

PAULO ANTONIO MONTEIRO CAMARGO

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE E DA FIBROGÊNESE NA
PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA
UTILIZANDO INSTRUMENTAL A FRIO E LASER CO₂**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de
Ciências de Saúde da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau acadêmico de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2007

PAULO ANTONIO MONTEIRO CAMARGO

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE E DA FIBROGÊNESE NA
PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA
UTILIZANDO INSTRUMENTAL A FRIO E LASER CO₂**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de
Ciências de Saúde da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau acadêmico de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2007

Paulo Antonio Monteiro Camargo

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE E DA FIBROGÊNESE NA PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA UTILIZANDO INSTRUMENTAL A FRIO E LASER CO₂

- Curitiba 2007

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos.

Tese (Doutorado) Pós Graduação em Clínica Cirúrgica/ Setor de Ciências de Saúde/
Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

1. Fonocirurgia. 2. Cicatrização. 3. Prega Vocal. 4. Laser CO₂ 5 Angiogênese. 6. Colágeno. 7 Imunoistoquímica.

Dedico esta tese a:

Denise, esposa, amiga de todas as horas pelo decisivo estímulo e imensa compreensão.

Hugo e Diva, meus pais, por minha formação pessoal e profissional além do apoio constante.

Eduardo e Fabíola, meus filhos, cuja presença querida trouxe muita vida para os meus esforços.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, orientador, pelos ensinamentos, pelas horas dispensadas, pela dedicação e paciência na realização desta Tese.

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA, pelo estímulo e apoio à formação em nível de pós-graduação nesta Universidade.

Ao Prof. Dr. JORGE EDUARDO F. MATIAS, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. GERSON DE SÁ TAVARES FILHO, pelo incentivo e sugestões sempre úteis.

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, pelo apoio e por dar soluções para as minhas dúvidas em várias etapas na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. DANIEL RISPOLI, pelo estímulo, apoio e sugestões na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. AMADEU BONA FILHO, pela ajuda no planejamento e preparo dos animais e na realização da parte experimental em suas instalações para realização de parte deste estudo.

Ao Prof. Dr. LUIZ FERNANDO KUBRUSLY, por sua valiosa orientação na correção do texto quanto à língua inglesa.

Ao Dr. ROGÉRIO MOREIRA, pelo planejamento, preparo e realização do experimento.

Ao Dr. PAULO EDUARDO PRZYSIENY, pela ajuda e incentivo.

À Dra. TAISE DE FREITAS MARCELINO, pela ajuda e disponibilidade e revisão do texto.

Ao Dr. Leonardo GABRIEL MOLLER, pela amizade e ajuda constante na revisão deste estudo.

À Estagiária FABIANE B. ZANATA FLIZIKOWSKI, acadêmica do curso de Biologia, estagiária do Laboratório de Patologia Experimental da PUC, pela ajuda no preparo das peças histológicas.

À Dra. DANIELE GIACOMETTI, pela ajuda no planejamento, preparo, interpretação e descrição das peças histológicas

À Prof^a. Dra. ANA PAULA CAMARGO MARTINS, bióloga, pela ajuda no preparo das peças histológicas.

Ao Prof. Dr. VINÍCIUS RIBAS FONSECA, pela amizade ajuda dedicação e interesse no transcorrer de todo este trabalho.

Aos Médicos residentes do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia Buco-Maxilo-Facial do Hospital Angelina Caron, pelo auxílio no preparo dos animais, como também na ajuda em vários estágios deste trabalho, demonstrando total interesse e dedicação.

Ao Prof. Dr. ARY ELIAS SABBAG JUNIOR, pelo aconselhamento e execução da análise estatística nosso eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO AUGUSTO FLEISCHFRESSER, pelo aconselhamento da análise estatística desta tese.

À Prof^a. Dra. MÁRCIA OLANDOSKI ERBANO, Professora do Departamento de Informática do CEFET-PR, pela ajuda no processamento dos dados da Tese.

À Sra. REGINA APARECIDA SASS MARQUES, pela ajuda e disponibilidade constante.

A todos os que participaram, de maneira direta ou indireta, na realização deste trabalho, nossa eterna gratidão.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se
arrepende

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 OBJETIVOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 FONOMICROCIRURGIA.....	5
2.2 PROCESSO CICATRICIAL.....	11
2.2.1 Fase Inflamatória ou Exsudativa.....	11
2.2.2 Fase Proliferativa ou Fibroblástica.....	13
2.2.2.1 Angiogênese.....	14
2.2.2.2 Proliferação fibroblástica.....	16
2.2.2.3 Reepitelização.....	17
2.2.3 Fase de Maturação ou Remodelação.....	18
2.3 IMUNOISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO.....	20
2.3.1 Imunoistoquímica para Miofibroblastos e Vasos Sangüíneos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODO.....	22
3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO.....	23
3.2 AMOSTRA.....	23
3.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS.....	24
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	24
3.5 ATO CIRÚRGICO.....	25
3.5.1 Posicionamento.....	25
3.5.2 Introdução do laringoscópio.....	26
3.5.3 Microscopia das pregas vocais.....	27
3.5.4 Preensão e exêrese de fragmento de mucosa do bordo livre da prega vocal direita realizada com micro tesoura laríngea.....	29
3.5.5 Preensão e exêrese de fragmento de mucosa do bordo livre da prega vocal esquerda realizada com laser CO ₂	30
3.6. PÓS-OPERATÓRIO.....	33
3.7. DADOS AVALIADOS.....	33
3.7.1 EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO.....	33
3.8. SACRIFÍCIO E COLETA DA LARINGE.....	33
3.9 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	34
3.10 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	39
3.11 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜINEOS.....	39
3.11.1 Análise Qualitativa do Colágeno pela técnica de imunoistoquímica.....	39
3.11.2 Avaliação imunoistoquímica da quantidade de miofibroblastos.....	42
3.11.3 Avaliação imunoistoquímica da quantidade de vasos sangüíneos.....	44
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45

