e FGF. Os autores concluíram que o HGF aparentou ser a melhor opção para estímulo de produção de AH e elastina, os quais podem ser essenciais para restauração da LP.

Em 2008, Rousseau et al. estudaram a expressão de genes após lesão aguda em pregas vocais de coelhos. O RNAm de matriz metaloproteinase-1 (MMP-1), matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), colágeno tipo I e colágeno tipo III foi quantificado após 2, 4, 8,

24, 48 e 72 horas após a lesão. A MMP-1 é uma colagenase intersticial que regula o metabolismo do colágeno tipo I e III. A MMP-9 apresenta papel importante na remodelação da MEC, tendo como substratos os colágenos IV, V, elastina e fibronectina. Em estudo anterior, os autores já haviam observado o aumento da MMP-1 em um modelo experimental de fonação em coelhos, observando os efeitos do processo dinâmico da fonação na expressão gênica. No presente estudo, os autores observaram um aumento significativo na expressão de RNAm para o colágenos I após 72 horas quando comparadas as primeiras 2 e 4 horas. O colágeno III também evidenciou aumento em sua expressão após 72h quando comparadas com 2, 4 e 8 horas. Tanto a MMP-1 quanto a MMP-9 apresentaram aumentos significativos. O aumento das expressões de RNAm dos colágenos I e III, principalmente nas 72 horas, parece coincidir com o infiltrado celular intenso observado por Branski et al. (2005) no terceiro dia após a lesão, novamente sugerindo que esse período aparenta ser importante para terapias no sentido de minimizar eventual fibrose. Em relação a fibronectina, os autores observaram aumento na expressão do RNAm comparando 2 horas com 24, 48 e 72 horas após a lesão. Novamente sua expressão aumentada correlaciona-se com o infiltrado celular intenso no terceiro dia, visto que é sintetizada por fibroblastos, monócitos e células endoteliais. Sabendo que a fibronectina desempenha papéis na migração celular, contração da ferida e reepitelização, sua regulação positiva prolongada pode levar a excessiva deposição de MEC e fibrose.

3.10 MÉTODOS DE SUTURA EM MICROCIURURGIA LARÍNGEA

Tradicionalmente os métodos de fixação de retalhos e enxertos em cirurgia laríngea e na fonocirurgia são relacionados às técnicas de sutura (Figura 1).

Woo et al. (1995) relacionaram as vantagens do reparo primário das feridas cirúrgicas nas pregas vocais: a) o fechamento dos defeitos da prega vocal com sutura permitem a cicatrização em primeira intenção; b) suturas podem reparar as feridas cirúrgicas e manter a força tênsil no sítio da incisão até o reparo tecidual completar-se; c) as suturas permitem ao cirurgião reposicionar a cicatriz da borda livre para a face vestibular da prega vocal, distante da área vibrátil; d) defeitos na mucosa podem ser fechados com o uso de suturas e micro retalhos. Até então, os aspectos relacionados à técnica, utilidade e segurança não haviam sido explorados. Nesse estudo, 18 pacientes com lesões benignas de laringe foram submetidos a ressecções endolaringeas, e a indicação principal da sutura foi a aproximação das bordas das feridas. Nenhum paciente teve piora da voz. Os autores concluíram que a sutura deve fazer parte do arsenal de técnicas em cirurgias endolaringeas, em lesões benignas e malignas.

Nesse contexto, Fleming et al. (2001), em um estudo experimental em pregas vocais de cães, corroboraram as vantagens do reparo primário das feridas cirúrgicas, observaram menor fibrose em pregas vocais cujo micro retalho mucoso foi suturado, em contraste com a cicatrização por segunda intenção.

Em 2000, Tsunoda e Niimi detalharam a técnica de transplante de fáschia que havia sido publicada no ano anterior (Tsunoda, 1999). Na técnica denominada Tipo-II, um bolsão é confeccionado dentro do músculo vocal, tendo em vista a impossibilidade de confeccionar o bolsão submucoso em função de aderência severa da mucosa. Nesse artigo os autores relatam dois casos de insucesso, sendo um deles decorrente de extrusão total, sugerindo que é necessária a sutura após o implante da fáschia em bolsões dentro do músculo vocal, para prevenir a extrusão. Os autores descreveram ainda um instrumento denominado *knot-pusher* (empurrador de nó), desenhado para facilitar a confecção da sutura (Figura 2).

Nishiyama et al. (2002) publicaram um estudo comparativo de técnicas de sutura em fonocirurgia. Os autores reportaram 4 técnicas, sendo 3 delas utilizando instrumentos desenhados por seus autores para levar o nó do fio até o ponto a ser suturado (Figura 2).

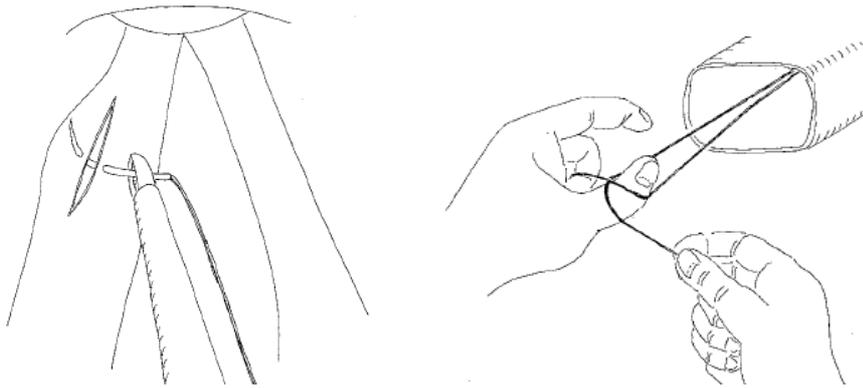


Figura 1. Sutura da prega vocal e execução do nó fora do laringoscópio de suspensão. Fonte: Nishiyama, 2002.

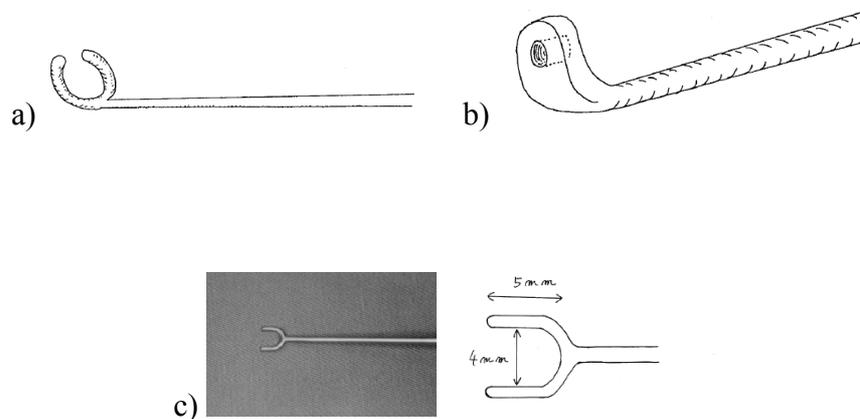


Figura 2. Instrumentos para empurrar o nó nas suturas endolaringeas: a) Tsunoda; b) Kitahara; c) Nishiyama. Fonte: Nishiyama, 2002.

Além desses instrumentos para realizar a sutura, os autores apresentam a técnica descrita por Yumoto, onde o nó é realizado dentro do laringoscópio, sugerindo que o método provoca menos tensão durante sua execução, porém requer maior prática (Figura 3).

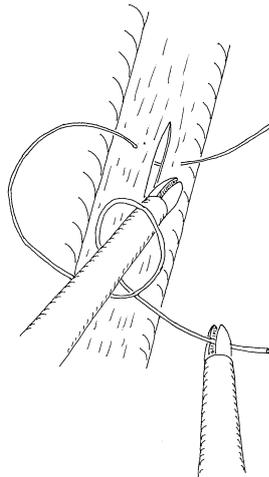


Figura 3. Confecção do nó dentro do laringoscópio de suspensão. Fonte: Nishiyama, 2002.

Tsuji et al. (2009) publicaram uma elegante técnica de sutura em microcirurgia laríngea, também realizada inteiramente dentro do laringoscópio e sem a necessidade de auxiliar. Aproximadamente a 1 cm da ponta do fio (no caso Vicryl[®] 7-0) é preso um pequeno pedaço de fio de mononylon 4-0, que serve para reparar o Vicryl[®] durante a confecção do nó. Pinças curvas tipo jacaré são utilizadas, sendo que o autor (Tsuji) desenhou uma pinça com curvatura de 90° (maior que as habituais) a fim de facilitar a confecção do nó (Figura 4).

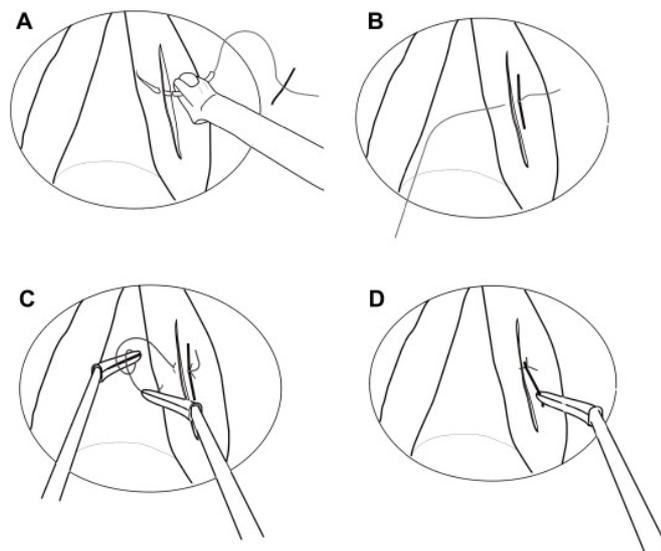


Figura 4. Sequência da confecção da sutura endolaríngea pela técnica de Tsuji. Fonte: Tsuji, 2009.

3.11 A COLA DE FIBRINA

O mecanismo de ação da CF é baseado nas reações da cascata de coagulação, cujo passo final é a conversão de fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina, e a ligação dos monômeros de fibrina em uma rede insolúvel (Figura 5).

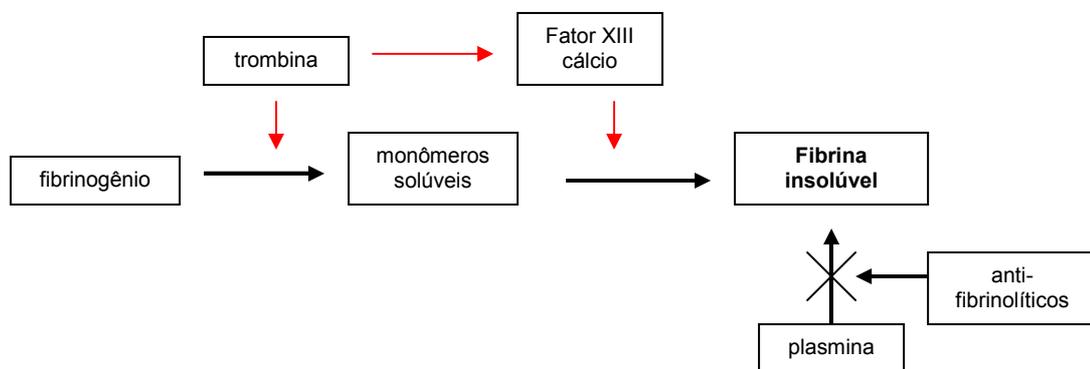


Figura 5. Sequência de ativação e formação da rede de fibrina.

Bergel originalmente descreveu a fibrina como hemostático em 1909 (Bergel, 1909). Em 1915, Lippencott utilizou a fibrina como hemostático em cirurgia cerebral (Grey, 1915). Em 1940, Young e Medawar utilizaram o fibrinogênio como adesivo em anastomose de nervos. Nesse período, o fibrinogênio humano e a trombina começaram a tornar-se disponíveis em maiores quantidades através do processo de fracionamento do plasma.

Em 1944, Cronkite utilizou o fibrinogênio pela primeira vez associado à trombina para fixação de enxertos de pele. A trombina bovina foi inicialmente comercializada na Europa, porém, a partir da década de 70, a inativação viral da trombina humana permitiu seu uso na maioria dos selantes.

Até então o uso da fibrina era limitado em função da baixa concentração de fibrinogênio alcançada nas preparações do adesivo, visto que sua resistência a tensão é diretamente proporcional à concentração do fibrinogênio (Staindl, 1979).

Em 1972, Matras et al., estudando anastomoses de nervos, inicialmente em coelhos e após em humanos, descreveram o primeiro selante de fibrina contendo fibrinogênio concentrado. O autores utilizaram o crioprecipitado, usado para tratamento de deficiência de fator VIII, em solução de trombina de origem bovina. O crioprecipitado contém concentrações elevadas de fibrinogênio, fator XIII, fibronectina e outros fatores, resultando em boa capacidade de adesão. Os autores reportaram excelentes resultados nas anastomoses nervosas.

Com o refinamento dos métodos de produção, o primeiro selante de fibrina foi lançado na Europa em 1982. Entretanto, a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) não aprovou o produto em função do risco de transmissão de hepatite pelo plasma humano utilizado na produção do fibrinogênio. Apenas em 1998, a cola de fibrina foi aprovada pelo FDA (Spotnitz; Prabhu, 2005).

As primeiras colas de fibrina lançadas na Europa foram o Tissucol[®] (também comercializado como Tisseel[®]; Immuno AG, Viena, Austria) e o Beriplast HS[®] (idêntico ao Beriplast P[®]; Behringwerke, Marburg, Alemanha). Ambos apresentam-se com dois componentes: 1) fibrinogênio humano liofilizado com fator XIII, que é reconstituído com antifibrinolítico (aprotinina), e 2) trombina bovina, reconstituída com solução de cloreto de cálcio (CaCl₂).

Os componentes essenciais das apresentações comerciais são o fibrinogênio, a trombina, o fator XIII, a aprotinina e cloreto de cálcio. O fibrinogênio é uma molécula de 340.000 Da de peso composta por duas cadeias polipeptídicas $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$ com estrutura de 45 nanômetros. A trombina cliva os peptídeos A e B, deixando monômeros solúveis de fibrina (α, β, γ) . A presença do fator XIII estabiliza a fibrina através da formação de uma rede de ligações covalentes, a rede de fibrina. Outros fatores como pH, fibronectina e temperatura influenciam a formação da rede (Spotnitz; Prabhu, 2005). Além disso, ligações da rede de fibrina com glicoproteínas adesivas, colágeno e glicoproteínas celulares e do plasma ancoram firmemente o coágulo no sítio da lesão.

A trombina (fator II ativado) é o segundo maior componente da CF. É uma protease cuja principal função é transformar o fibrinogênio em fibrina. Também atua sobre os fatores XI e VIII, aumentando o fluxo na via intrínseca da coagulação; e ativa o fator V o que aumenta a produção de protrombina; e ativa o fator XIII, que liga moléculas de fibrina, estabilizando o coágulo.

Inicialmente a trombina utilizada era de origem bovina, entretanto seu uso trouxe riscos de coagulopatias por desenvolvimento de inibidores da trombina e do fator V. Com o desenvolvimento de técnicas efetivas de inativação viral, passou-se a utilizar trombina de origem humana (Jackson, 2001).

A força tênsil da rede de fibrina depende da atuação do fator XIIIa, que polimeriza os monômeros de fibrina em uma trama tridimensional. O fator XIIIa é uma transglutaminase presente no sangue e sua atividade depende do íon cálcio. A trombina ativa o fator XIII, que obtém sua máxima atividade na presença dos íons de cálcio (Wang et al., 1995).

Além da conversão do fibrinogênio em fibrina, a trombina ativa a proteína C, que inibe a coagulação através da degradação dos fatores Va e VIIIa. A trombina ainda é capaz de transformar o plasminogênio em plasmina, que atua no processo de dissolução do coágulo, denominado fibrinólise. Assim, a trombina possui atividade de coagulação e anticoagulação, o que mantém um equilíbrio nesse complexo processo.

Para evitar a fibrinólise, as formulações comerciais de CF apresentam um antifibrinolítico. O agente mais comum é a aprotinina, uma proteína derivada de pulmões bovinos. Existem relatos de efeitos adversos relacionados a aprotinina, que vão desde leve eritema cutâneo até a anafilaxia e morte. A reação é mediada por anticorpos IgE, e ocorre principalmente em pessoas que foram previamente expostas a aprotinina, podendo o risco de reações ser superior a 5% (Spotnitz; Prabhu, 2005).

Scheule et al. (1999) estudaram a formação de anticorpos IgE específicos contra a aprotinina, em cirurgias cardíacas. Os pacientes haviam recebido a aprotinina através da CF, bem como por via intravenosa, ou ambas. Dos 45 pacientes que foram expostos à aprotinina através da CF, quinze (33%) desenvolveram anticorpos IgE específicos, após 3,5 meses. Com 13,5 meses de seguimento, 10% ainda apresentavam esses anticorpos detectáveis (4/41). Os autores sugeriram assim que toda exposição à aprotinina deve ser documentada, e que em sua aplicação na cirurgia cardíacas, alternativas merecem ser consideradas.

Dietrich et al. (2001) investigaram a incidência de reações anafiláticas em pacientes re-expostos a aprotinina em cirurgias cardíacas, e sua relação com as dosagens de IgG e IgE pré-operatórias. Em 121 casos, foram detectados anticorpos IgG e IgE em 18 e 9 pacientes respectivamente. O percentual de reações anafiláticas no estudo foi de 2,5% (3 pacientes),

sendo que estes pacientes apresentavam os maiores níveis de IgG ($p < 0,05\%$), e haviam sido re-expostos em um período curto (entre 22 e 25 dias). Todos se recuperaram após os episódios. Dois dos 3 pacientes tinham níveis quantificáveis de IgE. Os autores concluíram que a detecção de IgG e IgE antes de re-exposição carece de especificidade, porém a quantificação de IgG pode ajudar a identificar pacientes de risco mais elevado para reações anafiláticas.

Em uma revisão acerca da segurança de produtos derivados do plasma humano, Horowitz e Bush (2008) avaliaram a margem de segurança para transmissão do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), hepatite B, hepatite C, hepatite A, parvovírus B19, e uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, doença da vaca louca) em duas apresentações comerciais de CF disponíveis nos EUA (Omrix, New York-NY e Baxter, Deerfield-IL). Em relação ao HIV, hepatite A, B e C, o risco de transmissão por dose foi de 1×10^{-15} (ou 0,0000000000000001), tanto para o fibrinogênio quanto para a trombina. Em relação à transmissão do parvovírus B19, o risco de transmissão foi de 1 em 500.000 doses para o fibrinogênio e menos de 1 em 10.000.000 de doses para a trombina. Os autores relatam que até o presente momento, a vCJD não é transmitida por produtos manufacturados derivados do plasma, apesar de não se conhecer a estrutura exata de seu agente. Mesmo assim, o risco deve estar em menos de 1 em milhão para o fibrinogênio e 1 em 1 trilhão para a trombina. Os autores concluem que as iniciativas de segurança implementadas nos últimos 10 a 20 anos resultaram em excelentes índices de segurança. A transmissão do parvovírus B19 ainda possui a menor margem de segurança, entretanto ainda assim deve ser muito baixa.

A CF tem sido empregada em uma variedade de procedimentos cirúrgicos como adesivo e hemostático e, mais recentemente, como meio para liberação de medicamentos e em

engenharia tecidual. Na área cirúrgica, as aplicações incluem cirurgia craniomaxilofacial (Giannini et al., 2004), cirurgia plástica estética e reconstrutiva (Mobley et al., 2002), ortopedia (Wang et al., 2003), cirurgia ocular (Kavanagh et al., 2009), cirurgia de cabeça e pescoço (Conboy; Brown, 2008), cirurgia cardíaca e vascular (Detweiler et al, 1999; MacGillivray, 2003; Cho, 2008), neurocirurgia (Sekhar et al., 2007), cirurgia torácica (Lois; Noppen, 2005), cirurgia abdominal (Silecchia et al., 2008), urologia (Evans; Morey, 2006), entre outros (Dunn; Goa, 1999; Spotnitz; Prabhu, 2005).

3.11.1 A COLA DE FIBRINA EM LARINGOLOGIA

A partir de 1975, após os resultados publicados por Matras et al. (1972), muitos trabalhos, principalmente fora dos EUA, começaram a reportar experiências em diversas áreas cirúrgicas. Em 1979, Staindl publicou sua experiência com a CF em diversas áreas da Otorrinolaringologia com bons resultados, como em miringoplastias, fechamento de fístulas líquóricas fronto-basais, tonsilectomias em coagulopatias, laringectomias para prevenção de fístulas e em anastomoses de nervo facial. O autor concluiu que, indubitavelmente, outras aplicações seriam encontradas para o uso da CF em Otorrinolaringologia, tanto para hemostasia quanto para síntese tecidual.

Gastpar et al. (1979) publicaram sua experiência de dois anos e meio utilizando fibrinogenio concentrado humano em cirurgias de cabeça e pescoço. Em 49 pacientes com coagulopatias, foram realizadas adenoidectomias, tonsilectomias e septodermoplastias (doença de Rendu-Osler-Weber) sem necessidade de fatores de coagulação. Em outros 193 casos, a CF foi utilizada com sucesso em tratamento de fraturas da base do crânio, ruptura de

artéria carótida, fechamento de perfurações septais e fistulas oroantrais, bem como diferentes enxertos de pele, mucosa e nervos.

Draf (1980) publicou sua experiência inicial com adesivo biológico baseado no coágulo de fibrina (Figura 6). Com mais de 50 casos, o autor descreveu a formulação, a técnica de aplicação e seus resultados em cirurgias otorrinolaringológicas, especialmente timpanoplastias revisionais, cirurgias nasais como fechamento de pequenas perfurações septais, cirurgia plástica e reconstrutiva, correções de fraturas e defeitos da base do crânio como fistulas liquóricas em mastoidectomias e cirurgias no seio esfenóide. O autor ainda relata vantagens em relação ao adesivo de cianoacrilato (Histoacryl[®]), inicialmente difundido nas décadas de 60 e 70, por não ser absorvível ou elástico e aquecer até 52° C em sua polimerização, podendo causar danos aos tecidos. O autor em sua conclusão projeta para o futuro a ampliação das aplicações dos selantes de fibrina em otorrinolaringologia e cirurgia de cabeça e pescoço.

100

W. Draf

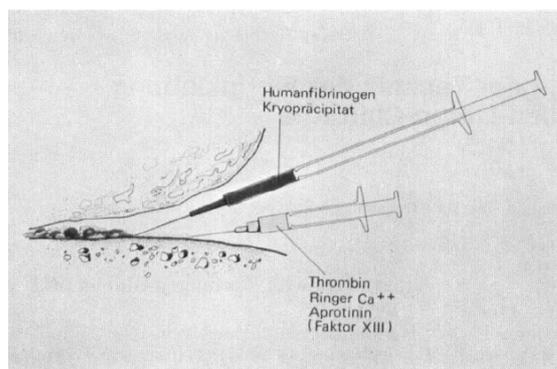


Abb. 1
Methodik der Fibrinklebung.

Figura 6. Desenho da aplicação e dos componentes da CF. Fonte: Draf, 1980.

Em 1981, Martin et al., descreveram o uso de CF em 31 casos de cirurgias endolaringeas, sendo 27 para tratamento de paralisia bilateral com aritenoidectomia. Tendo em vista a profundidade e o estreito campo operatório, que dificultam a realização de sutura, bem como a possibilidade de trauma às bordas da ferida operatória e de sangramento e formação de hematoma, especialmente indesejável na laringe em função da obstrução respiratória e da fonação, os autores sugerem a utilização da CF. Os autores destacaram o efeito hemostático, que possibilita cirurgias em pacientes com coagulopatias, a boa compatibilidade tecidual, completa reabsorção, propriedades de aderência, boa elasticidade e alta estabilidade em saliva certa ação bacteriostática. Referiram o efeito de estimulação da proliferação fibroblástica e capilar, mesmo em feridas infectadas. Os autores concluíram que, após cinco anos de testes clínicos e de aplicação, a CF ganhou um lugar permanente em cirurgia otorrinolaringológica.

Naumann e Lang (1981) publicaram sua técnica de lateralização endoscópica de pregas vocais no tratamento da paralisia bilateral e ressecção frontolateral para tumores glóticos unilaterais, utilizando a CF para fixação de retalhos mucoso-musculares, conforme ilustração a seguir (Figura 7). Os autores consideraram a técnica com CF mais rápida, fácil, segura e pelo menos mais conveniente para os pacientes.

Fibrinkleber in der Larynxchirurgie

Laryng. Rhinol. 60 (1981) 365

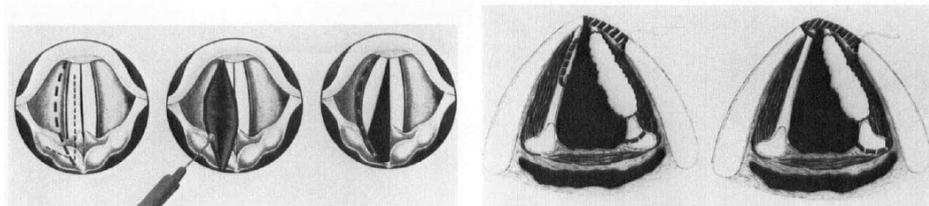


Figura 7. Aplicação da CF em laringologia. Fonte: Naumann e Lang, 1981.

Um aspecto discutido na época era a potencial transmissão do vírus da hepatite B, bem como possíveis reações imunológicas, fatores esses que não permitiam ainda o uso dos selantes de fibrina nos EUA, apesar de já disponíveis comercialmente na Europa. Entretanto Panis e Scheele (1981) não observaram esses problemas em um grupo de 146 pacientes submetidos a cirurgias otorrinolaringológicas que haviam recebido a CF, bem como não havia até então relato de contaminação pelo vírus da hepatite B na literatura de língua germânica (Panis, Scheele, 1981).

Tendo em vista o risco potencial de contaminação, em 1985, Siedentop et al. estudaram métodos de produzir o selante de fibrina através do sangue do próprio paciente, obtendo concentrações de fibrinogênio por meio de um sistema utilizando sulfato de amônia. Em 1986, os autores complementaram seus estudos aperfeiçoando a técnica de produção do selante a partir do sangue do próprio paciente.

Lyons et al. (1989) compararam a facilidade de aplicação e a efetividade entre o cianoacrilato e a CF em estudo experimental de fraturas laríngeas em cobaias. Os autores observaram que a aplicação da CF foi mais fácil e foi rapidamente distribuída na região da fratura, além de diminuir o gotejamento de sangue local. O cianoacrilato foi mais difícil de aplicar, em função de sua rápida polimerização. Foi ainda necessário deixar as superfícies das fraturas secas antes da aplicação. Além disso, o cianoacrilato foi menos efetivo no controle do gotejamento sanguíneo no campo operatório. Histologicamente, os autores observaram uma proliferação simétrica de condrócitos unindo a fratura. Em contraste, no grupo tratado com cianoacrilato, houve mínima e assimétrica proliferação de condrócitos, bem como marcada reação pericondral. Os autores ainda discutiram métodos de produção de CF através de sangue do próprio paciente, para obtenção de fibrinogênio concentrado, para ser adicionado a trombina reconstituída, visto que nos EUA a utilização do kit comercial da CF (Fibrin Sealant

Kit 1.0™ – Immuno AG, Vienna, Austria) só era permitida para fins investigativos, visto que ainda não havia sido aprovada pelo FDA, fato que só ocorreria 9 anos mais tarde.

Linder e Lindholm (1992) aplicaram CF em cirurgias para lateralização de pregas vocais em casos de paralisia bilateral. Os autores utilizaram laser de dióxido de carbono em um acesso endoscópico para lateralização de uma ou ambas as pregas vocais, fixando-as com cola de fibrina. Apesar do seguimento mais curto, os resultados foram semelhantes aos métodos convencionais, sem a CF, porém menos trabalhosos.

Kojima et al. (1993) relataram a reconstrução da comissura laríngea anterior com enxerto livre de mucosa labial fixado com CF em 2 pacientes com tumores laríngeos e em outro com estenose laríngea. Sem a necessidade de *stent*, os autores reconstruíram a comissura anterior com bons resultados vocais.

Kang et al. (1998) compararam a CF com a sutura tradicional em reconstruções laringotraqueais em furões. Quarenta furões foram divididos em 2 grupos de 20 animais. Um enxerto de cartilagem costal foi colocado em uma incisão na cartilagem cricóide e fixado com CF ou sutura. Os animais foram sacrificados com 7 e 30 dias. Os autores observaram que ao crescimento mucoso cobriu a face interna do enxerto com maior frequência nos animais que receberam a CF, não encontrando diferenças em relação à migração e viabilidade dos enxertos, inflamação, integração e expansão luminal. Os autores concluíram que o uso da CF pode resultar em menor trauma cirúrgico e edema, com diminuição do tempo cirúrgico e recuperação mais rápida.

Remacle et al. (2000) publicaram os resultados do tratamento cirúrgico de 45 pacientes com sulco vocal utilizando laser de CO₂ para dissecação do epitélio aderido aos planos mais profundos, além da injeção de colágeno autólogo ou bovino em casos de atrofia da prega vocal. Nesse estudo, os autores descrevem a técnica da utilização do laser de CO₂ e reportam a utilização da CF para reposicionamento do microflap de mucosa. Com seguimento médio de 5 meses (1 a 18 meses), os autores observaram, em média, uma melhora nos parâmetros vocais como tempo máximo de fonação e análise espectrográfica, bem como melhora na vibração à laringoestroboscopia.

Takagi et al. (2001), em um estudo experimental em ratos, compararam anastomoses traqueais realizadas com sutura e com sutura mais CF. Dois grupos com 21 animais cada foram submetidos a secção parcial da traquéia seguida de reconstrução com sutura em um grupo, e reconstrução com sutura e adição de CF na anastomose. O estudo avaliou a quantidade de hidroxiprolina (principal aminoácido presente nas fibras colágenas) e de fibras colágenas após 7, 14 e 21 dias. Os autores observaram uma maior quantidade de hidroxiprolina e fibras colágenas ($p < 0,05$) no subgrupo que recebeu CF e foi sacrificado com 7 dias. Os autores sugeriram que a CF acelerou o processo cicatricial no período pós-operatório inicial.

Glatz et al. (2003), em um estudo experimental de paralisia de prega vocal em coelhos, compararam o volume retido de gordura abdominal e de pré-adipócitos injetados na prega vocal, utilizando a CF como veículo de injeção para os pré-adipócitos. Os autores concluíram que o emprego de pré-adipócitos foi inferior à gordura abdominal em relação à retenção do volume inicial, em 6 e 12 meses de estudo. Porém, apesar do fato de que os componentes da

CF influenciam o comportamento das células através de seus efeitos biológicos, esse aspecto não foi abordado nesse estudo.

Pryor et al. (2004) apresentaram no *Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation* um trabalho onde foram comparadas a CF com as técnicas de sutura convencionais para aproximação de retalhos mucosos em microcirurgia laríngea. Através da análise de quadros e endoscopia digital, dois revisores avaliaram a cicatrização mucosa após 3 meses de seguimento. Os autores não encontraram diferenças na cicatrização, bem como não houve complicações relacionadas ao uso da CF.

Campos (2005), também no *Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation*, apresentou um método para tratamento do sulco vocal onde os componentes da CF eram misturados fora do campo cirúrgico e, após sua solidificação, um implante foi moldado e introduzido no espaço subepitelial. Os cinco pacientes submetidos a esse procedimento tiveram marcada melhora no padrão vibratório e no fechamento glótico, num seguimento de 15 meses.

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Este estudo obteve aprovação da Comissão para Análise de Projetos (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob protocolo de nº 898/06 (Anexo A). Foram utilizados 24 coelhos albinos da raça *New Zealand*, todos do sexo masculino, sadios, pesando entre 2,5 e 3,5 Kg, fornecidos pelo Centro de Bioterismo – FMUSP (Anexo B), e mantidos no mesmo centro, com supervisão de zootecnistas e veterinários, com água e ração *ad libitum* (Figura 8).



Figura 8. Acomodação do coelhos no Centro de Bioterismo da FMUSP.

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Inicialmente foi realizado um estudo piloto a fim de aprimorar a técnica operatória e minimizar possíveis efeitos que poderiam influenciar os resultados, como infecções da ferida operatória e reação inflamatória com suturas. Neste estudo piloto foram utilizados 6 coelhos, dos quais 2 desenvolveram abscesso cervical no 4º e 6º dia de pós-operatório. Tal fato deveu-se provavelmente a deiscência da sutura da membrana cricotireoidea, que havia sido suturada com fio de catégute 4-0 (marca *Polysuture*[®], Brasil). A partir desses dados, a sutura foi modificada, passando a ser confeccionada com fio de polipropileno monofilamentar (*Prolene*[™], *Ethicon*, Brasil), com pontos contínuos (Figura 9).

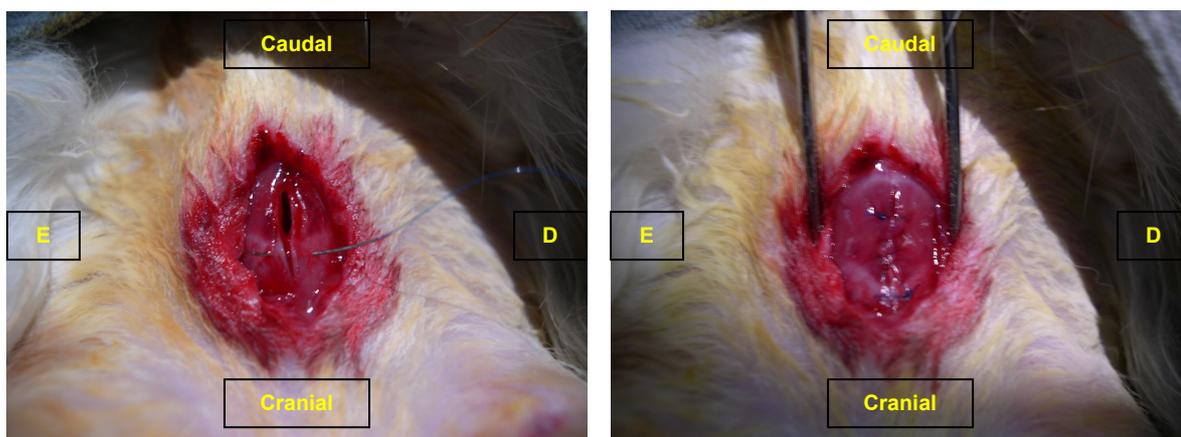


Figura 9. Vista da região cervical anterior. Sutura da cartilagem tireóide e da membrana cricotireoidea com Prolene 5-0.

Foram realizadas vídeo-endoscopias laríngeas para identificação dos enxertos e de possíveis alterações referentes à laringofissura e a nova sutura. Observou-se que, em outros dois coelhos, a linha de sutura contínua com Prolene[™] 5-0 havia ficado exposta na luz laríngea, o que levou a formação de processo inflamatório local com acúmulo de secreção

(Figura 10). Tal fato forçou nova modificação na técnica de sutura, utilizando então o Prolene™ 6-0, de modo a não transfixar a cartilagem tireóide e a membrana cricotireoidea.

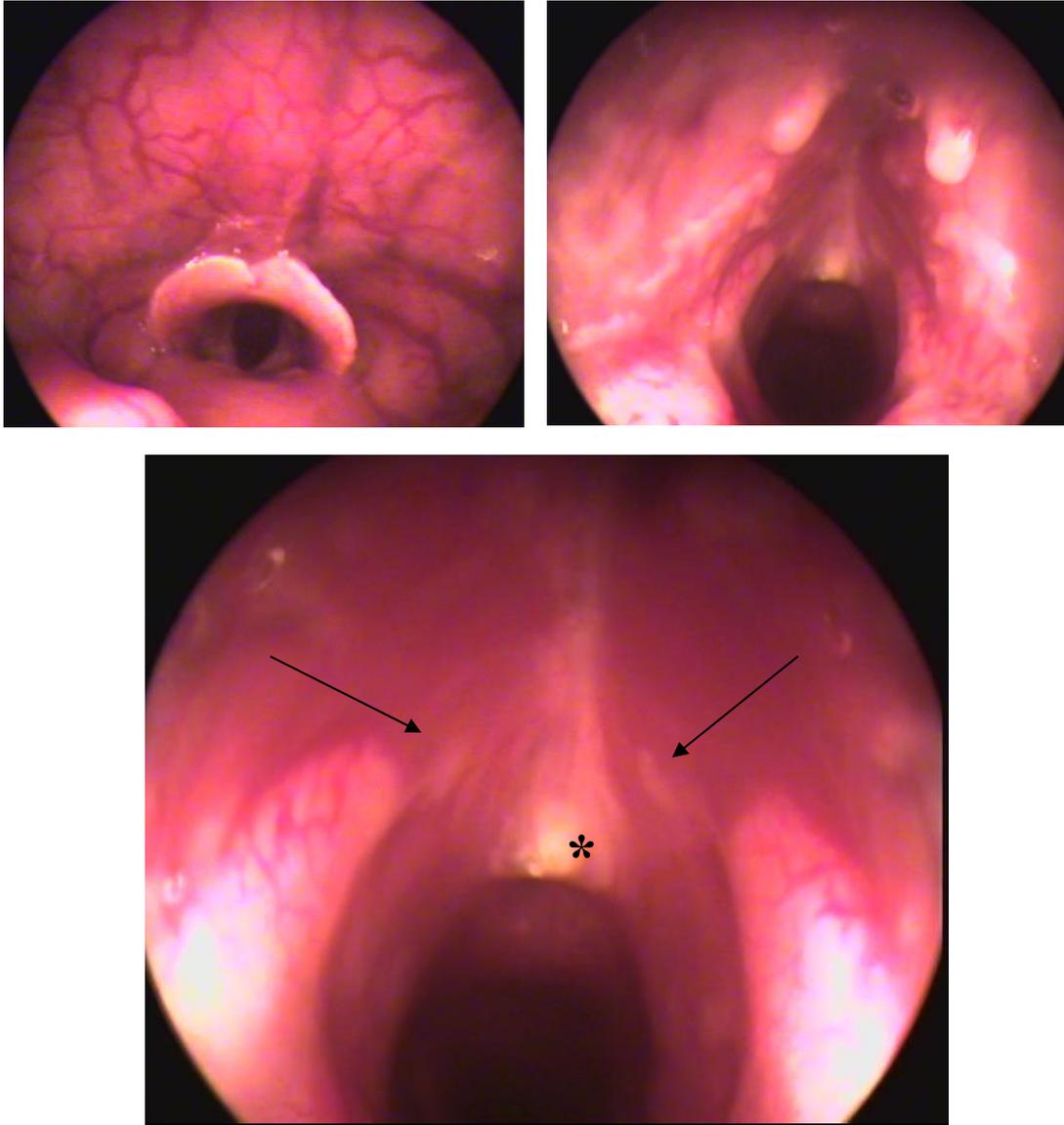


Figura 10. Endoscopia laríngea com identificação dos enxertos de fásia (setas) e de reação inflamatória na região da sutura da laringofissura (asterisco).

Os 18 coelhos restantes foram então divididos em três grupos de estudo, cada um deles com seis coelhos (G1, G2 e G3). Os animais foram submetidos à inserção de enxerto de fásia lata em ambas as pregas vocais através de laringofissura, sob anestesia geral intramuscular. Os enxertos foram introduzidos no espaço de Reinke, através de bolsão confeccionado na porção média de cada prega vocal, sendo utilizada CF para fixação apenas na prega vocal esquerda.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Otorrinolaringologia (LIM-32) da FMUSP e, após recuperação pós-anestésica foram novamente encaminhados ao Centro de Bioterismo. Após os períodos determinados para cada grupo, os animais foram sacrificados através de injeção de cloreto de potássio (KCl) a 20%, sob anestesia intramuscular a seguir especificada, conforme Normas Éticas para Experimentação Animal.