4 RESULTADOS	46
4.1 AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM RELAÇÃO AO COLÁGENO MADURO (TIPO I) E COLÁGENO IMATURO (TIPO II)	47
4.2 AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM RELAÇÃO AO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS E NÚMERO DE VASOS	49
4.2.1 NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS	49
4.2.2 NÚMERO DE VASOS SANGÜÍNEOS.....	50
5 DISCUSSÃO	52
5.1 MÉTODO	53
5.1.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL.....	53
5.1.2 FONOMICROCIRURGIA LARÍNGEA À FRIO E A LASER CO ₂	53
5.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	56
5.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	57
5.3.1 DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO.....	57
5.3.2 NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS	57
5.3.3 NÚMERO DE VASOS SANGÜÍNEOS.....	58
5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	58
6 CONCLUSÕES	60
6. CONCLUSÕES	61
7 REFERÊNCIAS.....	62
8 ANEXOS.....	71
ANEXO I.....	72
<i>EMBRIOLOGIA DA LARINGE.</i>	72
ANEXO II.....	74
<i>ANATOMIA DA LARINGE</i>	74
ANEXO III.....	82
<i>HISTOLOGIA E ULTRA ESTRUTURA DA PREGA VOCAL</i>	82
ANEXO IV	87
<i>FUNÇÃO FONATÓRIA DA LARINGE</i>	87
ANEXO V.....	91
<i>PRINCÍPIO DA IMUNOLOGIA</i>	91

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PREGA VOCAL</i>	6
<i>FIGURA 2 – SUÍNOS LARGER WHITE UTILIZADOS NO EXPERIMENTO</i>	24
<i>FIGURA 3 – POSIÇÃO CIRÚRGICA</i>	26
<i>FIGURA 4 – INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO</i>	27
<i>FIGURA 5 – MICROSCÓPIO CIRÚRGICO</i>	28
<i>FIGURA 6 – PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE MUCOSA DA PREGA VOCAL DIREITA</i>	29
<i>FIGURA 7 – EXÉRESE DA MUCOSA DO BORDO LIVRE DA PREGA VOCAL DIREITA</i>	30
<i>FIGURA 8 – PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE PREGA VOCAL ESQUERDA</i>	31
<i>FIGURA 9 – INÍCIO DA EXÉRESE A LASER CO₂</i>	32
<i>FIGURA 10 – ASPECTO PÓS EXÉRESE A LASER CO₂</i>	33
<i>FIGURA 11 – LARINGE SUÍNA RETIRADA EM BLOCO, DA BASE DA LÍNGUA AO QUARTO ANEL TRAQUEAL</i>	35
<i>FIGURA 12 – INCISÃO LONGITUDINAL ANTERIOR</i>	35
<i>FIGURA 13 – OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE</i>	36
<i>FIGURA 14 – OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE</i>	37
<i>FIGURA 15 – INCISÃO DA CARTILAGEM TIREÓIDE</i>	38
<i>FIGURA 16 – EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM</i>	41
<i>FIGURA 17 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DO COLÁGENO TIPO I</i>	41
<i>FIGURA 18 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DO COLÁGENO TIPO III</i>	42
<i>FIGURA 19 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS</i>	44
<i>FIGURA 20 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGÜÍNEOS COM A ÍNTIMA CORADA</i>	45
<i>FIGURA 21 – SECÇÃO FRONTAL DE CORTE LARÍNGEO, DEMONSTRANDO COMPARTIMENTOS LARÍNGEOS E ESTRUTURAS HISTOLÓGICAS LARÍNGEAS</i>	81
<i>FIGURA 22 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PREGA VOCAL. TEORIA DA “COBERTURA E CORPO”</i>	86
<i>FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS FORÇAS QUE DETERMINAM A VIBRAÇÃO DAS PREGAS VOCAIS</i>	88
<i>FIGURA 24 – CICLO VIBRATÓRIO NORMAL</i>	89

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1 – TIPOS E SUBTIPOS DO COLÁGENO</i>	19
<i>TABELA 2 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO</i>	23
<i>TABELA 3: Quantificação do colágeno maduro e imaturo nos grupos controle e experimento</i>	47
<i>TABELA 4 Quantificação do número de miofibroblastos e número de vasos nos grupos controle e experimento</i>	49
<i>TABELA 5 – MÚSCULOS INTRÍNSECOS DA LARINGE</i>	78

LISTA DE GRÁFICOS

<i>GRÁFICO 1 – DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO TIPO I MÉDIAS ± DP</i>	<i>48</i>
<i>GRÁFICO 2 DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO III (MÉDIAS ± DP)</i>	<i>48</i>
<i>GRÁFICO 3 - NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS MÉDIAS ± DP</i>	<i>50</i>
<i>GRÁFICO 4 – NÚMERO DE VASOS SANGÜINEOS MÉDIAS ± DP</i>	<i>51</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ATI: artéria tireóidea inferior
ATP: adenosina trifosfato
ATS: artéria tireóidea superior
CAL: músculo cricoaritenóideo lateral
CAP: músculo cricoaritenóideo posterior
CEFET-PR: Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT: músculo cricotireóideo
DNA: ácido desoxirribonucléico
ECG: eletrocardiograma
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al. : e outros (as)
G: grupo
GC: grupo controle
GE: grupo experimento
h: hora
IA: músculo interaritenóideo
IM: intra-muscular
IV: intra-venoso
LASER: empréstimo da sigla em língua inglesa- laser- (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)
LP: lâmina própria
MB: membrana basal
Microflap: retalho de mucosa microscópico
Microspot: ponto microscópico de radiação dirigida
MTC: mitomicina-C
N: nervo
NLI: nervo laríngeo inferior(recorrente)
NLS: nervo laríngeo superior
pH: pontencial hidrogenado
Prof.: professor