Os coelhos do G1 foram sacrificados 7 dias após o procedimento; os coelhos do G2 foram sacrificados após 30 dias; e os coelhos do G3 foram sacrificados após 90 dias. As laringes foram ressecadas em bloco e foram estudadas as alterações nas pregas vocais determinadas pelo enxerto com e sem cola de fibrina através de estudo histoquímico pelo método picrossirius e morfométrico.

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

4.3.1 ANESTESIA DOS COELHOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia intramuscular, utilizando Xilazina (laboratório *Vetbrands*[®], Brasil) na dose de 5 mg/Kg, associado à Quetamina (laboratório *Vetbrands*[®], Brasil), na dose de 25mg/Kg. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea, sem necessidade de cânula traqueal, fixados à mesa cirúrgica pelas patas traseiras, em decúbito dorsal.

4.3.2 CONFEÇÃO DO ENXERTO

Foi realizado tricotomia na face anterior e lateral da coxa direita, seguida de anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 10% (PVP-I tintura).

A incisão foi feita na pele da região anterolateral da coxa, medindo cerca de 2cm. A pele e o subcutâneo foram afastados para facilitar a exposição da fáscia muscular, a qual foi delicadamente dissecada com auxílio de hidrodissecção com solução fisiológica de NaCl 0,9% e ressecada (0,5 x 0,5cm) (Figura 11). A pele foi suturada com fio de Categute simples 3-0 através de sutura contínua. Após, o enxerto foi imerso em solução fisiológica de NaCl 0,9%.

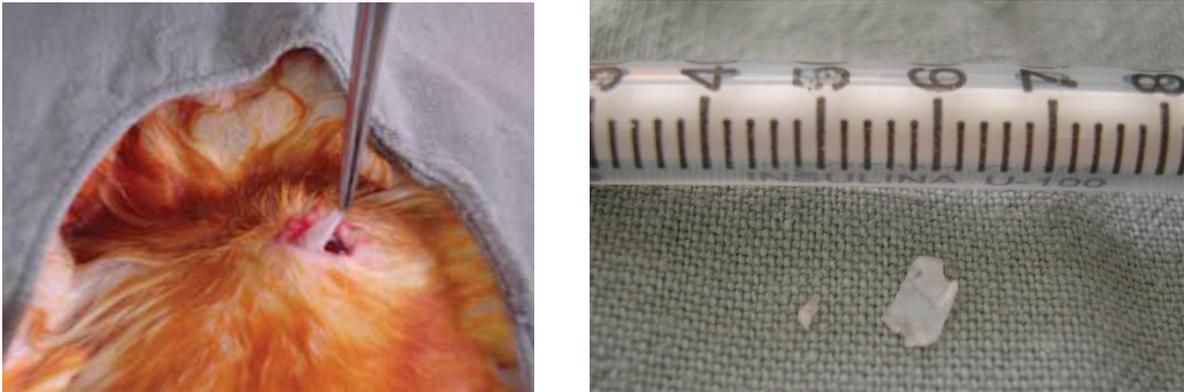


Figura 11. Retirada e confecção do enxerto de fásia lata, através de incisão na face lateral da coxa do coelho.

4.3.3 ACESSO À LARINGE E INSERÇÃO DO ENXERTO

Os animais foram colocados em decúbito dorsal na mesa com as patas dianteiras em abdução, com extensão da região cervical para facilitar o acesso cervical. Foi realizada tricotomia na região cervical anterior, estendendo-se desde a mandíbula até a fúrcula esternal. A anti-sepsia foi realizada com PVP-I tintura, e foram utilizados instrumentos cirúrgicos esterilizados (Figura 12).

A incisão foi realizada na linha média, a partir da margem superior da cartilagem tireóidea até a borda inferior da cartilagem cricóidea, utilizando-se bisturi lâmina 15, na pele e subcutâneo, permitindo a exposição das cartilagens tireóidea, cricóidea e a membrana cricotireóidea. Não houve necessidade de hemostasia nessa fase (Figura 13).

mantido em ventilação espontânea, através da incisão laríngea, sem necessidade de cânula traqueal.

A prega vocal direita foi submetida à incisão longitudinal de 1 mm, seguindo-se de descolamento da mucosa ao longo da margem medial. O procedimento foi realizado com esculpador Hollenback 3s (marca *Factory*[®], Brasil), utilizado em cirurgia odontológica, permitindo a formação de uma bolsa para receber o enxerto de fásia (Figura 14). Foi necessário todo cuidado no sentido de evitar a penetração do músculo tireoaritenóideo.



Figura 14. Esculpador de Hollenback 3s, utilizado para confecção do bolsão na LP das pregas vocais (marca *Factory*[®], Brasil).

O enxerto, com aproximadamente 1mm de diâmetro, foi implantado na bolsa entre a musculatura e a mucosa da prega vocal direita. O mesmo procedimento foi realizado na prega vocal esquerda, porém utilizando a CF (Figura 15).

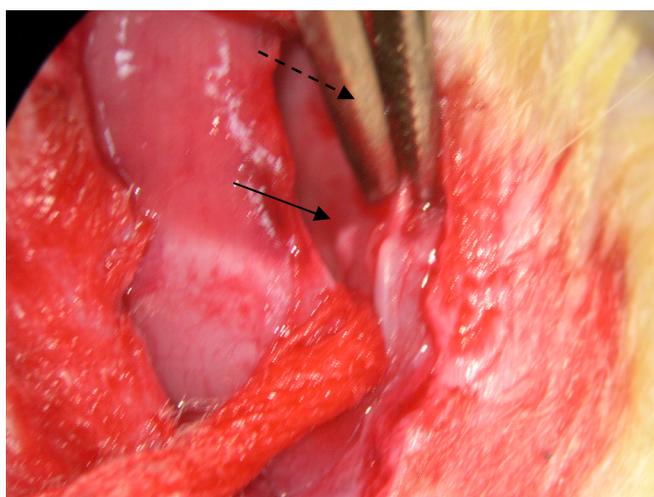


Figura 15. Vista microscópica da colocação do enxerto no bolsão confeccionado na prega vocal direita (seta contínua). Pinça apreendendo a hemilaringe direita (seta tracejada).

A CF utilizada foi o Tissucol[®] (Baxter, Immuno AG, Vienna, Austria) para fixação do enxerto. Cada "kit" de 1,0 ml é formado por: fibrinogênio e aprotinina (dois frascos com tampa azul), e trombina e cloreto de cálcio (dois frascos com tampa preta e um com tampa alumínio). O frasco maior com tampa azul contém o fibrinogênio liofilizado, e o frasco menor com tampa azul contém a solução de aprotinina bovina (1,0 ml). O frasco maior com tampa preta corresponde à trombina liofilizada de 500 UI, e o frasco menor com tampa preta corresponde à solução de cloreto de cálcio (1,0 ml). O frasco de tampa alumínio contém 4 UI de trombina, para solidificação lenta. Esta foi a concentração utilizada por ser mais adequada aos procedimento endolaríngeos, pois permite ajustes dos tecidos logo após sua aplicação.



Figura 16. Fibrinothem[®] (Baxter, Immuno AG, Vienna, Austria), utilizado para preparação dos componentes da CF.

A preparação dos componentes foi facilitada pelo emprego do dispositivo chamado Fibrinothem[®] (Figura 16), que aquece e mantém os frascos na temperatura de 37°C, ideal para preparação e aplicação do Tissucol[®]. O frasco que contém o fibrinogênio possui uma

palheta metálica que, quando o frasco é colocado no Fibrinotherm[®], por ação magnética, a palheta gira em seu interior, facilitando a mistura do fibrinogênio com a aprotinina.

Após sua reconstituição, o componente azul continha: 70-110 mg de fibrinogênio, 2-9 mg de fibronectina, 10-50 UI de fator XIII, 40-120 µg de plasminogênio e 3000 KIU/ml de aprotinina (bovina). O componente alumínio continha: 4 UI de trombina e 40 µmol de cloreto de cálcio (Figura 17).

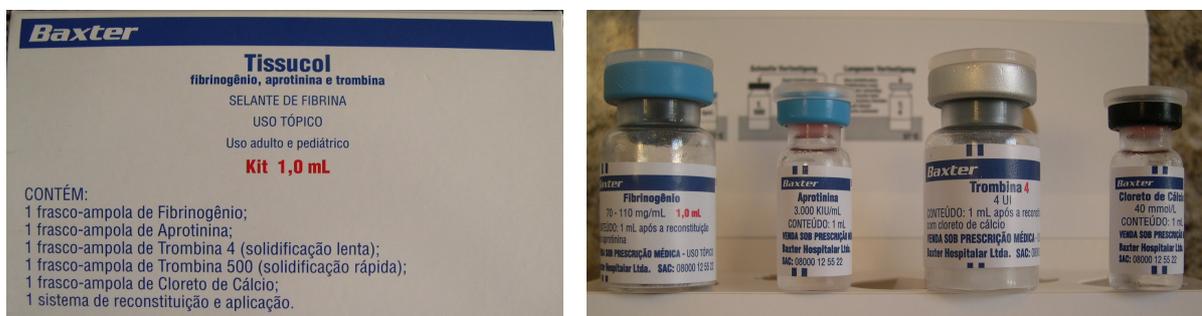


Figura 17. Kit do Tissucol[®]. O kit disponibiliza frasco-ampola de trombina com 4 UI (para solidificação lenta), e frasco-ampola com 500 UI (para solidificação rápida).

Os fechamentos da cartilagem tireóidea e da membrana cricotireóidea foram realizados com fio de polipropileno monofilamentar 6-0 (Prolene[™], Ethicon, Brasil) em sutura contínua, tomando-se o cuidado para a linha de sutura não transfixar luz laríngea, permanecendo na submucosa. A musculatura pré-tireoidiana e a pele foram suturadas com Categute 4-0 (marca Polysuture[®], Brasil), em planos separados.

Os coelhos receberam antibioticoterapia com Benzilpenicilina procaína 300.000 UI e Benzilpenicilina potássica 100.000 UI (laboratório *Bristol-Myers-Squibb*[®], Brasil/EUA), diluídos em 3 ml de água destilada, sendo aplicado 0,4ml intramuscular por dose. A primeira dose foi aplicada durante o procedimento, e duas outras, a cada 24 horas.

4.3.4 PREPARAÇÃO DAS PEÇAS PARA ESTUDO

Todos os animais operados foram mantidos vivos, com cuidados diários e controle do processo cicatricial. Após anestesia com xilazina, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de 2 ml de KCl 20%, conforme as Normas Éticas de Experimentação Animal.

Após o sacrifício do animal, a laringe foi removida em bloco, através de incisão cervical (Figura 18). A seguir, as hemilaringes foram separadas e as peças contendo as pregas vocais então isoladas e marcadas com tinta nanquim na face correspondente à secção transversal das mesmas.

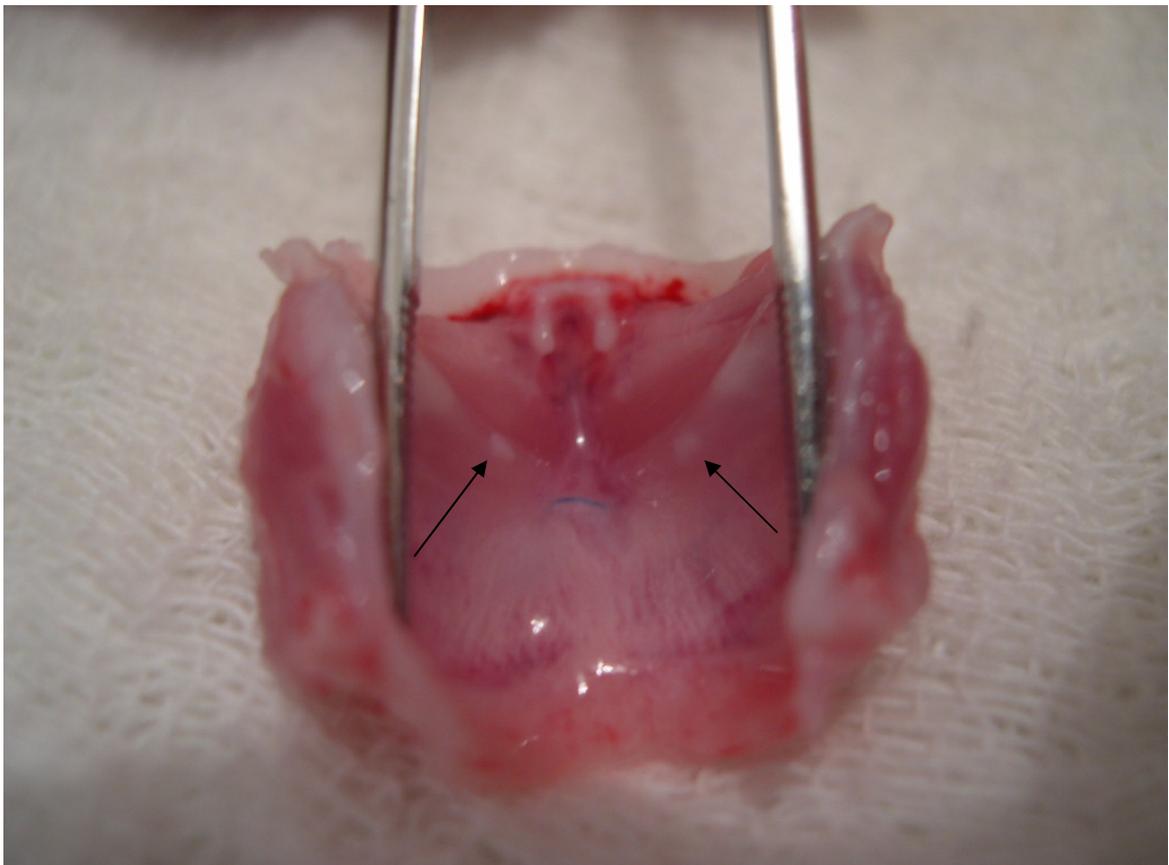


Figura 18. Laringe aberta (vista posterior) com os enxertos de fásia (setas).

4.4 PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS

Todas as peças medindo, cerca de 1,0 x 1,0cm, foram fixadas em formalina a 10% e colocadas em cassetes após identificação com o número do animal e origem anatômica da amostra. Foram então encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da FMUSP para processamento. Nesse laboratório, as peças foram desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas em xilol, impregnadas pela parafina fundida em estufa a 60°C, incluídas e a seguir cortadas no micrótomo com espessura de 3µm.

O número de lâminas foi variável, dependendo da identificação do enxerto. Foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise preliminar dos enxertos.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Inicialmente foi preparada uma lâmina para cada prega vocal contendo 2 a 3 cortes de 3µm de espessura e corada com HE para identificação do enxerto e análise de alterações mais grosseiras decorrentes de problemas na confecção das mesmas. Os cortes foram analisados sob microscopia óptica inicialmente com aumento de 50X e então com aumento de 200X (Figura 19).

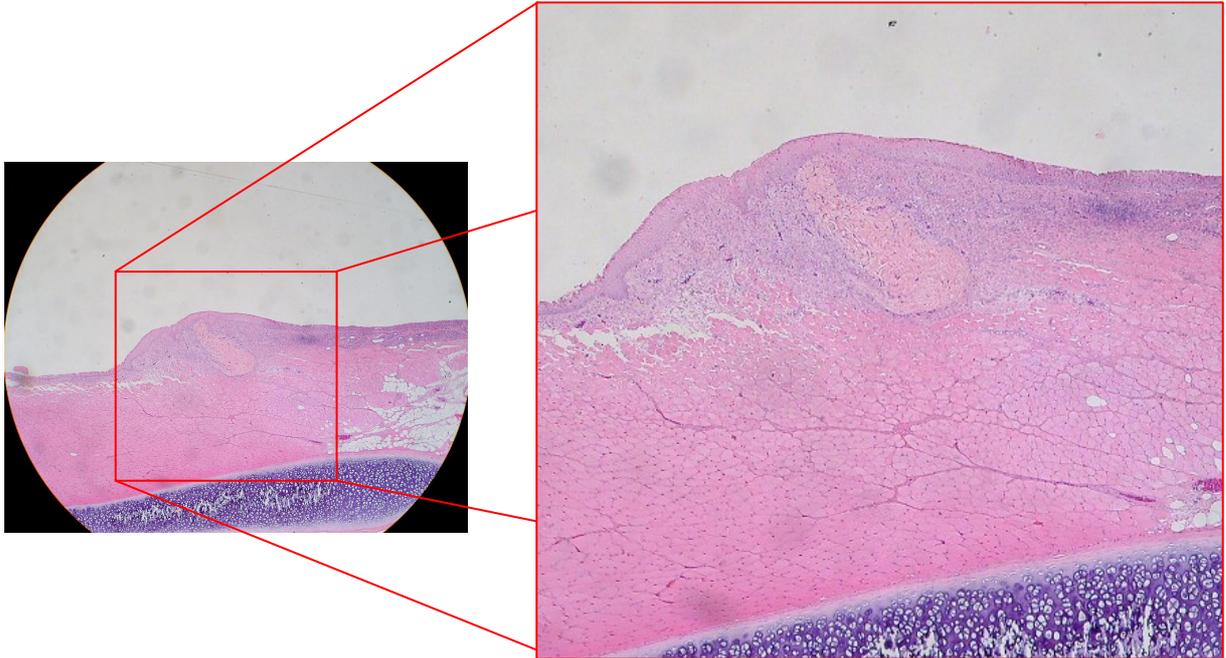


Figura 19. Fotomicrografia de corte transversal ao nível do enxerto. Coloração HE (aumento de 10X à esquerda e 20X à direita).

Após todos os blocos de parafina terem sido avaliados quanto a presença do enxerto nos cortes corados com HE, foram então realizados novos cortes que foram corados com picrossirius, simultaneamente, para evitar possíveis variações na técnica de coloração. A coloração com picrossirius é método histoquímico que permite identificar a presença do colágeno (Figura 20). Os aminoácidos básicos do colágeno reagem à coloração ácida *Sirius-Red*, corando o colágeno em tom avermelhado.

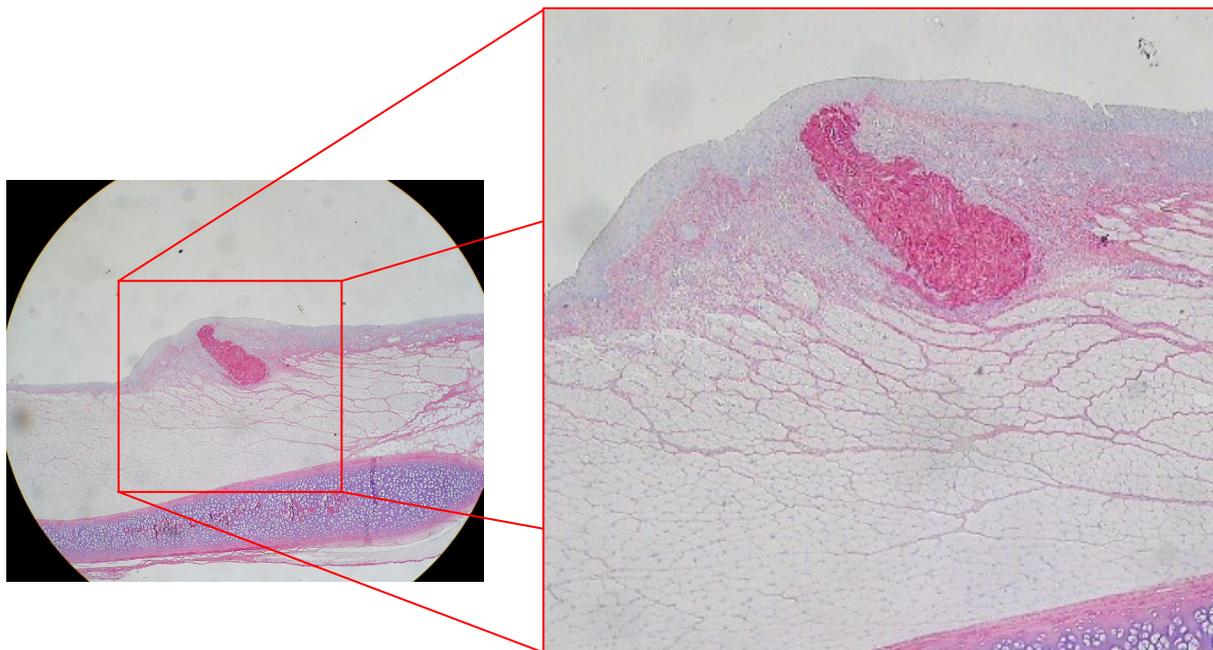


Figura 20. Fotomicrografia de corte transversal ao nível do enxerto. Coloração picrosirius (aumento de 10X à esquerda e 20X à direita).

A quantificação das fibras colágenas foi realizada através do estudo morfométrico, descrito a seguir. As lâminas foram identificadas apenas com um código que indicou a sua origem, de modo que o examinador não teve conhecimento a quais coelhos pertenciam, até a tabulação dos resultados.

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As imagens das lâminas foram capturadas através de um sistema digital de captura de imagens, e analisadas através do programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.5 (para *Windows*, Media Cybernetics S/N 41N41000-26671. EUA). Este *software* permite identificar o colágeno por meio de um gradiente de cores, que é padronizado previamente. As medidas da concentração de fibras colágenas foram realizadas no Laboratório de Análise de Imagens e Morfometria da FMUSP (LIM 05) entre setembro de 2008 até março de 2009. O sistema

digital de análise de imagens é composto por uma câmera digital (modelo TK-C1380, marca JVC[®], Japão), acoplada a um microscópio (modelo *Leica*[®] DMR, marca *Leica M-System, Wetzlar, Hessen*, Alemanha) que envia as imagens para um monitor (modelo Triniton[®], marca *Sony*, Japão).

Após a captura de uma imagem pela câmera, o programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.5 realiza operações de mensuração a partir da posição dos *pixels* na imagem. Pode-se calibrar a escala de medidas do programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.5 de modo que um *pixel* corresponde a um centímetro, milímetro ou micrômetro quadrado, dependendo da necessidade do estudo. No presente estudo, a calibração utilizada pelo sistema digital de análise de imagens e pelo programa *Image-Pro Plus*[®] versão 4.5 foi padronizada pelo Serviço de Patologia da FMUSP, onde $1 \mu\text{m}^2$ correspondeu a 0,5975052301 *pixel*.

Foram capturados, através de sistema digital, entre 7 e 12 campos de modo a cobrir todo o perímetro do enxerto, com aumento de 200X (Figura 21), e então analisados pelo software, a fim de estabelecer a área correspondente ao colágeno em torno do enxerto (expressa em μm^2) e a área total do campo. Foi feita a relação entre a área ocupada pelo colágeno e a área total do campo. A média dos campos analisados representou a deposição de colágeno. Os resultados foram comparados entre as pregas vocais, com e sem a CF.

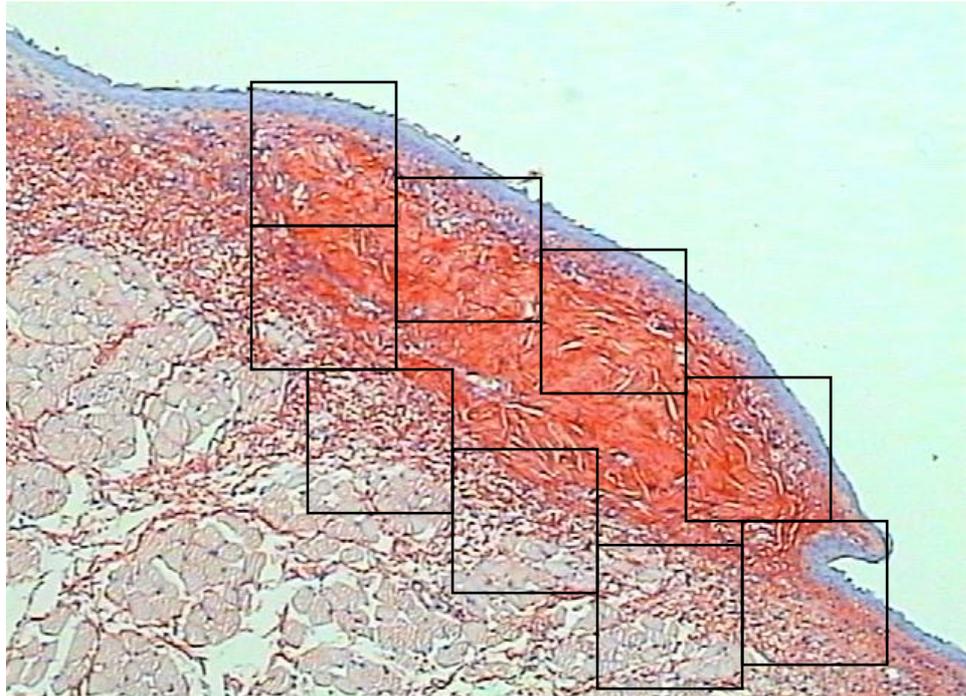


Figura 21. Fotomicrografia da lâmina corada com picrosirius (aumento de 50X). Representação da distribuição dos campos em torno do enxerto.

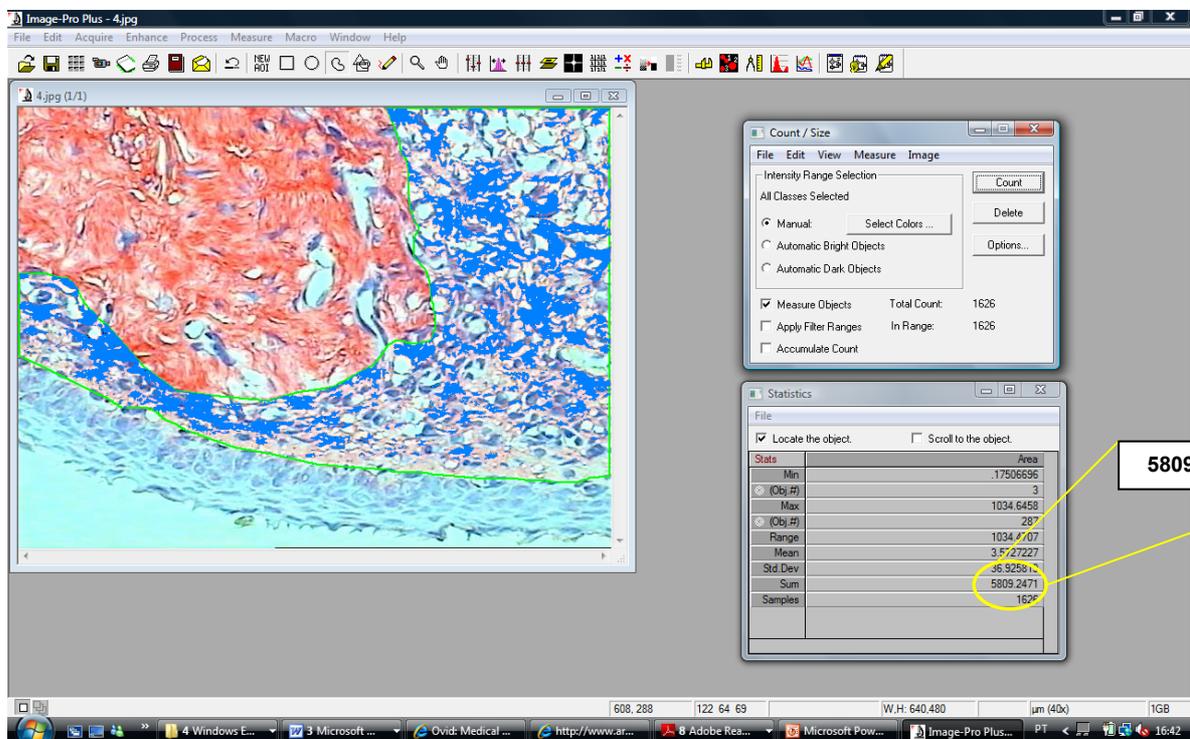


Figura 22. Imagem da tela do sistema de análise do programa *Image-Pro Plus*[®], com perímetro em torno do enxerto já selecionado (linha verde), e com a área correspondente ao colágeno já identificada (azul), expressa na janela ao lado (círculo amarelo, em μm^2).

Cada campo, visualizado com aumento de 200X, foi analisado através da delimitação manual da área em torno do enxerto (Figura 22, linha verde), sendo então aplicado o comando para o *software* realizar a leitura das cores e marcar em azul as cores previamente definidas. O colágeno assume uma tonalidade avermelhada na coloração com picrossirius. Os tons correspondentes ao colágeno foram previamente definidos através da avaliação, pelo patologista, de uma amostra aleatória do conjunto de lâminas do estudo, criando um padrão de tons denominado macro. Esse padrão então foi aplicado em todas as lâminas.

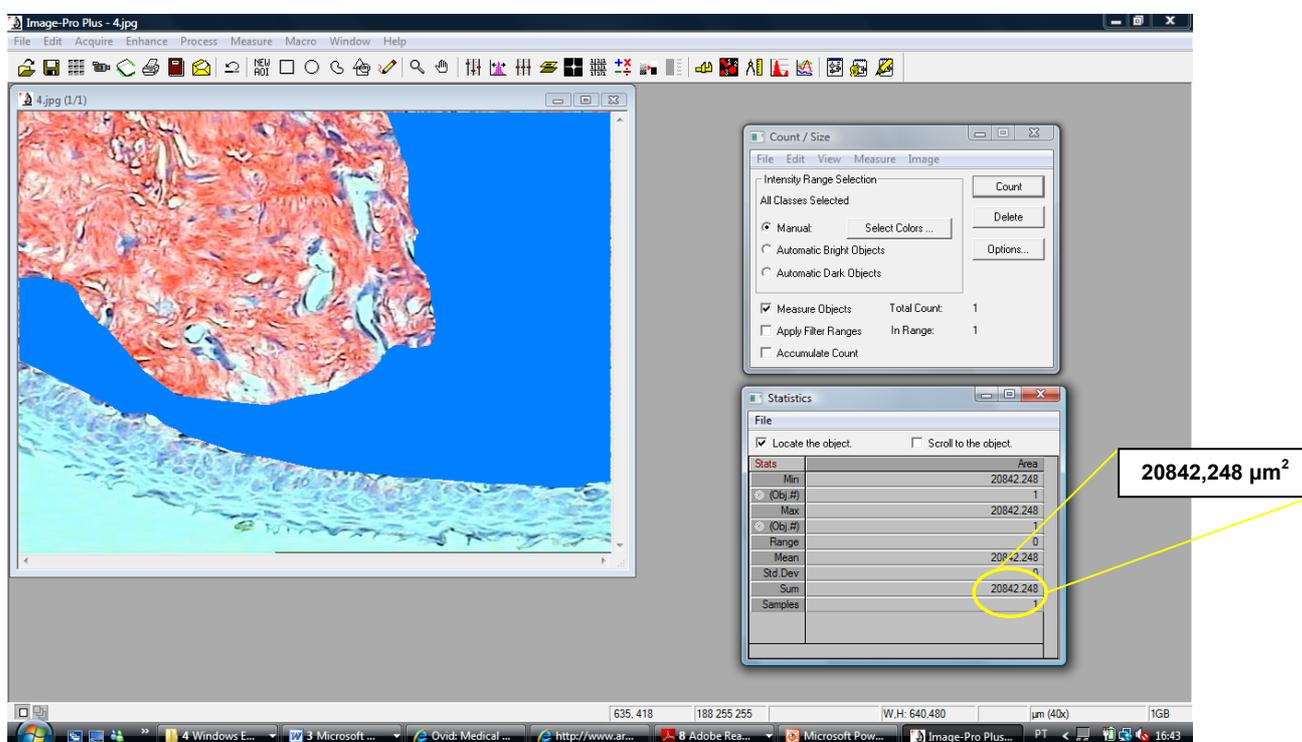


Figura 23. Imagem da tela do sistema de análise do programa *Image-Pro Plus*[®], com a área peri-enxerto total marcada em azul, e calculada na janela ao lado (círculo amarelo, em μm^2).

Após a análise dos tons na área marcada, conforme a macro previamente definida, outro comando orienta o *software* a calcular a área total demarcada, também expressa em μm^2 (Figura 23). A relação entre a área identificada inicialmente e a área total resultou em um número absoluto, correspondente à concentração de colágeno daquele campo (Figura 24). Esse processo foi realizado em todos os campos daquela lâmina. O somatório dos valores de

cada campo, dividido pelo número de campos, resultou em uma média da densidade de colágeno para cada lâmina (Figura 25).

$$\frac{5809,247 \mu\text{m}^2}{20842,248 \mu\text{m}^2} = 0,278724$$

Figura 24. Relação entre a área parcial (colágeno) e a área total delimitada, expressa em μm^2 , e o resultado (valor absoluto).

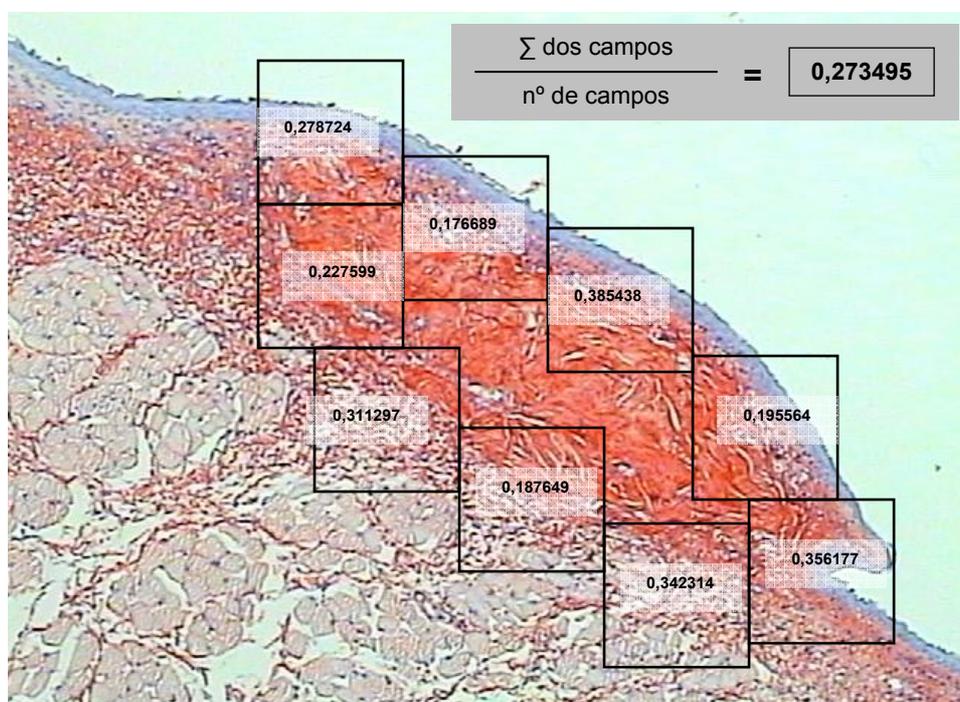


Figura 25. Fotomicrografia representado os campos dispostos em torno do enxerto e seus respectivos valores representativos da densidade de colágeno. O valor final é calculado através da razão entre o somatório dos valores e o número de campos.

Os resultados obtidos foram tabulados em 3 planilhas no programa *Microsoft Excel*[®] (EUA), sendo cada planilha correspondente a um dos grupos (Anexos C, D e E).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os três grupos, contendo 6 coelhos cada, receberam enxerto de fáschia muscular em ambas as prega vocais, sendo que na prega vocal esquerda, o enxerto recebeu a aplicação da CF. Os Grupos 1, 2 e 3 foram sacrificados com 7, 30 e 90 dias, respectivamente, e suas laringes foram excisadas para estudo histomorfométrico. A análise estatística foi realizada por estatístico do Departamento de Estatística da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

Com os valores encontrados para cada campo, foi realizada a média aritmética (soma dos valores dos campos/nº de campos), resultando em um valor para cada prega vocal. Esses valores então foram avaliados quanto a sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk. Assim como o teste de Kolmogorov-Smirnov, o teste de Shapiro-Wilk é aplicado para verificar se uma distribuição de dados é normal ou não. Entretanto, para amostras inferiores a 50, o teste de Shapiro-Wilk torna-se mais adequado.

Como medidas de tendencia central e de dispersão, foram utilizadas a média e desvio-padrão. A média é um elemento representativo de série mais usado, procurando uniformizar os dados em torno do valor médio. Operacionalmente, a média é o quociente entre a soma de todos os valores ($\sum x$) pelo número total dos dados (n). A média depende de cada valor da série e qualquer alteração de um deles interfere na sua medida, sendo que valores excepcionais influenciam no seu valor final. O desvio-padrão consiste em identificar a média quadrática entre os desvios em relação à média. É a medida de dispersão mais utilizada nos trabalhos experimentais ou de pesquisa, buscando indicar o grau de variabilidade dos valores em torno de um valor pré-determinado.

Para determinar se houve diferenças entre as médias de colágeno nos momentos com e sem CF em cada grupo, foi empregado o teste *t de Student*, que compara as médias de dois grupos, considerando que as amostras tenham distribuição normal. Para tal, as médias foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk.

Para avaliar se houve diferenças entre os três grupos, foi empregada a ANOVA (*Analysis of Variance*). O objetivo da análise de variância é avaliar se as diferenças observadas entre as médias das amostras são estatisticamente significantes, para duas ou mais amostras. Quando se estudam muitas amostras simultaneamente, aplicar o teste *t de Student* para os grupos, dois a dois, poderia se encontrar, nas múltiplas análises, uma diferença estatisticamente significativa, por mero acaso.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 OS COELHOS

Um total de 24 coelhos foi utilizado no presente estudo. Todos os coelhos eram machos sadios, albinos da raça *New Zealand*, pesando entre 2500g e 3500g, com média de 3100g. O animais foram fornecidos pelo do Centro de Bioterismo da FMUSP (Anexo B).

Dos 24 coelhos da amostra inicial, 6 foram inicialmente utilizados em um estudo piloto, a fim de aprimorar a técnica operatória e identificar possíveis fatores que pudessem influenciar nos resultados.

Os 18 coelhos restantes formaram 3 grupos com 6 animais cada grupo. Os animais do Grupo 1 foram sacrificados 7 dias após a cirurgia. O Grupo 2 e o Grupo 3 tiveram seus animais sacrificados 30 e 90 dias após as cirurgias, respectivamente. No intervalo entre as cirurgias e os sacrifícios, os animais permaneceram no Centro de Bioterismo da FMUSP, em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, sob a supervisão de zootecnistas e veterinários. Os animais foram transportados entre o Centro de Bioterismo e o LIM-32 por meio de gaiolas individuais, adequadas para tal finalidade (Figura 26).



Figura 26. Gaiolas para transporte dos coelhos entre o Centro de Bioterismo da FMUSP e o LIM-32.

5.2 O ESTUDO PILOTO

Na primeira quinzena abril de 2007, três coelhos foram operados. Foi realizada a sutura laríngea com catagute 4-0, em pontos contínuos, seguido do fechamento da musculatura pré-laríngea e da pele em plano único, com o mesmo fio. Dos 3 coelhos, dois apresentaram abscesso cervical no 4º e 6º dias de pós-operatório. Tal fato deveu-se provavelmente à deiscência da sutura da membrana cricotireoidea, pois a mesma, na análise *post mortem* apresentou-se parcialmente destruída pela infecção. Esse fato levou a modificação na técnica de sutura, sendo então empregado o fio de polipropileno monofilamentar (Prolene™ 5-0), caracterizando-se por ser um fio não absorvível e de mínima reação tecidual.