Prof.^a: professora

RNA: ácido ribonucléico

seg: segundo

TA: músculo tireoaritenóideo

TV: televisor

UFPR: Universidade Federal do Paraná

UNICEMP: Centro Universitário Positivo

v: volume

VHF: empréstimo da língua inglesa – frequência muito alta (Very High Frequency)

LISTA DE SÍMBOLOS

CO₂: Dióxido de carbono

°C: Graus Celsius

=: Igual a

kg: Kilo

≤: Menor ou igual a

<: Menor que

μm²: Micrômetros quadrado

μs: Microsegundo

mg: Miligrama

ml: Mililitro

mm: Milímetro

ms: Milisegundo

nm: Nanômetro

p: Nível de significância estatística

N: Número de amostra

x: Por (descrição de área)

%: Por cento

X: Vezes (aumento no microscópio)

W: Watts

RESUMO

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE E DA FIBROGÊNESE NA PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA UTILIZANDO INSTRUMENTAL A FRIO E LASER CO₂

Introdução: A cicatriz excessiva interfere com o resultado na fonocirurgia. Há controvérsias qual o método cirúrgico que associa-se a menor processo cicatricial na fonocirurgia: a laser ou a frio. **Objetivo:** Avaliar a cicatrização em pregas vocais de suínos após exérese de fragmento de mucosa a frio e laser CO₂ pelo método imunoistoquímico e analisar após 30 dias os seguintes parâmetros: 1- deposição do colágeno maduro e imaturo; 2- número de miofibroblastos; 3- número de vasos sanguíneos. **Material e método:** Foram estudados 30 suínos, separados em 2 grupos: controle (n=6) e experimento (n=24). Grupo controle, não realizada cirurgia. Grupo experimento subdivididos em 2 grupos: Grupo experimento I: Exérese de fragmento de mucosa a frio em prega vocal direita, Grupo experimento II: exérese de fragmento de mucosa com laser CO₂ em prega vocal esquerda. Após 30 dias os animais foram sacrificados e coletadas amostras das pregas vocais para avaliação e análise histológica, a fim de quantificar a deposição de colágeno maduro e imaturo, a angiogênese, por método imunoistoquímico, através do programa Pro Image-plus 4.5[®] acoplado ao microscópio Olympus[®] BX50. Os resultados foram comparados pelo teste de Friedmann com $p \leq 0,05$. **Resultado:** No grupo controle (GC) a média de colágeno maduro foi $2657,42 \mu^2 \pm 504,90$. No grupo experimento (GEII) laser CO₂ a média de deposição de colágeno maduro foi de $1433,34 \mu^2 \pm 53,07 \mu^2$ ($p=0,022$). No grupo experimento a frio (GEI) a média foi de $1332,68 \mu^2 \pm 77,60 \mu^2$ ($p=0,022$). Houve diminuição da deposição do colágeno maduro no grupo experimento (GEI) ($p=0,0464$). No grupo controle a média de colágeno imaturo foi de $458,91 \pm 122,84$ ($p=0,022$). No grupo experimento laser CO₂ (GEII) a média de deposição de colágeno imaturo foi de $1215,58 \mu^2 \pm 162,5 \mu^2$ ($p=0,022$). No grupo experimento a frio (GEI) a média de colágeno foi de $1020,61 \mu^2 \pm 111,81 \mu^2$ ($p=0,022$). Não houve diferença da deposição de colágeno grupo experimento ($p=0,1159$). No grupo controle (GC) a média do número de miofibroblastos foi de $0,583 \pm 0,585$ ($p=0,115$). No grupo experimento instrumental a frio (GEI) a média do número de miofibroblastos foi de $0,889 \pm 0,455$ ($p=0,115$). No grupo experimento a laser CO₂ (GEII) a média do número de miofibroblastos foi de $1,556 \pm 1,559$ ($p=0,115$). No grupo controle (GC) a média do número de vasos sanguíneos foi de $0,917 \pm 0,585$ ($p=0,006$). No grupo experimento instrumental a frio (GEI) a média do número de vasos sanguíneos foi de $4,889 \pm 1,747$ ($p=0,006$). No grupo experimento a laser CO₂ (GEII) a média do número de vasos sanguíneos foi de $6,500 \pm 1,894$ ($p=0,006$).

Conclusão: 1a. Há menor concentração da deposição do colágeno maduro no grupo experimento quando comparado com o grupo controle como também no grupo instrumental a frio quando comparado ao grupo laser CO₂ 1b. Há maior concentração da deposição do colágeno imaturo quando comparado o grupo experimento e o grupo controle (sem lesão). Não há diferença quando comparada a concentração da deposição de colágeno imaturo entre o grupo experimento. 2. Não há diferença quanto ao número de miofibroblastos nos grupos estudados. 3. Há aumento do número de vasos sanguíneos no grupo experimento I e II quando comparado ao grupo controle. Porém, não há diferença quando os subgrupos são comparados entre si.

Palavras-chave: Fonocirurgia; Cicatrização; Prega Vocal; Laser CO₂; Angiogênese Colágeno; Imunoistoquímica.

ABSTRACT

IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY OF ANGIOGENESIS AND FIBRINOGENESIS IN SWINE VOCAL FOLDS AFTER MUCOSAL FRAGMENT EXCISION WITH COLD INSTRUMENT AND CO₂ LASER.