Na segunda quinzena de abril de 2007, outros 3 animais foram operados, já com a modificação na sutura. Ao final de uma semana após os procedimentos, foram realizadas vídeo-endoscopias, utilizando a mesma técnica anestésica para os procedimentos cirúrgicos, a fim de observar a cicatrização dos procedimentos de enxertia nas pregas vocais, bem como da

própria laringofissura. Foi constatado que, em 2 coelhos, a linha de sutura transfixou a mucosa laríngea e provocou reação inflamatória local, com acúmulo de secreção. Apesar desse fato, foi possível a identificação dos enxertos nas pregas vocais (Figura 27).

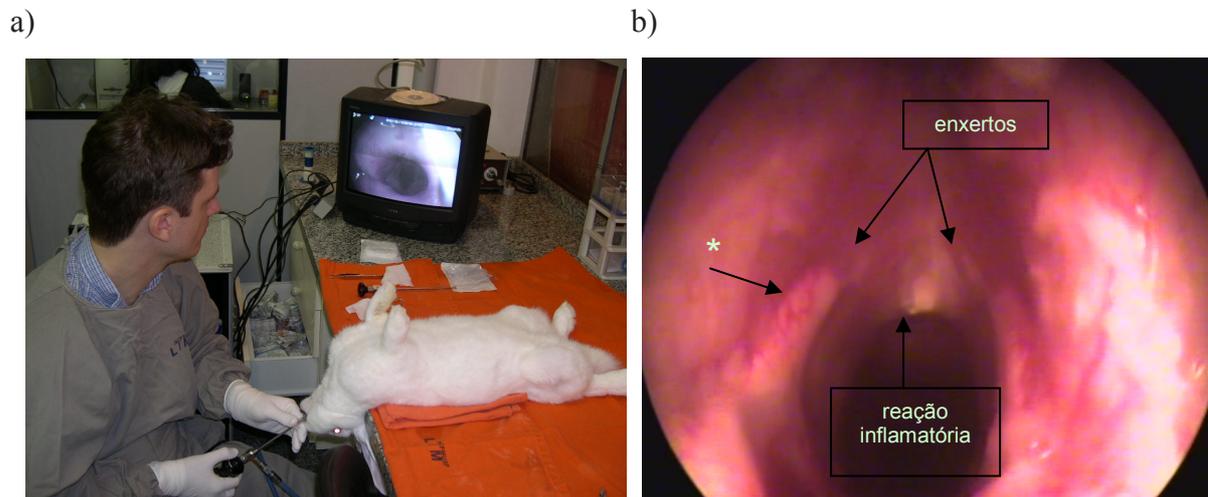


Figura 27. a) Vídeoendoscopia laríngea. b) Vista endoscópica da laringe, sendo possível visualizar os enxertos de fásia muscular anterior aos processos vocais das cartilagens aritenóides (*), assim como processo inflamatório na região da laringofissura.

Tendo em vista essa nova complicação, novamente a técnica de sutura foi modificada, procurando então manter a linha de sutura apenas na cartilagem e na face externa da membrana cricotireoidea, passando-se a utilizar o Prolene™ 6-0, levemente mais fino que o anterior, o que permitiu maior precisão na sutura.

5.3 A IDENTIFICAÇÃO DO ENXERTO DE FÁSCIA

Após as laringes serem excisadas (Figura 28), as peças foram preparadas para serem enviadas ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMUSP, para processamento e realização das colorações com HE e picrossirius. Tal preparação antes do envio ao laboratório foi fundamental para facilitar a identificação do enxerto.

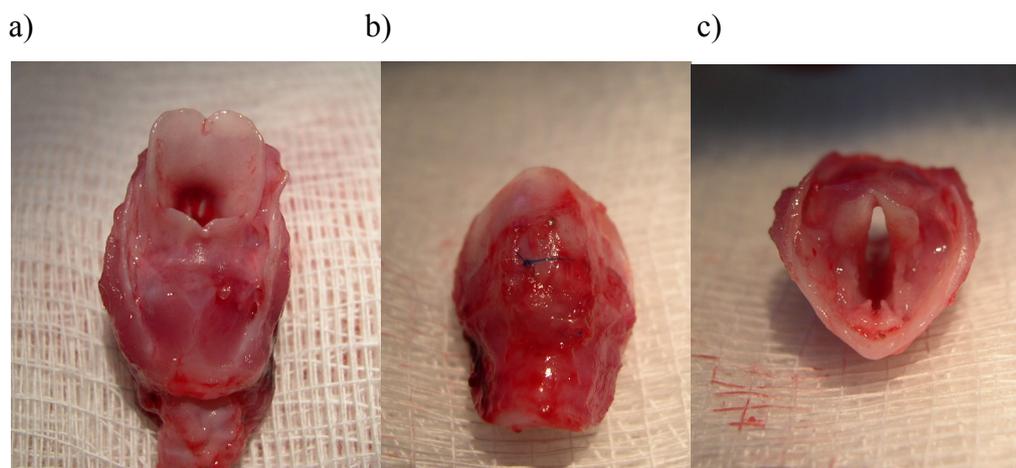


Figura 28. Laringe excisada. a) vista posterior. b) vista anterior. c) vista superior.

Inicialmente foram removidas a epiglote e a porção traqueal que compunha a peça cirúrgica. As laringes foram seccionadas verticalmente em sua linha média, e cada hemilaringe foi então novamente seccionada a fim de formar um fragmento retangular contendo a prega vocal inteira, com todas as suas camadas, bem como a lâmina da cartilagem tireóide adjacente.

No processo de inclusão em parafina, as peças cirúrgicas precisam estar orientadas corretamente quanto a sua face que deverá receber os cortes pelo micrótomo. A face correta para os cortes no presente estudo corresponde à secção transversal da prega vocal, conforme a Figura 29.

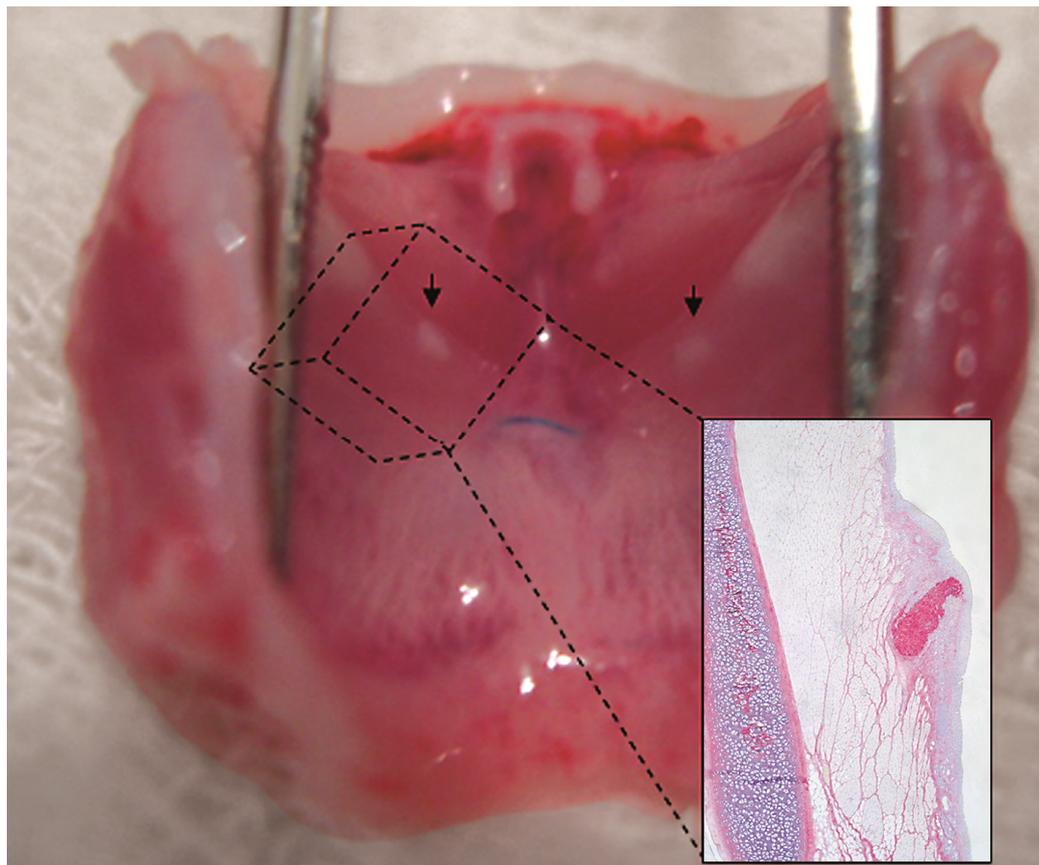


Figura 29. Laringe aberta (vista posterior). Identificação macroscópica dos enxertos (setas) e ilustração do bloco contendo a prega vocal com o enxerto, a ser removido para preparação histológica.

Nem todos os cortes iniciais, corados com HE, já continham o enxerto. Isso levou a realização de cortes seriados em 1, 2 ou 3 estágios, com aprofundamento de 10 μm cada, até que se identificasse o enxerto. A identificação macroscópica do enxerto e o cuidado na preparação da peça para o processamento histológico minimizaram a necessidade de aprofundar os cortes. Após todos os blocos de parafina estarem com o enxerto identificado, foram confeccionados duas lâminas para cada prega vocal, contendo dois cortes cada, para então serem coradas com picrossirius red, em uma única vez, a fim de minimizar variações na técnica de coloração.

5.4 ANÁLISE DA DENSIDADE DE COLÁGENO NAS PREGAS VOCAIS

As imagens das lâminas foram capturadas pelo sistema de captura digital acoplado ao microscópio todas em uma única sessão, também visando minimizar pequenas variações tanto de ajuste de luz, abertura do obturador e altura do condensador do microscópio, bem como do sistema de captura de imagens. As imagens foram então armazenadas em pastas e analisadas através do software *Image-Pro Plus*[®] versão 4.5. Para cada prega vocal foi calculado o valor correspondente à sua densidade de colágeno.

Os valores encontrados foram avaliados quanto a sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk, que revelaram distribuição normal dos dados. A seguir, as médias de cada grupo foram calculadas e comparadas através do teste *t de Student*, para as pregas vocais com e sem a CF (Tabela 1). Após, foram comparadas as médias entre as pregas vocais com CF, nos grupos G1, G2 e G3, assim como as médias entre as pregas vocais controles dos grupos G1, G2 e G3, através do teste ANOVA (Gráfico 2).

Nota-se que as médias de densidade de colágeno em torno do enxerto foram praticamente idênticas no G1, entre as pregas vocais com CF e controle, assim como sem diferença estatisticamente significativa no G2.

No G3 (90 dias), houve maior densidade de colágeno nas pregas vocais que receberam a CF, em comparação com as pregas que não receberam ($p = 0,0102$, Tabela 1; Gráfico 1)

Tabela 1. Comparação entre as médias de concentração de colágeno entre as pregas vocais entre os grupos.

		Grupos		
		G1 (7 dias)	G2 (30 dias)	G3 (90 dias)
(n)		6	6	6
PVE (CF)	Min - max	0,220215 - 0,436379	0,284108 - 0,512909	0,334916 - 0,574838
	média±dp	0,3644005±0,0900611	0,410641±0,0909589	0,446994±0,0939674
(n)		6	6	6
PVD (controle)	Min - max	0,203249 - 0,625736	0,270127 - 0,414259	0,199382 - 0,456396
	média±dp	0,3664828±0,1542464	0,3405767±0,0562522	0,2753090±0,0943903
Teste t	<i>p</i>	0,9778	0,1396	0,0102

Onde PVE: prega vocal esquerda; PVD: prega vocal direita; CF: cola de fibrina; dp: desvio-padrão; *p*: nível de significância estatística. Teste "t" de Student.

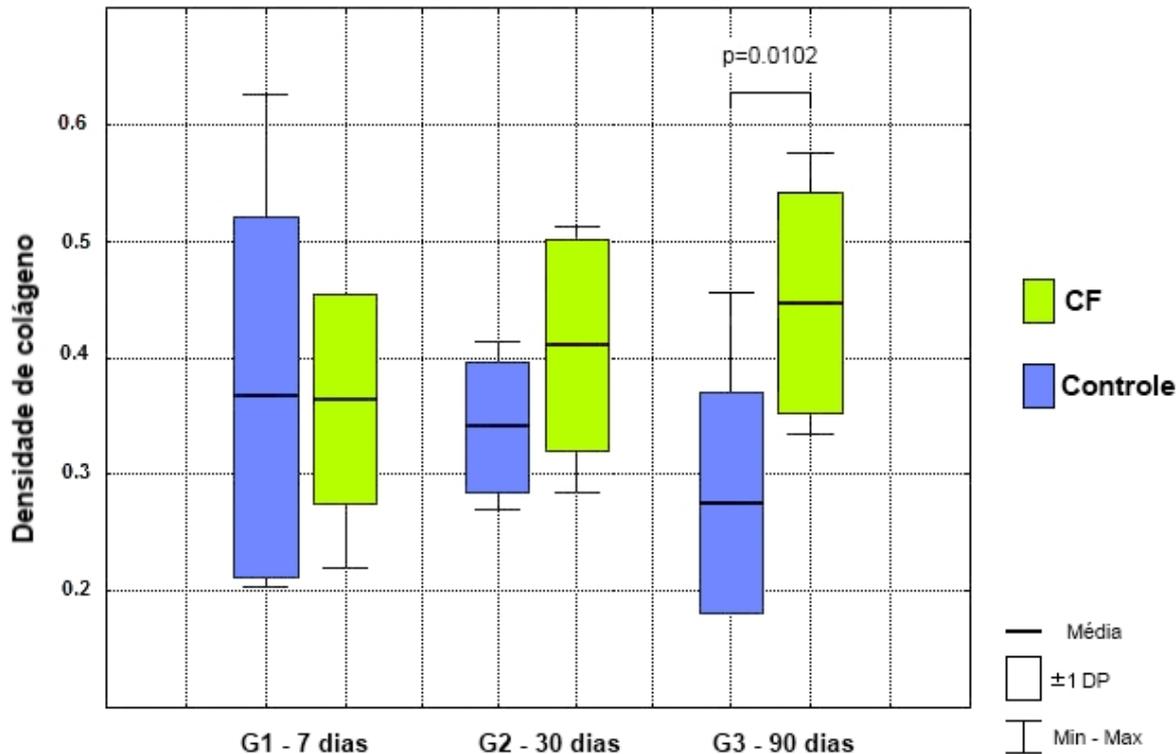
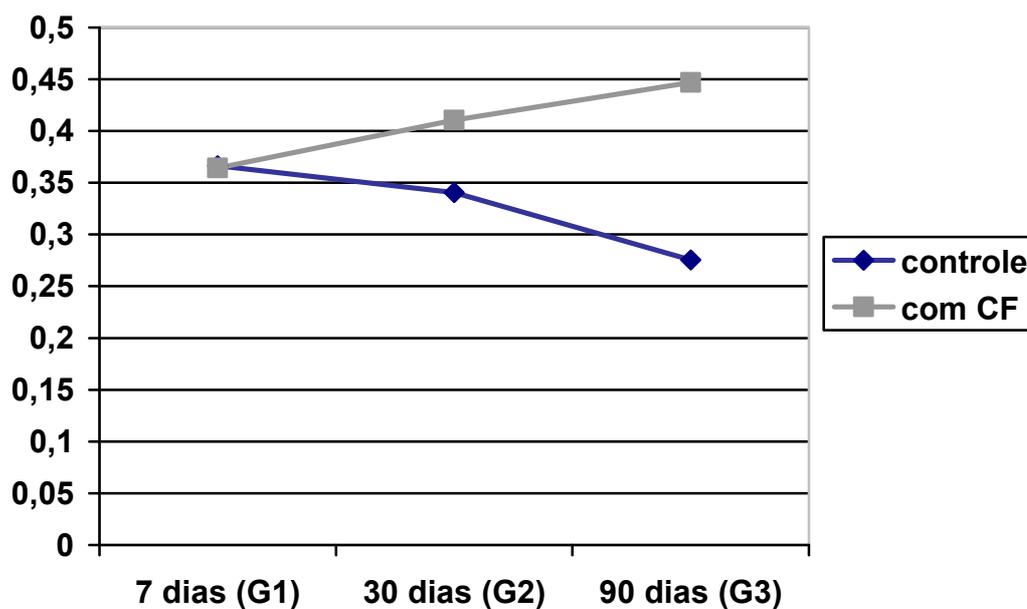


Gráfico 1. Distribuição das densidades de colágeno nos grupos com e sem a CF, nos períodos 7, 30 e 90 dias. As caixas representam ± 1 desvio padrão e as linhas horizontais representam as médias. Em azul as pregas vocais controles e em cinza as pregas vocais com CF.

Em relação às médias de densidade de colágeno entre as pregas vocais que receberam a CF, ao longo de 7, 30 e 90 dias, pode-se observar uma tendência de aumento progressivo, em contraposição ao comportamento da densidade de colágeno nas pregas vocais controles, que mostrou aparente diminuição. Apesar dessa tendência, não houve diferença estatisticamente significativa quando as médias foram comparadas através do teste ANOVA (Gráfico 2).

Gráfico 2. Comparação entre as médias de densidade de colágeno para os grupos G1, G2 e G3 para as pregas vocais com a aplicação de CF, e para as pregas vocais controles.



ANOVA:

Pregas vocais com CF: $F = 1,22 / gl = 17 / p = 0,322$

Pregas vocais controles: $F = 1,11 / gl = 17 / p = 0,3559$

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 A UTILIZAÇÃO DE COELHOS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Os estudos direcionados à compreensão dos processos biológicos relacionados com a cicatrização e a avaliação de métodos terapêuticos que buscam minimizar os efeitos da fibrose em pregas vocais têm utilizado principalmente modelos experimentais em animais (Hansen; Thibeault, 2006). O presente estudo utilizou o modelo experimental em coelhos que vem sendo empregado em diversos trabalhos na laringologia em nosso meio (Duprat et al., 2004; Carneiro, 2005; Murta, 2005; Socher, 2009; Hatchya, 2009; Campagnolo, 2010).

Esse modelo experimental em coelhos traz vantagens por ser de fácil manejo e obtenção junto ao Centro de Bioterismo da FMUSP. Além disso, a técnica de laringofissura mostrou ser de fácil realização e permitiu acesso adequado à laringe para implantação dos enxertos de fáschia nas pregas vocais, com o auxílio de microscópio cirúrgico. A técnica anestésica com ventilação espontânea também permitiu a realização do procedimento de maneira mais simples e rápida.

Em relação à técnica cirúrgica, através do estudo piloto realizado previamente, foi possível identificar complicações na técnica de fechamento da laringofissura. Inicialmente esse fechamento fora realizado com fio de catagute 4-0 seguido do fechamento da musculatura pré-tireoidea e pele com o mesmo fio, o que resultou em abscessos cervicais, possivelmente em função da deiscência da sutura. Passou-se então a utilizar a sutura da laringofissura com Prolene™ 5-0, o que ainda resultou em formação de reação inflamatória na luz laríngea, visto que a linha de sutura transfixava a mucosa laríngea. Essa complicação foi

contornada através do emprego de Prolene™ 6-0 com sutura mais superficial, sem transfixar a mucosa, o que resultou em adequado fechamento.

Em relação à ultraestrutura da prega vocal de modelos animais, Kurita et al. (1995), estudando 10 espécies diferentes, observaram que a LP da prega vocal dos coelhos poderia ser dividida em duas camadas, sendo a camada superficial pobre em componentes fibrosos, ao passo que a camada profunda apresentou-se densa em fibras colágenas e elásticas. Os autores descrevem a LP dos coelhos como fina, sendo assim mais rígida, o que poderia interferir em modelos experimentais de fonação artificial.

Apesar das diferenças da ultraestrutura da prega vocal humana com a do coelho, os trabalhos direcionados ao estudo do processo cicatricial e de possíveis terapias no sentido de minimizar os efeitos da fibrose têm amplamente utilizado o modelo em coelhos, especialmente a partir de 2002. Thibeault et al. (2002), da Universidade de Wisconsin, iniciaram seus estudos acerca do processo de cicatrização e fibrose em prega vocais de coelhos. A partir de então, vários autores passaram a utilizar o coelho como modelo experimental para estudar as variações dos componentes da MEC em resposta à lesão tecidual aguda. Esses estudos resultaram em informações detalhadas em relação ao processo cicatricial em pregas vocais de coelhos, tanto nas fases precoces (horas e dias) quanto tardias (2 a 6 meses). (Thibeault et al., 2003; Rousseau et al., 2004; Hirano et al., 2004; Branski et al., 2005; Duflo et al., 2006; Rousseau et al., 2008). Além disso, mesmo com as diferenças ultraestruturais, estudos com fonação evocada *in vivo*, através de fluxo aéreo por traqueostomia e estimulação elétrica para promover adução das pregas vocais passaram a ser realizados para avaliar o impacto da vibração nesses processos (Ge et al., 2009).

6.2 O MÉTODO PICROSSIRIUS-RED NA IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO TOTAL

O corante Sirius Red para estudo do colágeno tem sido utilizado desde 1964. O princípio de sua utilização baseia-se na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante Sirius Red, de natureza ácida (Sweat et al., 1964; Junqueira et al., 1979a,b). Esta reação cora em tons de vermelho as estruturas colágenas quando utilizada luz convencional. A técnica Sirius Red cora igualmente colágenos intersticiais, endoteliais e da membrana basal. Essa característica deve-se a semelhança entre a quantidade de moléculas corantes que se ligam aos diferentes tipos de colágeno (cerca de 126 moléculas por molécula de colágeno). Isso pode ser observado pelo fato de que todos os colágenos apresentam coloração vermelha e há similaridade entre cores equivalentes (variação de $\pm 10\%$) encontradas em tecidos contendo diferentes quantidades e tipos de colágenos. Além disso, essas diferenças entre cores e equivalentes indicam que o grau de polimerização e a estrutura tridimensional das proteínas fibrilares também influenciam na ligação das moléculas corantes.

O alinhamento das moléculas do corante Sirius Red com as moléculas de colágeno promove um aumento na sua birrefringência. Baseado nesse princípio, Junqueira et al. (1978) postularam que os tipos de colágenos poderiam ser diferenciados em função de suas diferentes birrefringências quando corados com Sirius Red e observados sob luz polarizada. Seus resultados demonstraram que o colágeno tipo I (componente das fibras espessas chamadas de fibras colágenas) apresentava-se fortemente birrefringentes, de coloração vermelha, alaranjada ou amarelada, ao passo que o colágeno tipo III (principal componente das fibras

reticulares) formava finos feixes, fracamente birrefringentes, de coloração esverdeada ou amarelo-esverdeada (Junqueira et al., 1979a,b).

Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que não apenas a espessura das fibras de colágeno como também a densidade de seus feixes influenciam no padrão de birrefringência, o que poderia levar a incorreções na interpretação das lâminas analisadas em relação aos tipos de colágenos correspondentes (Dayan et al., 1989). Leon e Rojkind (1985) observaram que o grau de polimerização e a estrutura tridimensional das proteínas fibrilares também influenciam na ligação das moléculas corantes, conseqüentemente na cor resultante.

Tendo em vista que a espessura dos feixes de fibras colágenas, seu grau de polimerização e sua densidade interferem na birrefringência, a ação desses fatores na especificidade do método picrossírius-polarização para determinar os tipos de colágenos poderia influenciar nos resultados de estudos do colágeno em pregas vocais. Tateya et al. (2006) observaram, através de método imunoistoquímico, uma configuração atípica das proteínas fibrilares na LP de pregas vocais humanas, sendo que os feixes maiores eram formados predominantemente pelo colágeno tipo III. Essa diferença poderia ser a maior característica histológica da LP que ajudaria a explicar a propriedade de vibração das pregas vocais.

Dessa forma, o método histoquímico Sirius Red possui limitações já anteriormente expostas para determinação dos tipos de colágenos presentes em uma secção histológica. Porém, por sua alta afinidade com as moléculas de colágeno, torna-se um método bastante sensível e específico para estudo do colágeno total, através da morfometria, sem a necessidade de utilização da luz polarizada (Araujo et al., 2008; Egging et al., 2007). Além disso, é um método simples e barato, já bastante sedimentado em nosso meio (Montes; Junqueira, 1991;

Melo et al., 2003; Duprat et al., 2004; Melo, 2004; Murta, 2005; Carneiro, 2005; Socher, 2009; Campagnolo, 2009).

6.3 O COLÁGENO E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Quando as pregas vocais são agudamente lesadas, o complexo processo cicatricial que se segue determinará alterações na composição da MEC e conseqüentemente mudanças nas características biomecânicas da LP, resultando em maior ou menor prejuízo à qualidade vocal.

Acredita-se que a fibrose, resultado do processo cicatricial, decorre do aumento da deposição de colágeno, principalmente do tipo I. Entretanto, novos estudos têm relacionado outros componentes da MEC ao processo de fibrose, como ácido hialurônico, fibronectina e decorina, visto que o colágeno não é a única substância que determina as propriedades viscoelásticas dos tecidos (Hirano, 2005).

O presente estudo mostrou que tanto as pregas vocais que receberam a CF quanto as pregas vocais controles apresentaram densidades de colágeno total peri-enxerto muito semelhantes após 7 dias da enxertia. Esse período compreende principalmente fase inflamatória do processo cicatricial. Branski et al. (2005) estudaram o processo cicatricial em lesões agudas em pregas vocais de coelhos, das primeiras 12 horas até 21 dias e observaram o início da deposição de colágeno no quinto dia, e uma deposição densa e desorganizada no décimo dia. Além disso, um intenso infiltrado inflamatório foi observado no terceiro dia, sugerindo que esse momento poderia ser crítico no sentido de interferir-se na resposta tecidual.

Rousseau et al. (2008) estudaram a expressão de genes nas primeiras 72 horas após lesão aguda em pregas vocais de coelhos. O RNAm de matriz metaloproteinase-1 (MMP-1), matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibronectina foi quantificado após 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas após a lesão. Especificamente em relação aos colágenos, autores observaram um aumento significativo na expressão de RNAm para o colágenos I após 72 horas quando comparadas as primeiras 2 e 4 horas após a lesão. O colágeno III também evidenciou aumento em sua expressão em 72 horas quando comparadas às 2, 4 e 8 horas iniciais. Novamente o aumento das expressões de RNAm dos colágenos I e III, principalmente nas 72 horas, parece coincidir com o infiltrado celular intenso observado por Branski et al. (2005) no terceiro dia após a lesão, novamente sugerindo que esse período aparenta ser importante para terapias no sentido de minimizar eventual fibrose.

Após 30 dias da enxertia, novamente não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos no presente estudo, apesar de haver uma tendência de aumento na densidade de colágeno total peri-enxerto no grupo que recebeu a CF, ao passo que o grupo que não recebeu a CF apresentou uma tendência de redução. Essa redução na densidade de colágeno já havia sido observada em estudo experimental por Thibeault et al. (2002), onde foram produzidas lesões agudas em pregas vocais de coelhos e a densidade de colágeno foi avaliada após 2 meses. Nesse estudo, o procolágeno I, precursor do colágeno e marcador de sua síntese apresentou-se aumentado, denotando uma fase intermediária na síntese das fibras colágenas. O procolágeno é produzido pelos fibroblastos e depositado na MEC e, por ação de procolágeno peptidases, é transformado em tropocolágeno, que então é polimerizado em fibrilas de colágeno. Nesse estudo foram analisadas ainda as características reológicas das pregas vocais, sendo observado aumento na rigidez e viscosidade nas que haviam sido lesadas. Esses resultados demonstram que a fibrose, em suas

fases mais precoces, está intimamente relacionada com a síntese aumentada do precursor do colágeno I (procolágeno I) com posterior organização em feixes espessos, resultando em um aumento na viscosidade da LP.

Quando comparados os grupos após 90 dias da enxertia, houve diferença estatisticamente significativa, com maior densidade de colágeno peri-enxerto nas pregas vocais que receberam a CF ($p=0,0102$). Tendo em vista que o processo de deposição de colágeno inicia-se em torno do quinto dia após a lesão inicial, e prossegue gradativamente através da deposição de seus precursores, o procolágenos, e que sua organização em fibras ocorre mais tardiamente, num contínuo entre as fases de deposição e remodelação, as intervenções na fase inflamatória tendem a gerar diferenças de concentração e organização das proteínas fibrilares principalmente após 2 meses, conforme demonstrado por Thibeault et al. (2002). Nesse estudo, os autores observaram que os feixes de fibras de colágeno depositados durante o processo cicatricial eram finos, tornando-se progressivamente mais espessos e insolúveis. As fibras de colágeno observadas nas pregas vocais dos coelhos quando em cicatrização apresentaram-se escassas, finas e desorganizadas, possivelmente representando um estágio inicial da remodelação.

Estudos sobre a cicatrização sugerem que o processo de remodelação progride de em torno de 20 dias até um ano, passando as fibras de colágeno de um aspecto mais fino e desorganizado para uma forma mais espessa e organizada, em arranjos paralelos e eventualmente entrelaçados (Ehrlich, 2000).

Seguindo o mesmo modelo experimental em coelhos, Rousseau et al. (2004) caracterizaram a cicatriz nas pregas vocais após 6 meses de evolução, analisando as densidades de colágeno, procolágeno I, elastina e AH. Os autores encontraram um aumento

na densidade de colágeno nas pregas vocais lesadas, apresentando-se organizado em feixes espessos, ao passo que o procolágeno e a elastina já se encontravam em níveis semelhantes em ambas as pregas vocais. Comparando esses achados com os resultados de Thibeault et al. (2002), é possível caracterizar o comportamento do colágeno e seus precursores no decorrer do processo cicatricial, onde a densidade de colágeno diminui ao longo dos dois primeiros meses, tornando-se aumentada ao redor do sexto mês, ao passo que o procolágeno I encontra-se aumentado na fase mais inicial, retornando ao níveis basais ao redor do sexto mês. Apesar das diferenças em relação à técnica cirúrgica utilizada nesses dois estudos em comparação com o presente trabalho, especialmente a respeito da lesão promovida na prega vocal com a pinça saca-bocado, quando comparada com a confecção do bolsão e enxertia, com possivelmente menor traumatismo local, é possível estabelecer uma relação de similaridade do comportamento das fibras colágenas, visto que houve uma redução nas fibras colágenas no grupo controle, até o terceiro mês de observação, semelhante aos resultados encontrados por Thibeault et al. (2002) após dois meses da lesão. Entretanto, o comportamento da densidade de colágeno total nas pregas vocais que receberam a CF mostrou uma tendência de aumento progressivo até o terceiro mês, sugerindo que a CF promoveu uma alteração na síntese e/ou maturação das fibras colágenas, provavelmente por ação nas fases mais iniciais do processo cicatricial.

Visto que a fase fibroblástica e de deposição da MEC e a fase de remodelação representam períodos intermediário e tardio do processo cicatricial, respectivamente, os resultados das intervenções terapêuticas na fase inflamatória, no sentido de minimizar o impacto da cicatriz nas propriedades biomecânicas da LP, só poderão ser observados mais tardiamente, especialmente em relação ao colágeno.

Hirano et al. (2004) estudaram o efeito do HGF sobre a deposição de colágeno, elastina, AH e sobre as propriedades reológicas nas lesões agudas em pregas vocais de coelhos após 6 meses da intervenção. O HGF é um polipeptídeo multifuncional, envolvido em processos como embriogênese, angiogênese e regeneração tecidual. Acredita-se que tenha uma potente atividade antifibrótica, conforme demonstrado em estudos experimentais em fibroses hepática, renal e pulmonar. Os autores observaram que as densidades de colágeno nas pregas vocais lesadas e tratadas com HGF mostraram-se semelhantes às pregas contralaterais não lesadas. Em relação às propriedades reológicas, os autores que houve rigidez e viscosidade significativamente maiores no grupo controle, em comparação com o grupo tratado com HGF. Os autores concluíram que o HGF mostrou ser útil na prevenção da fibrose em pregas vocais e na manutenção da viscoelasticidade, acreditando que esses fatores resultam do efeito do HGF sobre os fibroblastos, diminuindo a síntese de colágeno. Essa observação já havia sido feita pelos autores em um estudo prévio *in vitro*, utilizando fibroblastos humanos extraídos do espaço de Reinke e expostos ao HGF, onde houve menor produção de colágeno tipo I e maior produção de AH (Hirano et al., 2003).

Para compreender as diferenças encontradas na composição e ultraestrutura da MEC nas fases mais tardias do processo cicatricial, decorrentes das intervenções promovidas em suas etapas iniciais, é necessário analisar as interações dessas intervenções com as citocinas envolvidas. Essa complexa interação entre citocinas, células inflamatórias e fibroblastos ocorre principalmente no período inicial do processo de cicatrização.

Os fibroblastos possuem papel chave na produção, deposição e remodelamento da MEC, e o TGF- β 1 atua como fator mitogênico para fibroblastos, induzindo sua proliferação, adesão, migração e síntese dos constituintes da MEC, como colágenos tipo I e III e

fibronectina. Após a lesão, o TGF- β 1 é liberado pelas plaquetas, e inúmeras outras células no leito da lesão, incluindo macrófagos, queratinócitos e células endoteliais, sustentam sua produção (Hackam, Ford, 2002). Assim, o TGF- β 1 tem sido considerado como a principal citocina no mecanismo de fibrose (Bhagal et al., 2005). Assim como em outros tecidos, o TGF- β 1 também tem sido considerado um mediador chave no processo cicatricial em pregas vocais (Branski et al. 2009).

Estudos com MEC sintética, baseada em AH modificado, aplicada no sítio da lesão em pregas vocais de coelhos, demonstraram que houve melhora nos padrões reológicos após 3 semanas da lesão (Hansen et al., 2005; Duflo et al., 2006a). Para compreender os mecanismos que levaram a essa melhora, Duflo et al. (2006b) estudaram a expressão de RNAm de proteínas como procolágeno I, fibronectina e TGF- β 1, após aplicação de Carbylan-GSX, uma MEC sintética baseada em AH modificado. Os autores observaram um aumento estatisticamente significativo na expressão do RNAm desses marcadores no quinto dia, sugerindo que o Carbylan-GSX aumenta a resposta cicatricial e a reparação tecidual.

A formação do coágulo de fibrina fornece a matriz provisória para as fases de fibroplasia e deposição da MEC. Entretanto, além da adesão e do suporte mecânico, a rede de fibrina e seus componentes (em especial o fibrinogênio, a trombina, o fator XIII e a fibronectina), interferem na regulação dessas fases, atuando principalmente sobre a migração e expressão fenotípica dos fibroblastos, levando a modificações na composição e organização da MEC, principalmente em relação aos colágenos tipo I e III, com conseqüente repercussão nas propriedades biomecânicas da prega vocal operada.

Estudos da década de 50 já associavam a infiltração de fibroblastos no coágulo de fibrina (Schilling et al., 1954) e, com o advento dos selantes de fibrina para uso comercial, com altas concentrações de fibrinogênio, houve crescente interesse em estudar os efeitos dessas alterações de concentração sobre as citocinas inflamatória e os fibroblastos.

Mais recentemente, estudos *in vitro* demonstraram que as apresentações comerciais dos selantes de fibrina (Tisseel[®], Tissucol[®]), com altas concentrações de fibrinogênio, são capazes de diminuir a proliferação de fibroblastos (Cox et al., 2004) e inibir em dose-dependente direta a contração do colágeno promovida pelos mesmos (Nien et al. 2003). Gille et al. (2004), estudando padrões de migração, morfologia e viabilidade celular em diferentes colas de fibrina, também observaram menor produção de TGF- β 1 e 2 quando as células eram expostas às apresentações comerciais dos selantes de fibrina, em comparação com colas parcialmente autólogas, com menor concentração de fibrinogênio.

O presente estudo mostrou um aumento na densidade de colágeno total em torno do enxerto nas pregas vocais que receberam a CF, 90 dias após a enxertia. Tendo em vista que a síntese do colágeno está ligada à atividade fibroblástica, e que esta é regulada principalmente pelo TGF- β 1 (Branski et al., 2009), é lícito inferir que a presença da CF e/ou seus componentes, alterou o processo cicatricial, presumivelmente por alteração na expressão do TGF- β 1. Saed et al. (2004) estudaram o efeito da cola de fibrina (Tisseel[®]) sobre a expressão de RNAm *in vitro* de TGF- β 1, fibronectina e colágenos tipo I e III em células mesoteliais de peritônio e fibroblastos de peritônio normal e de adesões. Observaram que houve redução nas expressões de RNAm TGF- β 1 e RNAm colágeno tipo I, bem como aumento na expressão de RNAm de colágeno tipo III. Esse aumento na transcrição do RNAm para o colágeno tipo III poderia justificar o comportamento apresentado pelas pregas vocais expostas a CF, com

aumento da densidade de fibras colágenas em comparação com o grupo controle, após 90 dias da enxertia da fásia.

A distribuição do colágeno tipo I na região próxima a membrana basal e na camada profunda da LP, como previamente reportado por Melo et al. (2003) e Tateya et al. (2006), sugere a necessidade de garantir força tênsil à essas áreas, ao passo que o colágeno tipo III é predominante em toda a LP das pregas vocais (Gray et al., 1993), formando tanto fibras onduladas finas quanto grossas que auxilia a manter a estrutura da LP, permitindo sua flexibilidade e elasticidade (Tateya et al., 2006). Assim, o aumento de densidade de colágeno peri-enxerto encontrado nas pregas vocais que receberam a CF poderia ser decorrente do aumento da expressão do RNAm de colágeno tipo III, o que eventualmente poderia resultar em uma cicatriz com melhores propriedades viscoelásticas. Entretanto, o impacto nessas propriedades biomecânicas decorrente do aumento da densidade de colágeno promovido pela CF dependerá, além do tipo de colágeno produzido, seu arranjo e organização, também de possíveis alterações nas demais proteínas, intersticiais e fibrilares, não estudadas nesta pesquisa.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A procura da compreensão dos processos biológicos acerca das fases mais precoces do processo cicatricial revelou um campo extenso para pesquisas e para o desenvolvimento de terapias no sentido de restabelecer a ultra-estrutura da LP das pregas vocais e conseqüentemente suas propriedades viscoelásticas. Segundo Ford (2008), as pesquisas em Laringologia estão passando por uma mudança de paradigma do conhecimento científico, onde os critérios postulados por Arnold tornaram-se insuficientes para promover a adequada

restauração da função vocal. Os avanços científicos da medicina regenerativa, baseada no maior conhecimento dos complexos mecanismos de sinalização das citocinas que influenciam nos fenótipos das células inflamatórias e dos fibroblastos, acrescentaram parâmetros novos aos postulados por Arnold para os biomateriais utilizados, através da modulação na produção das proteínas intersticiais e fibrilares, bem como seu arranjo ultra-estrutural na MEC.

A aplicação de cola de fibrina (Tissucol[®]) para fixação de enxertos de fáscia muscular em pregas vocais de coelhos não mostrou diferença na densidade de colágeno quando comparados as pregas vocais controle no 7º e 30º dias. Porém foi observado aumento estatisticamente significativo na densidade de colágeno em torno dos enxertos após 90 dias ($p = 0,0102$), possivelmente por interferência na regulação da produção de colágeno. Essa interferência também fica reforçada pelo fato de que na presença da cola de fibrina, o depósito de colágeno mostrou uma tendência de aumento progressivo de densidade comparando o 7º, 30º e 90º dias, enquanto no grupo controle houve uma tendência a decréscimo progressivo, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa, pelo menos nesse tamanho de amostra.