Introduction: Excessive scar interferes with the surgical results. There are controversies about which surgical method is associated with less scarring in phonosurgery: Laser or cold instrument. **Objectives:** To evaluate the scarring of swine vocal fold after mucosal fragment excision with cold instrument or CO₂ laser by immunohistochemistry method and to analyse the following parameters after 30 days: 1- Imature and mature collagen deposition ; 2- Miofibroblasts number; 3- Number of blood vessels. **Methods:** 30 swines were divided in 2 groups: control group (n=6), and experimental group further divided in two subgroups (n=24). The control group was not operated. The Experimental I Group (GEI): excision of mucosa fragment of the right vocal fold with cold instrument The Experimental II Group (GEII): excision of mucosa fragment of the left vocal fold with CO₂ Laser. After 30 days the animals were sacrificed and the vocal folds were collected for histology and immunohistochemical analysis to quantify the mature and immature collagen deposition and angiogenesis by the Pro Image-plus 4.5[®] software attached to the microscope Olympus[®] BX50. The results were compared with Friedmann test with $p \leq 0.05$. **Results:** In the control group (GC) the mean mature collagen deposition was $2657,42 \mu^2 \pm 504,90$. In the Experiment Group I (GEI) the mean the mature collagen deposition was $1433,34 \mu^2 \pm 53,07 \mu^2$ ($p=0,022$). In the Experiment Group II (GEII) the mean the mature collagen deposition was $1332,68 \mu^2 \pm 77,60 \mu^2$ ($p=0,022$). There was a decrease of the mature collagen deposition on the cold instrument Group (GEII) ($p=0,0464$). In the control group the mean of the imature collagen was $458,91 \pm 122,84$ ($p=0,022$). In the Experiment Group (GEI) the mean the imature collagen deposition was $1215,58 \mu^2 \pm 162,5 \mu^2$ ($p=0,022$). In the Experiment Group (GEII) the mean the imature collagen deposition was $1020,61 \mu^2 \pm 111,81 \mu^2$ ($p=0,022$). There was no significant difference in the collagen deposition between the control group and the experimental group. ($p=0,1159$). In the control group (GC) the mean number of miofibroblasts was $0,583 \pm 0,585$ ($p=0,115$). In the experimental group (GEII) the mean number of miofibroblasts was $0,889 \pm 0,455$ ($p=0,115$). In the Experimental Group (GEI) the miofibroblasts number was $1,556 \pm 1,559$ ($p=0,115$). In the Control Group (GC) the mean number of blood vessels were $0,917 \pm 0,585$ ($p=0,006$). In the Experimental Group II (GEII) the mean number of blood vessels were $4,889 \pm 1,747$ ($p=0,006$). In the Experimental Group I (GEI) the mean number of blood vessels were $6,500 \pm 1,894$ ($p=0,006$). **Conclusions:** 1a. There was a decrease concentration of mature collagen deposition in the experiment group when compared with the control group. There was a decrease concentration of mature collagen deposition in the cold instrumental group (GEI) when compared to the CO₂ Laser Group (GEII). 1b. There was a increase concentration of mature collagen deposition in the experiment group when compared with the control group. There was no difference in the imature collagen deposition between the experiment group. 2. There was no difference in miofibroblasts number between the groups. 3. There were an increase in the number of blood vessels in experiments groups when compared to the control group, but there was no difference when were compared experiment groups cold instrumental (GEI) and CO₂ laser (GEII).

Keywords: phonosurgery; healing; vocal fold; CO₂ laser; angiogenesis; collagen; immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

A laringologia teve grande avanço com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de várias técnicas de visualização da laringe, em particular com o emprego do microscópio cirúrgico e, mais recentemente da videoendoscopia. A fonomicrocirurgia, a partir dos trabalhos de KLEINSASSER, em 1964, permitiu não só maior facilidade no ato cirúrgico, mas, principalmente, na documentação e no ensino da patologia laríngea em toda a sua extensão, possibilitando cirurgias mais precisas e conservadoras. Este é o avanço mais importante da laringologia moderna.

Com a descrição histórica de HIRANO (1973, 1993), sobre a teoria de corpo e cobertura, durante a vibração da prega vocal e a compreensão da fisiopatologia das lesões benignas das pregas vocais, os fonocirurgiões atuais procuram cada vez mais procedimentos que visam melhorar a qualidade vocal e aumentar a velocidade na recuperação da função fonatória (GARRET et al, 2001). Técnicas de “microflaps” foram desenvolvidas para permitir preservar a camada mucosa normal adjacente e o ligamento vocal subjacente (COUREY,1995; SATALOFF,1995; COUREY, 1997).

A fonomicrocirurgia usando laser CO₂ é baseada na compreensão recente dos mecanismos fisiopatológicos da prega vocal, como, também, nos princípios físicos e biológicos da tecnologia do laser, levando em consideração a sua interação com os tecidos. Portanto, um laser que ofereça a vantagem de menor dano termal nos tecidos adjacentes e que esteja associado a fatores locais que proporcionem melhor cicatrização, seria ideal para os procedimentos microcirúrgicos endolaríngeos (GARRET et al., 2001). Várias modificações foram feitas na utilização do laser CO₂ com este intuito e incluem: a diminuição do tamanho do spot de irradiação, variações no pulso de energia, irradiação controlada por computador.

Os objetivos destas técnicas são os de minimizar a formação de cicatrizes, aderências e rigidez da cobertura mucosa, resultando em melhora objetiva e subjetiva do padrão vocal. No entanto o resultado inevitável de qualquer incisão cirúrgica é a possibilidade de formação de cicatriz (GARRET et al., 2001).

Terapias adjuvantes têm sido investigadas para ajudar a modular o processo cicatricial na prega vocal, após excisão de sua cobertura de mucosa. Corticosteróides sistêmicos ou tópicos, resfriamento prévio ao procedimento cirúrgico, cola de fibrina, Mitomicina C tópica dentre outros métodos, são usados no sentido de melhorar a cicatrização após procedimentos fonocirúrgicos. (BOUCHAYER et al.,1988 ; ABITBOL, 1995; CAMARGO et al., 2006.)

1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a cicatrização em pregas vocais de suínos após exérese de fragmento de mucosa a frio e com laser CO₂ pelo método imunohistoquímico e analisar, após 30 dias, os seguintes parâmetros:

- 1- deposição do colágeno maduro e imaturo;
- 2- número de miofibroblastos;
- 3- número de vasos sanguíneos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FONOMICROCIRURGIA

A laringe é um órgão essencial à produção da voz normal, mas a fisiologia da fonação não está limitada a esse órgão. O mecanismo vocal inclui a musculatura do dorso e do abdome, o gradil torácico, os pulmões e a faringe, a cavidade oral e o nariz. Cada um desses componentes desempenha uma importante função na produção da voz, embora seja possível falar sem uma laringe; por exemplo, em pacientes submetidos à laringectomia, através de próteses fonatórias.

Além disso, virtualmente todas as partes do corpo desempenham algum papel na produção da voz e podem ser responsáveis por disfunções vocais. Mesmo algo tão remoto como um tornozelo torcido pode alterar a postura, prejudicando a função dos músculos do abdome, do dorso e do tórax, o que resultará em ineficiência vocal, fraqueza e rouquidão.

A laringe é composta de quatro unidades anatômicas básicas: o arcabouço, os músculos intrínsecos, os músculos extrínsecos e a mucosa. No arcabouço laríngeo as partes mais importantes são as cartilagens: tireóide, cricóide e as duas aritenóides. Os músculos intrínsecos da laringe estão ligados a essas cartilagens. Um desses músculos, o tiroaritenóide, ou músculo vocal, se estende de cada lado desde a cartilagem aritenóide até a parte interna da cartilagem tireóide, logo abaixo e atrás do “pomo de adão”, formando o corpo das pregas vocais.

As pregas vocais atuam como o oscilador, ou fonte de voz, do tracto vocal. O espaço entre as pregas vocais é chamado de glote, sendo utilizado como um ponto de referência anatômico. Sua estrutura anatômica foi proposta por HIRANO, (1974, 1993), sendo composta por uma cobertura que corresponde ao epitélio pavimentoso estratificado e à camada superficial da lâmina própria ou Espaço de Reinke. A zona de transição é representada pelas camadas intermediárias e profundas da lâmina própria, formando o ligamento vocal. Finalmente o corpo da prega vocal é formado pelo músculo vocal.

Sendo assim, agrupam-se as camadas em 3 compartimentos, que são: cobertura, transição e corpo vocal, conforme descrito abaixo:

1. Cobertura:

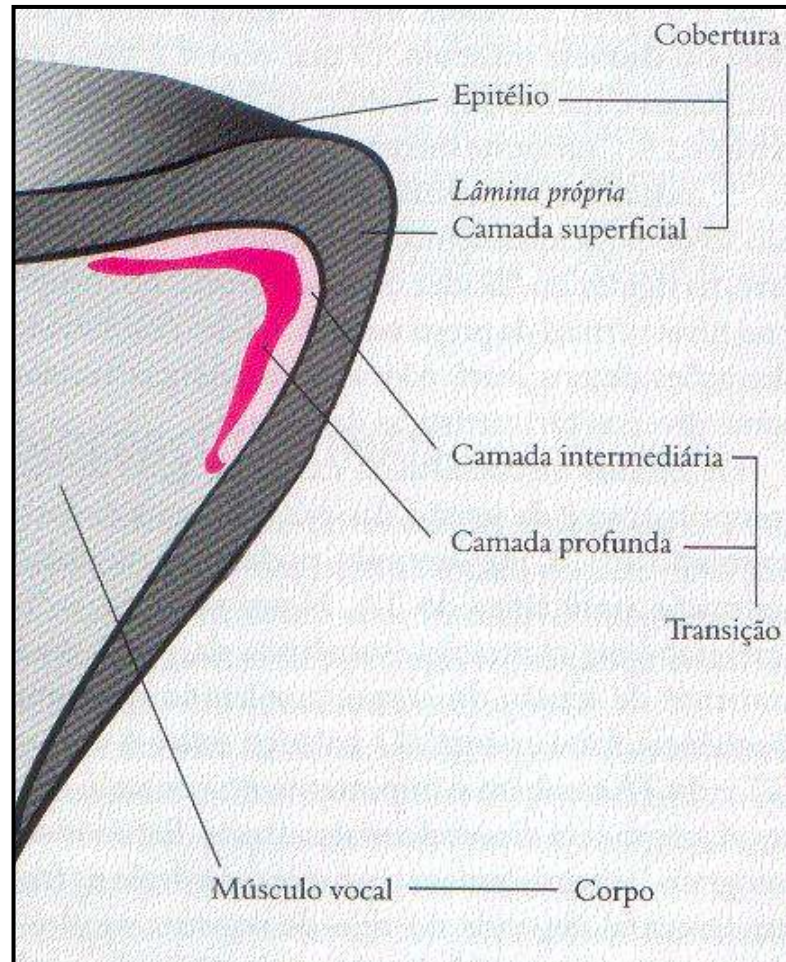
a. Epitélio

b. Camada superficial da lâmina própria

2. Transição:

- c. camada intermediária da lâmina própria
 - d. camada profunda da lâmina própria
3. Corpo vocal:
músculo vocal.

FIGURA 1– ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PREGA VOCAL



FONTE: IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003

O músculo vocal tem sua inserção anterior no ângulo da cartilagem tireóidea e posterior na apófise vocal. Possui dois feixes de fibras, um interno, que se insere no processo vocal, com fibras de atividade lenta e de ação na fonação e outro externo, que se insere no processo muscular, relacionado ao processo de adução.

A fonocirurgia ou cirurgia dos órgãos vocais tornou-se uma modalidade cirúrgica aceitável no final da década de 50, início da década de 60, quando todos os campos da cirurgia apresentavam interesse em procedimentos que produzissem melhoras funcionais. No outono de 1963, Godefrey Arnold e Hans von Leden trocando informações sobre experiências

peçoais com técnicas cirúrgicas para o aperfeiçoamento da voz decidiram que essa modalidade precisava de uma designação abrangente. Numa discussão de inúmeras alternativas possíveis, pela primeira vez foi mencionado o termo fonocirurgia e então concordaram em publicar essa designação.