Embora o uso da CF tem se mostrado útil na melhoria do processo cicatricial (Amrani et al., 2001), estudos avaliando seus efeitos sobre as pregas vocais, em relação aos componentes da MEC, fibroblastos, células inflamatórias e citocinas do processo inflamatório, bem como sobre as repercussões nas propriedades biomecânicas das mesmas, poderão trazer maiores esclarecimentos e segurança em seu uso.

7 CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir:

- A aplicação de cola de fibrina (Tissucol[®]) para fixação de enxertos de fásia muscular em pregas vocais de coelhos promoveu um aumento estatisticamente significativo na densidade de colágeno em torno dos enxertos após 90 dias, quando comparada com a densidade de colágeno nas pregas vocais enxertadas que não receberam a cola de fibrina ($p = 0,0102$), possivelmente por interferência na regulação da produção de colágeno. Nos coelhos sacrificados após 7 e 30 dias não foi observado diferença com relação ao grupo controle.

8 ANEXOS

Anexo A



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 08.11.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa n° **898/06**, intitulado: "Avaliação do efeito da cola de fibrina na deposição de colágeno e no processo inflamatório após enxertia autóloga de fásia lata em pregas vogais de coelho" apresentado pelo Departamento de **Oftalmologia e Otorrinolaringologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **DR. Luiz Ubirajara Sennes**

Pesquisador (a) Executante: **DR. Fabrício Scapini**

CAPPesq, 08 de novembro de 2006.

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

Anexo B

FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Documento 2

Animais de Pesquisa Salvo Vidas

DTAEP/090/FM/150307

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Ricardo Ferreira Bento
Responsável pelo LIM 32 - Lab.de Otorrinolaringologia

Senhor(a) Professor(a),

Encaminhamos a V.Sa. o no. DTAEP, datas de liberação, vencimento e previsão total relativos ao projeto de pesquisa:

No. DTAEP: 039/071

TITULO: Efeito da cola fibrino na deposicao de cologeno e no

RESPONSÁVEIS: Lennes,L.U.; Scapini,F...

LIBERAÇÃO: 26/03/2007 VENCIMENTO: 30/04/2007

PREVISÃO: 4/sem PREVISÃO TOTAL: 20

Esclarecemos que o fornecimento será conforme a disponibilidade do setor.

(A não utilização dos animais por 2 meses acarretará o cancelamento do projeto.)

Atenciosamente,

Observações: Liberados 04 coelhos, machos, peso de 2,5 a 4,0kg, por semana. Sujeito a cortes.

Anexo C

	Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT		Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT
1-PVD7-A	1	11686,42	33467,551	0,3491866	1-PVE7-A	1	5112,83	18787,836	0,2721351
	2	20710,246	35066,086	0,5906061		2	5192,136	10369,916	0,5006922
	3	15205,967	20126,574	0,7555169		3	3847,622	5499,028	0,6996913
	4	7365,067	9211,184	0,7995788		4	7075,156	15278,619	0,4630756
	5	15640,308	21467,936	0,7285427		5	5885,401	10214,982	0,5761538
	6	16545,055	46508,465	0,3557429		6	6871,378	12242,258	0,5612835
	7	15107,229	23403,826	0,6455025		7	18306,752	42903,836	0,4266927
	8	10319,673	15160,975	0,6806734		8	14912,554	38419,32	0,3881525
	9	6217,679	9407,383	0,6609361		9	8713,432	31990,861	0,2723725
	10	9002,994	13027,521	0,6910750		10	6725,547	33042,313	0,2035435
		MÉDIA	0,6257361			MÉDIA	0,4363793		
2-PVD7-A	1	8917,386	34776	0,2564236	2-PVE7-A	1	4903,45	34280,035	0,1430410
	2	9.465	41608,516	0,2274774		2	4483,29	9389,191	0,4774948
	3	3729,627	18120,83	0,2058199		3	9244,586	16934,752	0,5458944
	4	4565,046	10721,451	0,4257862		4	4954,22	10349,434	0,4786948
	5	2438,157	5250,258	0,4643880		5	4086,763	6425,658	0,6360069
	6	6075,874	11365,172	0,5346047		6	4352,165	9431,207	0,4614643
	7	9716,742	24274,961	0,4002784		7	16794,174	44207,734	0,3798922
	8	7566,394	12241,558	0,6180908		8	9006,495	33050,016	0,2725111
	9	7336,705	10862,556	0,6754124		9	7647,275	22602,371	0,3383395
	10	4951,244	9522,592	0,5199471		10	7162,515	27449,1	0,2609381
		MÉDIA	0,4328228		11	7762,294	12568,582	0,6175950	
					12	3639,292	7563,768	0,4811480	
						MÉDIA	0,4244183		
3-PVD7-A	1	7062,726	28157,07	0,2508331	3-PVE7-A	1	7644,999	27709,773	0,2758954
	2	6782,619	21815,795	0,3109040		2	6448,491	10548,135	0,6113394
	3	10971,466	29646,891	0,3700714		3	9389,017	32746,275	0,2867202
	4	8100,699	39830,887	0,2033773		4	20168,939	33891,387	0,5951052
	5	2900,684	41398,262	0,0700678		5	16179,688	21166,297	0,7644081
	6	6705,765	47770,172	0,1403756		6	5659,74	8365,575	0,6765512
	7	12161,201	42919,066	0,2833519		7	15182,683	20740883	0,0007320
	8	10791,653	39730,746	0,2716197		8	12777,963	23385,27	0,5464108
	9	6352,305	36281,754	0,1750826		9	12061,238	35862,117	0,3363225
		MÉDIA	0,2306315		10	6812,206	28330,037	0,2404588	
						MÉDIA	0,4333944		
4-PVD7-A	1	9104,183	39903,012	0,2281578	4-PVE7-A	1	4610,389	29673,676	0,1553697
	2	11042,699	43791,773	0,2521638		2	4688,468	18197,861	0,2576384
	3	6917,246	41833,301	0,1653526		3	6288,055	17648,852	0,3562869
	4	4545,614	38150,594	0,1191492		4	2984,191	24107,246	0,1237881
	5	5884,876	23677,631	0,2485416		5	4537,911	40904,57	0,1109390
	6	3020,08	11032,72	0,2737385		6	1925,036	7263,528	0,2650277
	7	2928,52	4904,676	0,5970874		7	5106,704	10268,027	0,4973403
	8	4017,437	8555,172	0,4695916		8	5712,785	36426,184	0,1568318
	9	4080,11	6722,921	0,6068954		9	11305,474	23048,441	0,4905093
	10	12294,953	34160,465	0,3599176		10	8206,964	25831,27	0,3177143
	11	8106,826	35807,145	0,2264025		11	4489,592	10286,06	0,4364734

				MÉDIA 0,3224544				MÉDIA 0,2879926			
5-PVD7-A	1	1543,04	8303,251	0,1858356	5-PVE7-A	1	7456,484	31390,755	0,2375376		
	2	3817,51	40215,684	0,0949259		2	4782,829	28493,384	0,1678575		
	3	3577,143	37488,313	0,0954202		3	4920,339	19338,845	0,2544278		
	4	6995,5	23531,275	0,2972852		4	7439,934	25937,932	0,2868361		
	5	7166,891	14873,514	0,4818559		5	2934,942	17294,273	0,1697060		
	6	8263,511	35169,027	0,2349656		6	8392,288	30374,827	0,2762909		
	7	9713,415	43068,922	0,2255319		7	5308,383	21273,474	0,2495306		
	8	4754,293	42173,457	0,1127319		8	2384,845	14855,113	0,1605403		
	9	3090,107	30689,939	0,1006879		9	3294,845	18384,953	0,1792142		
				MÉDIA 0,2032489					MÉDIA 0,2202157		
6-PVD7-A	1	6877,68	19944,504	0,3448409	6-PVE7-A	1	4893,495	19384,432	0,2524446		
	2	5372,105	25182,332	0,2133283		2	6492,294	33294,943	0,1949934		
	3	9490,555	16929,326	0,5605985		3	3223,566	14283,945	0,2256776		
	4	4605,311	9100,507	0,5060499		4	8294,433	21293,687	0,3895254		
	5	8534,69	16682,832	0,5115852		5	5229,198	18364,413	0,2847463		
	6	12171,005	30684,512	0,3966498		6	11284,233	19287,323	0,5850596		
	7	13448,119	36322,719	0,3702399		7	6738,384	24339,485	0,2768499		
	8	5538,243	13091,508	0,4230409		8	7822,761	20384,742	0,3837557		
	9	4685,317	10723,377	0,4369255		9	2133,321	11459,856	0,1861560		
	10	6006,197	29060,024	0,2066825		10	8172,124	29178,327	0,2800751		
	11	4179,724	13679,558	0,3055453						MÉDIA 0,3059284	
	12	6164,108	18535,145	0,3325632							
				MÉDIA 0,3840042							

Anexo D

	Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT		Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT
1-PVD30	1	6483,966	26358,256	0,2459937	1-PVE30	1	6265,472	9115,212	0,6873644
	2	4878,24	17850,35	0,2732854		2	4728,558	7053,973	0,6703397
	3	4572,049	8701,703	0,5254200		3	3333,8	5621,4	0,5930551
	4	2017,471	3775,319	0,5343842		4	6424,723	12494,179	0,5142173
	5	3068,224	5927,592	0,5176173		5	9781,517	20023,109	0,4885114
	6	4717,354	8267,887	0,5705634		6	13848,497	33883,684	0,4087069
	7	8407,941	22692,705	0,3705129		7	2219,674	5731,167	0,3872988
	8	7968,523	21391,783	0,3725039		8	5156,247	12553,702	0,4107352
	9	4649,953	18813,047	0,2471664		9	10067,226	30220,584	0,3331248
	10	2109,907	13978,396	0,1509406		10	13246,617	36555,906	0,3623660
	11	686,962	6417,955	0,1070375				MÉDIA	0,4855720
	12	1949,72	25866,846	0,0753753					
		MÉDIA	0,3325667						
2-PVD30	1	6002,172	41332,258	0,1452176	2-PVE30	1	14686,718	45976,609	0,3194389
	2	3075,401	33308,941	0,0923296		2	4784,58	14623,693	0,3271800
	3	3261,672	30754,363	0,1060556		3	2884,578	13259,751	0,2175439
	4	4364,244	19127,291	0,2281684		4	5382,784	32805,973	0,1640794
	5	3998,529	8074,438	0,4952083		5	7950,491	39944,504	0,1990384
	6	1713,73	2482,624	0,6902898		6	9628,858	32246,109	0,2986053
	7	2425,728	5473,994	0,4431368		7	9485,477	20492,813	0,4628685
	8	5643,634	8769,104	0,6435816				MÉDIA	0,2841078
	9	4737,662	9806,901	0,4830947					
	10	4697,747	12755,379	0,3682954					
		MÉDIA	0,3695378						
3-PVD30	1	4222,965	25816,074	0,1635789	3-PVE30	1	5303,827	25074,84	0,2115199
	2	3601,127	18067,961	0,1993101		2	4770,925	20640,57	0,2311431
	3	5780,886	23694,612	0,2439747		3	6947,357	19527,494	0,3557731
	4	2478,073	10275,905	0,2411537		4	3558,761	11130,933	0,3197181
	5	8349,818	30148,631	0,2769551		5	8022,443	16791,547	0,4777668
	6	5164,65	14170,62	0,3644618		6	6773,516	13183,593	0,5137838
	7	4434,096	11727,386	0,3780976		7	10785	16131,195	0,6685804
	8	5124,035	11895,975	0,4307369		8	4073,283	5131,388	0,7937975
	9	2546,524	7296,966	0,3489839		9	5985,714	7651,477	0,7822952
	10	4852,156	27337,756	0,1774892		10	8834,054	12026,575	0,7345445
		MÉDIA	0,2824742	11	7853,679	11559,062	0,6794391		
				12	5908,16	15284,571	0,3865441		
						MÉDIA	0,5129088		
4-PVD30	1	5072,915	40237,566	0,1260741	4-PVE30	1	9330,369	22426,428	0,4160435
	2	6924,599	24492,22	0,2827265		2	6464,873	28637,104	0,2257516
	3	3825,038	6729,399	0,5684071		3	7314,823	20066,525	0,3645286
	4	7208,382	23718,072	0,3039194		4	4256,053	9934,7	0,4284028
	5	7795,556	29318,639	0,2658908		5	3253,094	7498,293	0,4338446
	6	11935,365	22744,174	0,5247658		6	2492,954	4.566.447	0,0005459
	7	3097,635	5239,754	0,5911795		7	13079,603	26250,066	0,4982693

	8	5886,452	11022,916	0,5340195		8	12981,216	30017,857	0,4324498
	9	3205,826	6005,847	0,5337842		9	8935,243	35339,543	0,2528398
	10	3917,298	7054,498	0,5552908				MÉDIA	0,3391862
	11	4942,315	10693,79	0,4621668					
	12	4673,412	20968,295	0,2228799					
			MÉDIA	0,4142587					
5-PVD30	1	9020,325	33599,727	0,2684642	5-PVE30	1	6140,299	15064,688	0,4075955
	2	6346,703	37102,117	0,1710604		2	7177,045	17003,781	0,4220852
	3	9786,068	37537,859	0,2606986		3	9967,437	26559,76	0,3752834
	4	8062,009	22426,428	0,3594870		4	6690,009	11085,24	0,6035060
	5	6983,421	24429,719	0,2858576		5	7403,932	12988,218	0,5700499
	6	12807,898	36476,078	0,3511314		6	3389,296	6972,742	0,4860779
	7	6482,73	9475,85	0,6841318		7	7864,008	25172,879	0,3124000
	8	3344,48	5437,055	0,6151271		8	5706,833	21982,635	0,2596064
	9	8059,558	21521,156	0,3744947		9	6334,798	8409,691	0,7532736
			MÉDIA	0,3744948				MÉDIA	0,4655420
6-PVD30	1	7364,287	27812,928	0,2647793	6-PVE30	1	4938,232	14228,483	0,3470667
	2	8163,987	33823,851	0,2413678		2	3234,493	11263,384	0,2871688
	3	5163,812	26513,932	0,1947584		3	5234,543	12493,67	0,4189756
	4	4829,423	23935,857	0,2017652		4	8435,399	19173,482	0,4399513
	5	7422,912	18732,483	0,3962588		5	6431,912	22948,192	0,2802797
	6	10928,382	31822,84	0,3434132		6	4873,921	9343,283	0,5216497
	7	4827,283	11293,922	0,4274231		7	1273,329	8163,293	0,1559823
	8	3192,662	21823,442	0,1462951		8	4927,953	10198,32	0,4832122
	9	6267,823	24481,448	0,2560234		9	6947,934	15287,764	0,4544768
	10	2837,88	12382,629	0,2291823				MÉDIA	0,3765292
			MÉDIA	0,2701267					

Anexo E

	Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT		Campo	área col. (AC)	área total (AT)	AC/AT
1-PVD90- A	1	6885,558	23608,656	0,2916540	1-PVE90- A	1	2321,738	5162,725	0,4497117
	2	3089,582	9357,154	0,3301839		2	4723,482	11354,143	0,416014
	3	2869,347	7817,79	0,3670279		3	8167,924	23037,709	0,3545458
	4	3336,076	28667,041	0,1163732		4	9893,734	34351,289	0,2880164
	5	5429,702	27887,992	0,1946968		5	7413,736	32683,252	0,2268359
	6	5846,011	17481662	0,0003344		6	5997,794	19873,951	0,3017917
	7	5000,087	36477,129	0,1370746		7	5392,412	8773,48	0,6146264
		MÉDIA	0,2053350		8	3449,169	5647,835	0,6107064	
					9	5052,957	10762,592	0,4694926	
					10	2622,153	9818,105	0,2670732	
					11	10749,286	23186,043	0,4636102	
						MÉDIA	0,4056749		
2-PVD90- A	1	3672,830	16712,029	0,2197716	2-PVE90- A	1	5135,415	8750,547	0,5868679
	2	3423,323	21871,992	0,1565163		2	2840,811	6683,882	0,4250241
	3	6983,824	22482,430	0,3106347		3	3389,471	9016,999	0,3758979
	4	6832,420	14163,232	0,4824054		4	3308,065	12239,457	0,2702787
	5	4829,832	17230,823	0,2803019		5	8908,808	35783,688	0,2489628
	6	2384,923	11821,220	0,2017493		6	7065,703	34115,301	0,2071124
	7	5483,430	29731,721	0,1844303		7	7968,698	41422,07	0,1923781
	8	4029,823	20383,330	0,1977019		8	8591,236	23676,406	0,3628606
	9	5612,022	31730,880	0,1768631		9	10820,889	31377,602	0,3448603
		MÉDIA	0,2455972			MÉDIA	0,3349159		
3-PVD90- A	1	4222,965	25816,074	0,1635789	3-PVE90- A	1	10876,735	21663,311	0,5020809
	2	3601,127	18067,961	0,1993101		2	1365,522	3122,319	0,4373422
	3	5780,886	23694,612	0,2439747		3	1079,638	2316,836	0,4659967
	4	2478,073	10275,905	0,2411537		4	713,398	2024,474	0,3523868
	5	8349,818	30148,631	0,2769551		5	9236,533	22367,256	0,4129489
	6	5164,65	14170,62	0,3644618		6	14549,99	25518,986	0,5701633
	7	4434,096	11727,386	0,3780976		7	4734,366	9249,138	0,5118711
	8	5124,035	11895,975	0,4307369		8	7862,082	13776,02	0,5707078
	9	2546,524	7296,966	0,3489839		9	12464,418	35060,309	0,3555136
	10	4852,156	27337,756	0,1774892			MÉDIA	0,4643346	
		MÉDIA	0,2824742						
4-PVD90- A	1	6651,144	29846,816	0,2228427	4-PVE90- A	1	5964,881	12372,683	0,4821009
	2	6619,107	22130,391	0,2990958		2	3643,319	7237,093	0,503423
	3	4513,051	18730,414	0,2409477		3	2905,061	9550,078	0,3041924
	4	4794,208	25439,68	0,1884539		4	6830,763	20322,299	0,3361216
	5	7315,173	37091,613	0,1972191		5	12739,272	34233,82	0,3721253
	6	5429,877	16467,148	0,3297400		6	9921,92	32648,063	0,3039053
	7	6221,53	17263,354	0,3603894		7	8668,266	28405,49	0,3051616
		MÉDIA	0,2626698	8	7725,705	20205,004	0,3823659		
				9	10518,198	31001,207	0,3392835		

MÉDIA 0,36985335-PVD90-
A

1	9848,917	21548,992	0,4570477
2	2154,899	5641,183	0,3819942
3	2576,635	4469,81	0,5764529
4	1994,713	3473,029	0,5743439
5	6140,474	11066,158	0,5548876
6	17424,59	44291,766	0,3934047
7	14200,031	36521,07	0,3888175
8	8392,71	23642,969	0,3549770
9	10156,86	23862,678	0,4256379
		MÉDIA	0,4563959

5-PVE90-
A

1	1345,74	2722,291	0,494341
2	4953,345	7440,342	0,6657416
3	13906,095	20041,666	0,6938592
4	4387,353	6292,973	0,6971829
5	3476,13	10116,245	0,3436186
6	12302,306	22194,99	0,554283
		MÉDIA	0,5748377

6-PVD90-
A

1	3756,237	18970,957	0,1979993
2	1989,111	17986,379	0,1105899
3	1878,994	10339,503	0,1817296
4	1937,116	32021,148	0,0604949
5	5341,468	29241,26	0,1826689
6	5469,092	39371,684	0,1389093
7	4404,335	9989,145	0,4409121
8	6781,394	21388,98	0,3170508
9	6540,677	39860,996	0,1640871
		MÉDIA	0,1993824

6-PVE90-
A

1	13978,222	32136,691	0,4349615
2	12934,122	21460,934	0,6026822
3	5944,749	8566,377	0,693963
4	5021,971	8236,025	0,6097566
5	5549,798	8269,368	0,6711272
6	8619,947	24857,408	0,3467758
7	11130,232	30314,42	0,3671597
		MÉDIA	0,4140473

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrose JA, Weinrauch M. Thrombosis in ischemic heart disease. *Arch Intern Med.* 1996; 156:1382-1394.