Durante os primeiros cem anos da otorrinolaringologia, a cirurgia laríngea foi devotada quase que totalmente a remoção de neoplasias, e qualquer potencial de melhoramento da voz eram realmente um subproduto desse processo. Por muitos anos a fama dos laringologistas era avaliada pelo número de laringectomias que eles faziam; a preservação da voz era de menor importância. Essa fase felizmente passou e hoje em dia a manutenção e o aperfeiçoamento das funções vocais são o objeto de todos os laringologistas.

Essa mudança de atitude foi encorajada pela urbanização da nossa sociedade e pela ênfase crescente nas comunicações humanas que colocaram exigências sociais e econômicas da voz. O processo foi facilitado pelo avanço da fisiologia da laringe, que produziu melhor entendimento da função laríngea na saúde e na doença. Novas técnicas cirúrgicas tornaram-se possíveis com a chegada de antibióticos, progressos na anestesiologia, adaptação do microscópio para uso na cirurgia laríngea e outros avanços tecnológicos. Sem dúvida, a adaptação do microscópio cirúrgico para magnificação do interior laríngeo foi o elemento mais importante para a evolução da fonocirurgia como também os instrumentos microlaríngeos e o laser.

A maioria dos procedimentos para doenças da prega vocal pode ser efetuada microscopicamente, eliminando a necessidade de incisões externas e diminuindo a descontinuidade tecidual. Mesmo nas melhores mãos, uma cicatriz indesejada poderá se desenvolver resultando numa rouquidão permanente.

A microlaringoscopia de suspensão é agora a técnica padrão para a microcirurgia da laringe, no entanto o cirurgião deve escolher instrumental que diminua o dano ao tecido, ao mesmo tempo otimizando a exposição e facilitando a manipulação dos instrumentos.

Microcirurgia delicada requer instrumentos pequenos, afiados e delicados. Agora é possível obter instrumentos microlaríngeos que parecem instrumentos otológicos com longos braços. Os instrumentos devem ser longos o bastante para serem manipulados facilmente no laringoscópio, mas não tão longos que batam no microscópio (SATALOFF, 1988).

Os instrumentos de corte devem estar afiados todo o tempo. As pontas de aspiração devem ser controladas pelo polegar, de tamanhos variados, e devem incluir tanto ponta aberta como ponta fechada. Instrumentos que não reflitam a luz com capa resistente a laser são

muitas vezes vantajosos. Uma ponta de aspirador com termocautério pode ser valiosa ocasionalmente e deve estar disponível, assim como outros microinstrumentos.

A cirurgia deve se limitar estritamente à área da doença. Não há virtualmente lugar para excisão da corda vocal em doença benigna. Sempre que possível, o trauma para a margem vibratória da mucosa deve ser minimizado e preservado (SHAPSHAY, 1988).

Quando isto não for possível, as lesões devem ser removidas com o mínimo de tecido adjacente, evitando-se especialmente as camadas profundas e intermediárias da lâmina própria, e ressecando a lesão submucosamente (SATALOFF, 1988). A preservação da mucosa deve promover uma cicatrização mais rápida e proteger as camadas mais profundas da lâmina própria, diminuindo, assim, a formação de cicatriz (SATALOFF, 1988).

Lesões em bordo livre de prega vocal devem ser removidas preservando a mucosa normal e permanecer superficialmente junto à camada intermediária da lâmina própria. Isto é melhor realizado pela excisão da lesão, inteiramente, com instrumental tradicional ou laser CO₂ (SATALOFF, 1988) prefere instrumentos a frio.

A fonomicrocirurgia é um meio de preservação máxima das camadas da prega vocal formada pelo epitélio e lâmina própria. A precisão é o pilar na execução de qualquer procedimento endolaríngeo (ZEITELS, 2000).

ZEITELS, (2000) definiu os fundamentos da fonomicrocirurgia atual: (1) não utilização de retração bimanual de tecidos e incisões externas (2) dissecação subepitelial com realização de técnicas de microflaps (3) o uso de campo operatório imóvel e estável (4) magnificação de imagens (5) afastamento de tecidos supraglóticos que possam obscurecer a visualização do campo operatório. A técnica específica a ser utilizada depende do tamanho, localização e tipo da doença. No entanto os princípios discutidos acima se aplicam: boa visualização, preservação do tecido normal, evitar danos às camadas intermediárias e profundas da lâmina própria e evitar cirurgias simultâneas bilaterais na maioria dos casos (OSSOF, 1989).

Desde que o primeiro laser foi usado na cirurgia laríngea, nos anos 60, controvérsias e frustrações têm acompanhado seu uso. Em decorrência das vantagens sobre o laser de outros comprimentos de onda, o laser de dióxido carbônico tornou-se padrão para a cirurgia laríngea. A invenção de BREDERNIER, (1972) de um micromanipulador permitindo o emprego do laser de dióxido carbônico por dentro de um microscópio oficializou o início da era da cirurgia laríngea a laser. O relatório de JAKO; STRONG, (1972), foi encorajador .

Desde essa época, o laser se tornou um instrumento rotineiro para essa microcirurgia. Apesar disso, enquanto sua utilidade para alguns procedimentos laríngeos é universalmente

aceita, sua eficácia para muitos procedimentos laríngeos comuns é ainda controversa. De qualquer forma, suas vantagens devem ser pesadas contra suas potenciais desvantagens.

Lasers geram calor, conseqüentemente, eles introduzem a possibilidade de complicações relacionadas a esse agente. Apesar de essas complicações serem vistas entre pacientes dos melhores e mais experientes cirurgiões, sua incidência pode ser diminuída por um profundo entendimento dos princípios desse tipo de cirurgia.

O conceito de exposição à radiação é fundamental. Pode ser definido como a relação da densidade de força e tempo de uso do laser.

Densidade de força é a relação entre os watts de energia laser enviados e a área de tecido onde a energia é absorvida. Igualmente importante é o conceito de difusão de energia termal, isto é, a área atingida pelo calor gerado pelo laser a partir do ponto de impacto do raio. Quanto maior for a exposição do tecido, maior é a energia termal lateral espalhada, e maior o risco de dano as estruturas adjacentes (como o ligamento vocal). Conseqüentemente, o cirurgião deve selecionar pulsos isolados ou intermitentes, usando o menor tempo possível para cumprir a tarefa cirúrgica (ABITBOL, 1995).

O laser corta não apenas com o centro como também com a borda, existe um dano térmico além da borda. Por isso, o cirurgião deve centrar o raio na lesão, usando a borda para criar a margem da excisão.

O laser de dióxido de carbono tem vantagens distintas sobre instrumentos tradicionais. Ele permite melhor hemostasia, melhor visibilidade, e menor manipulação de tecidos. Para varicosidades, lesões benignas friáveis na superfície superior das pregas vocais e outras lesões selecionadas, essas vantagens são apreciáveis. No entanto, o laser tem também importantes desvantagens. Estas incluem a perda de tecido pela vaporização e conseqüências do dano térmico. A vaporização por laser retira a chance de um exame histopatológico potencialmente importante (SATALOFF, 1995).

A difusão lateral da energia térmica é uma causa comum de complicação relacionada com o uso do laser na cirurgia da prega vocal tornando cada vez mais comuns complicações, como cura mais demorada e cicatrizes após cirurgia. A confirmação dessas impressões foi relatada por Abitbol e Tapia em estudos separados realizados em 1984. As observações histológicas de (DURKIN et al., 1986) apoiaram a observação de que a cirurgia a laser poderia atrasar a cura aumentar a formação de cicatrizes. Atualmente, está claro que a desvantagem mais significativa da cirurgia laríngea com o laser de dióxido de carbono é o dano térmico as camadas intermediárias e profundas da lâmina própria que contém

significativo número de fibroblastos, ou ao músculo vocal. Esses danos podem resultar em cicatriz.

A excisão por laser normalmente acrescenta um pouco mais do que o risco indesejável expansão térmica para camadas mais profundas, apesar de as técnicas usando um laser dióxido de carbono com microponto (*microspot*) diminuírem a incidência dessas complicações (SHAPSHAY, 1988). No entanto, mais pesquisas são necessárias para confirmar ou refutar essa afirmação.

Segundo (SATALOFF, 1995) o laser não oferece qualquer vantagem significativa sobre os instrumentos tradicionais para a remoção de lesões benignas, seu uso em tais casos é uma questão de preferência do cirurgião.

O laser pode eventualmente substituir a necessidade de um retalho ou molde, especialmente em lesões maiores (OSSOF, 1980). Desvantagens potenciais, relacionadas ao laser, incluem o risco de combustão do tubo endotraqueal podendo acarretar estenose glótica posterior (SATALOFF, 1995).

O mesmo é verdade sobre carcinoma, apesar de o valor da cirurgia a laser em lesões malignas permanecer incerto (HARAF, 1988). Quando o laser é usado para o câncer laríngeo, o cirurgião deve obter amostras histológicas adequadas não apenas do tumor, mas também das margens. O impacto do laser usado sobre qualidade vocal em pacientes com câncer laríngeo permanece igualmente incerto.

O fonocirurgião pode optar pelo uso de laser CO₂ ou excisão instrumental a frio. Ambas possuem vantagens e desvantagens. As maiores desvantagens da técnica utilizando laser CO₂ são: o dano termal que ocorre ao redor do tecido subjacente e o efeito resultante na cicatrização da ferida cirúrgica. Portanto, um laser que ofereça a vantagem de menor dano termal pela diminuição do tamanho do spot de irradiação, variações no pulso de energia e irradiação controlada por computador, seria o ideal para os procedimentos microcirúrgicos endolaríngeos (GARRET et al., 2002).

Estes fatos têm levado muitos fonocirurgiões a optarem pelo uso de técnicas cirúrgicas a frio pelo melhor resultado fonatório. A desvantagem do procedimento fonomicrocirúrgico a frio está no comprimento do instrumental necessário para alcançar a prega vocal pelo laringoscópio, levando a diminuição de precisão de movimentos (GARRET et al., 2001).

Em resumo, a microcirurgia laríngea a laser é uma arma valiosa acrescida ao arsenal do laringologista. Embora apresente inúmeras vantagens, seu perigo potencial deve ser levado em consideração para evitarmos um uso indiscriminado.

2.2 PROCESSO CICATRICIAL

Toda ferida é uma solução de continuidade produzida em um tecido, pelos mais diversos agentes, que dá lugar a um espaço anormal, à interrupção do fluxo sangüíneo, à perturbação da sensibilidade, ao acúmulo de elementos celulares mortos e a um grau, maior ou menor, de contaminação, com ou sem infecção. Para corrigir esta ferida, com a finalidade de restaurar a semelhança ao tecido usual, o organismo lança mão de um complicado mecanismo, denominado reparação tecidual (BIONDO-SIMÕES, 1998).

Reparação tecidual é um termo genérico, que indica a substituição do tecido lesado por um novo tecido, podendo ocorrer por regeneração ou cicatrização, geralmente por combinação de ambos. Na regeneração há substituição por tecido do mesmo tipo, podendo não deixar nenhum traço residual de lesão, enquanto na cicatrização há substituição por tecido conjuntivo fibroso (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fim de facilitar o estudo e tornar o processo cicatricial didático, este foi dividido em três fases, inter-relacionados e sobrepostos: fase inflamatória ou exsudativa, fase proliferativa ou fibroblástica e fase de maturação ou remodelagem (WITTE; BARBUL, 1997; HUPP, 2000; PICCINATO; NETTO; CHERRI, 2003).