Amrani DL, Diorio JP, Delmotte Y. Wound healing. Role of commercial fibrin sealants. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936:566-79.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HAP, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J.* 2008; 32: 61–9.

Arnold. GE. Vocal Rehabilitation of Paralytic Dysphonia: IX. Technique of Intracordal injection. *Arch Otolaryngol.* 1962; 76(4):358-368.

Arnold GE. Vocal rehabilitation of paralytic disphonia. X. Functional results of intrachordal injection. *Arch Otolaryngol* 1963; 78:179-86.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005; 41:27-51.

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.

Bergel S. Ueber wirkungen des fibrins [abstract]. *Dtsch med Wochenschr.* 1909; 35:663-5.

Bhogal RK, Stoica CM, Mcgaha TL, Bona CA. Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. *J Clin Immunol.* 2005; 25:592-603.

Brandenburg JH, Kirkham W, Koschkee D. Vocal cord augmentation with autogenous fat. *Laryngoscope.* 1992; 102(5):495-500.

Branski RC, Barbieri SS, Weksler BB, Saltman B, Krishna P, Kraus DH, Broadbelt NV, Chen J, Poppas DP, Felsen D. Effects of transforming growth factor-beta1 on human vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009; 118(3):218-26.

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

Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. *J Voice.* 2005; 19(2):283-9.

Bruennings W. Uber eine neue Behandlungsmethode der Rekurrensslahmung. *Verh Deutsch Ges Pathol.* 1911; 18:93-151.

Buhler RB. *Distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal humana de fetos e adultos: método histoquímico e imunoistoquímico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Faculdade de São Paulo; 2008.

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

Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PHN. Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010; 119(2):133-9.

Campos G. Fibrin glue implants: A new alternative for difficult cases in phonosurgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133(2) supp: P180-P181.

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

Carneiro CG, Scapini F. The rabbit as an experimental model in laryngology. *Arq Int Otorinolaringol*. 2009; 13(2):146-50.

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

Catten M, Hammond TH, Hammond Eh, Gray SD. An analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118:663-7.

Chen X, Thibeault SL. Novel isolation and biochemical characterization of immortalized fibroblasts for tissue engineering vocal fold lamina propria. *Tissue Eng.* 2009; 15(2):201-12.

Chhetri DK, Jahan-Parwar B, Hart SD, Bhuta SM, Berke GS. Injection laryngoplasty with calcium hydroxylapatite gel *in vivo* canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004; 113:259-64.

Chhetri DK, Head C, Revazova E, Hart S, Bhuta S, Berke GS. Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 131(6):864-70.

Cho AB. *Aplicação da cola de fibrina em microanastomoses vasculares: análise comparativa com a técnica de sutura convencional utilizando um modelo experimental de retalho microcirúrgico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

Clark RAF. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J Invest Dermatol.* 1993; 11:647-61.

Clark RAF. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 355-367.

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

Clark RAF. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993; 306:42-8.

Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin(ogen) provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 1982; 79:264-9.

Conboy P, Brown DH. Use of tissue sealant for day surgery parotidectomy. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 37(2):208-11.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group [abstract]. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941; 47:200-2.

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

Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng.* 2004; 10(5-6):942-54.

Cronkite EP, Lozner EL, Deaver J. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA.* 1944; 124:976-78.

Damrose EJ, Berke GS. Advances in the management of glottic insufficiency. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 11:480-4.

Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989; 93(1):27-9.

Detweiler MB, Detweiler JG, Fenton J. Sutureless and reduced suture anastomosis of hollow vessels with fibrin glue: a review. *J Invest Surg*. 1999; 12:245–62.

Dietrich W, Späth P, Zühlsdorf M, Dalichau H, Kirchhoff PG, Kuppe H, Preiss DU, Mayer G. Anaphylactic Reactions to aprotinin reexposure in cardiac surgery: relation to antiaprotinin immunoglobulin G and E antibodies. *Anesthesiology*. 2001; 95:64-71.

DiPietro L A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*. 1995; 4:233-40.

Draf W. Erfahrungen mit der Technik der Fibrinklebung in der Hals-Nasen-Ohren-Chirurgie. *Laryngol Rhino Otol (Stuttgart)*. 1980; 59:99-107

Duflo S, Thibeault SL, Li W, Shu XZ, Prestwiche GD. Vocal fold tissue repair *in vivo* using a synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006; 12(8):2171-80.

Duflo S, Thibeault SL, Li W, Shu XZ, Prestwiche GD. Effect of a synthetic extracellular matrix on vocal fold lamina propria gene expression in early wound healing. *Tissue Eng*. 2006; 12(11):3201-07.

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

Dunn CJ, Goa KL. Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. *Drugs*. 1999; 58(5): 863-86.

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

Egging D, van Vlijmen-Willems I, van Tongeren T, Schalkwijk J, Peeters A. Wound healing in tenascin-X deficient mice suggests that tenascin-X is involved in matrix maturation rather than matrix deposition. *Connec Tissue Res*. 2007; 48:93–8.

Engelhard E, Toksoy A, Goobeler M, Debus S, Brucker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phasespecific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol*. 1998; 153:1849-60.

Ehrlich HP. In: Garg HG and Longaker MT, editores. Collagen considerations in scarring and regenerative repair. *Scarless Wound Healing*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 2000. p. 99–113.

Evans LA, Morey AF. Hemostatic agents and tissue glues in urologic injuries and wound healing. *Urol Clin N Am.* 2006; 33:1-12.

Fazio MJ, Zitelli JA, Goslen JB. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. *Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas.* 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000:23-28.

Fleming DJ, McGuff S, Simpson CB. Comparison of microflap healing outcomes with traditional and microsuturing techniques: initial results in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110:707-12.

Ford CN. Paradigms and progress in vocal fold restoration. *Laryngoscope.* 2008; 118:1709-13.

Ford CN, Martin DW, Warner TF. Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. *Laryngoscope.* 1984; 94:513-8.

Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: a preliminary clinical study. *Laryngoscope.* 1995; 105:944-948.

Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2001; 34:229-37.

Gastpar H, Kastenbauer ER, Behbehani AA. Clinical experiences with a human fibrin adhesive in head and neck surgery [abstract]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1979; 58(5):389-99.

Ge PJ, French LC, Ohno T, Zealear DL, Rousseau B. Model of evoked rabbit phonation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009; 118(1): 51-5.

Gentilhomme E, Neveux Y, Lebeau J, Desmouliere A, Bergier J, Schmitt D, Haftek M. Modulation of a fibrotic process induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. *Cell Biol Toxicol*. 1999; 15(4):229-38.

Giannini G, Mauro V, Agostino T, Gianfranco B. Use of autologous fibrin-platelet glue and bone fragments in maxillofacial surgery. *Transfus Apher Sci*. 2004; 30(2):139-44.

Gille J, Meisner U, Ehlers EM, Muller A, Russlies M, Behrens P. Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: a histomorphologic study. *Tissue and Cell*. 2005; 37:339-48.

Giovanni A, Chanteret C, Lagier A. Sulcus vocalis: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007; 264:337-44.

Glatz FR, Kalkanis J, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Mowlawi A. Volume analysis of preadipocyte injection for vocal cord medialization. *Laryngoscope*. 2003; 113:1113-7.

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

Grey EG. Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery [abstract]. *Surg Gynecol Obstet.* 1915; 21:452-4.

Hackam DJ, Ford HR. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surg Infect (Larchmt).* 2002; 3 Suppl 1:S23-35.

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

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006; 115(3):225-32.

Hansen JK, Thibeault SL. Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring. *J Voice.* 2006; 20(1):110-20.

Hansen JK, Thibeault SL, Walsh JF, Shu XZ, Prestwich G. In vivo engineering of the vocal fold extracellular matrix with injectable hyaluronic acid hydrogels: early effects on tissue repair and biomechanics in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114:662

Hertegard S, Hallen L, Laurent C, Lindstrom E, Olofsson K, Testad P, Dahlqvist A. Cross-linked hyaluronan used as augmentation substance for treatment of glottal insufficiency: safety aspects and vocal fold function. *Laryngoscope.* 2002; 112(12):2211-9.

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

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

Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigation. *Otologia. (Fukuoka)*. 1975; 1(21):239-442.

Hirano M, Chevalier Jackson L. Phonosurgery: past, present, future. *Amer BronchoEsophageal Assoc*. 1995; 25-30.

Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states: an anatomical and physical studies. *ASHA Reports*. 1981; 11:11-30.

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

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

Hirano S, Bless DM, Hartig GK, Massey RJ, Ford CN. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003; 112: 1026-33.

Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, Ford CN. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2004; 114: 548-56.

Horch R, Bannasch H, Stark G. Transplantation of Cultured Autologous Keratinocytes in Fibrin Sealant Biomatrix to Resurface Chronic Wounds. *Transplant Proc*. 2001; 33:642-4.

Horowitz B, Busch M. Estimating the pathogen safety of manufactured human plasma products: application to fibrin sealants and to thrombin. *Transfusion*. 2008; 48:1739-53.

Hulmes DJS. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol*. 2002; 137, 2-10.

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

Ishii K, Yamashita K, Akita M, Hirose H. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000; 109(11):1055-64.

Isshiki N. Progress in laryngeal framework surgery. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120:120-7.

Isshiki N, Morita H, Okamura H, et al. Thyroplasty as a new phonosurgical technique. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1974;78:451-3.

Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg.* 2001; 182(suppl): 1S-7S.

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

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

Kalomenidis I, Guo Y, Lane KB, Hawthorne M, Light RW. Transforming growth factor-beta3 induces pleurodesis in rabbits and collagen production of human mesothelial cells. *Chest.* 2005; 127(4):1335-40.

Kang DR, Leong H, Foss R, Martin P, Brooker CR, Seid AB. Sutureless cartilage graft laryngotracheal reconstruction using fibrin sealant. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124(6):665-70.

Kavanagh MC, Ohr MP, Czyz CN, Cahill KV, Perry JD, Holck DE, Foster JA. Comparison of fibrin sealant versus suture for wound closure in Müller muscle-conjunctiva resection ptosis repair. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2009; 25(2):99-102.

Kojima H, Omori K, Shoji K, Kanaji M. Reconstruction of the anterior commissure with a free mucosal flap. *Am J Otolaryngol*. 1993; 14(5):339-42.

Kurita S, Nagata K, Hirano M. A comparative study of the layer structure of the vocal fold. In: Bless DM, Abbs JH (editors). *Vocal fold physiology*. 1ª ed. San Diego: 1995. p.3-21.

Kutty J, Webb K. Tissue engineering therapies for the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng*. 2009; 15:249-62.

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

Leon AL, 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.

Linder A, Lindholm CE. Vocal fold lateralization using carbon dioxide laser and fibrin glue. *J Laryngol Otol*. 1992; 106(3):226-30.

Lois M, Noppen M. Bronchopleural Fistulas: an overview of the problem with special focus on endoscopic management. *Chest*. 2005; 128(6):3955-65.

Luo Y, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Effects of growth factors on extracellular matrix production by vocal fold fibroblasts in 3-dimensional culture. *Tissue Eng*. 2006. 12(12):3365-74.

Lyons MB, Lyons GD, Webster D, Wheeler VR. Adhesives in larynx repair. *Laryngoscope*. 1989; 99(4):376-381.

MacGillivray TE. Fibrin sealants and glues. *J Card Surg*. 2003;18:480-5.

Mandelbaum SH, Di Santis, EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. *An Bras Dermatol*. 2003; 78(4):393-410.

Martin F, Spitzer H, Gastpar H. Endolaryngeale eingriffe unter verwendung hochkonzentrierten humanen fibrinogens als gewebekleber. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttgart)*. 1981; 60: 369-72.

Matras H, Dinges HP, Lassmann H, Mamoli, B. Zur nachtlosen interfazikularen nerventransplantation im tierexperiment. *Wien Med Wochenschr*. 1972; 122(37):517-23.

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; 113: 2187-91.

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

Mobley SR, Hilinski J, Toriumi DM. Surgical tissue adhesives. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2002; 10:147-54.

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

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

Naumann C, Lang G. Fibrinkleber in der Larynxchirurgie. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1981; 60: 364-6.

Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*. 1992; 156:430-42.

Nishiyama K, Hirose H, Masaki T, Nagai H, Hashimoto D, Usui D, Yao K, Tsunoda K, Okamoto M. Long-term result of the new endoscopic vocal fold medialization surgical technique for laryngeal palsy. *Laryngoscope*. 2006; 116:231-4.

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

Nien Y, Han Y, Tawil B, Chan LS, Tuan T, Garner WL. Fibrinogen inhibits fibroblast-mediated contraction of collagen. *Wound Rep Reg*. 2003; 11:380-385.

Owens JM. Soft tissue implants and fillers. *Otolaryngol Clin N Am*. 2005; 38: 361–9.

Panis R, Scheele J. Hepatitis Risiko bei der Fibrinklebung in der HNO-Chirurgie. *Laryngol Rhinol Otol*. 1981; 60:367-8.

Pearl AW, Woo P, Ostrowski R, Mojica J, Mandell DL, Constantino P. A preliminary report on micronized AlloDerm injection laryngoplasty. *Laryngoscope*. 2002; 112:990-6.

Pryor, S. G.; Moore, E. J.; Maragos, N. E. e cols. Mucosal flat approximation in microlaryngeal surgery: fibrin glue as a viable alternative. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 131(2):139.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005; 42:405–26.

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

Reijonen P, Ternoven H, Harinen K, Rihkanen H, Aaltonen LM. Long-term results of autologous fascia in unilateral vocal fold Paralysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009; 266:1273-8.

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

Remacle M, Lawson G. Results with collagen injection into the vocal folds for medialization. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 15:148-52.

Remacle M, Lawson G, Evrard I, Degols JC, Jamart J. Microsurgery of sulcus vergeture with carbon dioxide laser and injectable collagen. *Ann Otol Laryngol.* 2000; 109:141-148.

Rihkanen H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope.* 1998; 108:51-54.

Rodgers BJ, Abdul-Karim F, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope.* 2000; 110:2012-5.

Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, Bless DM. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice.* 2004; 18(1):116-24.

Rousseau B, Ge PJ, Ohno T, French LC, Thibeault SL. Extracellular matrix gene expression after vocal fold injury in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008; 117(8):598-603.

Rousseau B, Ge PJ, French LC, Zeale DL, Thibeault SL, Ossoff RH. Experimentally induced phonation increases matrix metalloproteinase-1 gene expression in normal rabbit vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 138:62-8.

Saed G, Kruger M, Diamond MP. Expression of transforming growth factor-b and extracellular matrix by human peritoneal mesothelial cells and by fibroblasts from normal peritoneum and adhesions: effect of Tisseel. *Wound Rep Reg.* 2004; 12:557-64.

Sasai H, Watanabe Y, Muta H, Yoshida J, Hayashi I, Ogawa M, Kubo T. Long-term histological outcomes of injected autologous fat into human vocal folds after secondary laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132:685-688.

Sataloff RT, Hawkshaw M, Shaw A. Autologous fat injection: the intraoperative endpoint. *Ear Nose Throat J.* 1999; 78:534.

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):238-246.

Sato K. Reticular fibers in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998; 107: 1023-8.

Sato K, Hirano S, Nakashima T. Age-related changes of collagenous fibers in the human vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002; 111:15-20.

Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997; 106:44-8.

Scheule AM, Beierlein W, Wendel HP, Jurmann MJ, Eckstein FS, Ziemer G. Aprotinin in fibrin tissue adhesives induces specific antibody response and increases antibody response of high-dose intravenous application. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 118(2):348-53.

Schilling JA, Favata BV, Rarakovich M. Studies of fibroplasia in wound healing. *Surg Gyn Obstet.* 1954; 96:143–9.

Sekhar LN, Natarajan SK, Manning T, Bhagawati D. The use of fibrin glue to stop venous bleeding in the epidural space, vertebral venous plexus, and anterior cavernous sinus: technical note. *Neurosurgery.* 2007; 61(suppl):E51.

Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann. Otol. Laryngol.* 1996; 105:602-606.

Siedentop KH, Harris DM, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. *Laryngoscope.* 1985; 95:1074-6.

Siedentop KH, Harris DM, Ham K, Sanchez B. Extended experimental and preliminary surgical findings with autologous fibrin tissue adhesive made from patients own blood. *Laryngoscope.* 1986; 96:1062-4.

Silecchia G, Boru CE, Mouiel J, Rossi M, Anselmino M, Morino M, Toppino M, Gaspari A, Gentileschi P, Tacchino R, Basso N. The use of fibrin sealant to prevent major complications following laparoscopic gastric bypass: results of a multicenter, randomized trial. *Surg Endosc.* 2008; 22(11):2492-7.

Sivasankar M, Ivanisevik A. Atomic force microscopy investigation of vocal fold collagen. *Laryngoscope.* 2007; 117: 1876-81.

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

Spotnitz WD, Prabhu R. Fibrin sealant tissue adhesive-review and update. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(3):245-70.

Staindl O. Tissue adhesion with highly concentrated human fibrinogen in Otolaryngology. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979; 88: 413-8.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI: Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol*. 1964; 78:69.

Takagi M, Akiba T, Yamazaki Y, Nariai K, Iwaki T. The wound-healing effect of fibrin glue for tracheal anastomosis in experimental pulmonary surgery. *Surg Today*. 2001; 31(9):845-7.

Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006 Jun;115(6):469-76.

Thibeault SL, Bless DM, Gray SD. Interstitial protein alterations in rabbit vocal fold with scar. *J Voice*. 2003; 17(3):377-83.

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

Thibeault SL, Klemuk SA, Smith ME, Leugers C, Prestwich G. In vivo comparison of biomimetic approaches for tissue regeneration of the scarred vocal fold. *Tissue Eng.* 2009; 15:1481-6.

Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope.* 2004; 114:760-4.

Titze IR. Current topics in voice production mechanisms. *Acta Oto-Laryngologica.* 1993; 113(3):421-7.

Tsuji DH, Nita LM, Hachiya A, Imamura R, Sennes LU. T-shaped microsuture: a new suture technique for laryngeal microsurgery. *J Voice.* 2009; 23(6):739-42.

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

Tsunoda K, Niimi S. Autologous transplantaions of fascia into the vocal fold. *Laryngoscope.* 2000; 110:680-2.

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

Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5:2814-23.

Ximenez Filho JA, Tsuji DH, Saldiva PHN, Sennes, LU. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003; 112:894-8.

Yamada Y, Boo J, Ozawa R, Nagasaka T, Okasaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 2003; 31:27–33.

Yoo J, Chandarana S, Cosby R. Clinical application of tissue adhesives in soft-tissue surgery of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 16:312-7.

Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet*. 1940; 275:126-32.

Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. *Lancet*. 1940; 236:126-8.

Wang GJ, Goldthwaite CA Jr, Burks SG, Spotnitz WD. Experience improves successful use of fibrin sealant in total knee arthroplasty: implications for surgical education. *J Long Term Eff Med Implants*. 2003; 13:389-97.

Wang MC, Pins GD, Silver FH. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. *Mater Sci Eng C*. 1995; 3:131-5.

West JL. Wound healing. In: Patrick CW, Mikos AG, McIntire LV, Langer RS, editors. *Frontiers in tissue engineering*. Amsterdam: Elsevier; 1998. p. 138-151.

Woo P, Casper J, Griffin B, Colton R, Brewer D. Endoscopic microsuture repair of vocal fold defects. *J Voice*. 1995; 9(3):332-9.

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

Zeitels SM. New procedures for paralytic dysphonia. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000; 33:841-853.

Zeitels, SM, Healy GB. Medical progress: Laryngology and phonosurgery. *NEJM*. 2003; 349(9):882-92.