2.2.1 Fase Inflamatória ou Exsudativa

Essencial na cicatrização, esta fase abrange desde o momento da lesão até o quarto ou quinto dia de evolução, caracterizando-se pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células oriundas da circulação para o local da injúria e pela liberação local de citocinas, que são fatores de crescimento, além da liberação de mediadores químicos.

Assim que ocorre a injúria, entra em ação o sistema de coagulação, caracterizando a hemostasia. Para MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM (2003), a coagulação sanguínea inicial seria uma fase a parte, simultânea à fase inflamatória, dependente da atividade plaquetária e da cascata da coagulação, assim como da vasoconstrição conseqüente à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A inflamação aguda, por sua vez, depende de inúmeros mediadores químicos e das células inflamatórias.

Os mediadores químicos são divididos em duas classes: os que controlam a permeabilidade vascular e os que atraem as células (quimiotaxia). O aumento da permeabilidade microvascular pela vasodilatação provocada por aminas vasoativas e peptídeos (histamina dos mastócitos, serotonina das plaquetas e bradicinina dos neutrófilos) acarreta o surgimento de pequenas fenestrações entre as células endoteliais, o que permite o extravasamento de plasma e migração de leucócitos para dentro do tecido intersticial. A fibrina proveniente do transudato plasmático provoca obstrução linfática, ocorrendo acúmulo de plasma, fundamental na tentativa de diluir contaminantes. Essa coleção fluida é denominada edema. A fase celular da inflamação é desencadeada pela ativação do sistema complemento sérico, particularmente C3a e C5, os quais atuam como quimiotáticos e causam aderência de leucócitos polimorfonucleares(HUPP, 2000).

A ruptura dos vasos expõe o colágeno às plaquetas, ocasionando a agregação das mesmas e a ativação da parte intrínseca da cascata da coagulação. O contato entre o colágeno e as plaquetas, na presença da trombina, fibronectina e seus fragmentos, resulta na liberação de várias citocinas e fatores de crescimento, tais como: Fator Alfa de Necrose Tumoral ou α - TNF, Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas ou *PDGF* e Fator de Crescimento dos Fibroblastos ou *FGF*. Esses mediadores químicos levam ao aumento da permeabilidade vascular, liberação de prostaglandinas e ao estímulo a migração de neutrófilos e fibroblastos

para o sítio da injúria. A formação do coágulo coapta as bordas das feridas e oferece uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos podem ingressar (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A primeira onda celular que migra para o local da ferida é composta por neutrófilos, que atuam na fagocitose de possíveis microrganismos presentes na ferida, assim como na lise do tecido desvitalizado, mediante a liberação de proteases. Na continuidade do processo, os linfócitos são as próximas células a serem atraídas para o local da lesão, liberando mediadores químicos denominados linfocinas, que têm seu papel na quimiotaxia dos fibroblastos (WAHL; MC CARTHY; 1978; ORGILL; DEMLING, 1988). De acordo com estudos de FOLKMAN, (1982), os linfócitos também liberam fator que estimula a angiogênese nos tecidos em cicatrização.

Na seqüência, ocorre a atração e ativação de macrófagos, pela ação de mediadores tais como os produtos de degradação da fibrina, fatores plaquetários e linfocinas, cujas células podem ser oriundas do próprio tecido lesado ou da diferenciação de monócitos circulantes, e são consideradas as mais importantes da cascata inflamatória que inicia todo o processo de cicatrização. Tornam-se as células predominantes no tecido lesado durante os primeiros dias, exceto na presença de tecido necrótico e/ou bactérias, quando prolonga-se a presença dos neutrófilos. Outra fonte de fatores de crescimento são os macrófagos, os quais produzem fatores que estimulam a angiogênese, fibroplasia e a produção do colágeno (CLARK et al., 1976; DIEGELMAN; COHEN; KAPLAN, 1981; ECKERSLEY; DUDLEY, 1988).

2.2.2 Fase Proliferativa ou Fibroblástica

É a responsável pelo “fechamento” da lesão ao redor do quarto dia persistindo até o 14º dia. É caracterizada por três processos: angiogênese, proliferação fibroblástica e

reepitelização (HERTIG, 1935; ORGILL; DEMLING, 1988).

2.2.2.1 Angiogênese

Uma vez que a área lesada torna-se isquêmica, o fluxo sanguíneo, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes, deve ser restaurado mediante a angiogênese, possibilitando assim o início do processo de cicatrização. Por volta do quarto dia após a lesão, macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos iniciam processo de migração em direção ao tecido lesado, dando início à formação de tecido de granulação. Os macrófagos produzem as citocinas, necessárias à fibroplasia e angiogênese. Os fibroblastos constroem a matriz extracelular, necessária para fornecer suporte à multiplicação celular, e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários à sustentação do metabolismo celular (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

A hipóxia tecidual após a lesão é um estímulo bem conhecido para a neoformação vascular. Os macrófagos, quando na presença de baixa tensão de oxigênio e expostos ao aumento do ácido láctico, produzem substância conhecida como fator de angiogênese, o qual apresenta poder de atração química para células mesoteliais e do endotélio vascular. Outras citocinas angiogênicas são liberadas: *PDGF* liberado pelas plaquetas, Fator de Crescimento dos Fibroblastos Alfa e Beta (FGF α e β), Fator Transformador de Crescimento Alfa e Beta (TGF α e β) e Fator de Crescimento Endotelial (VEGF). Também são liberadas as interleucinas um a seis, que apresentam propriedades similares e são produzidas por diversos tipos celulares. (KNIGHTON et al., 1982; KNIGHTON et al., 1983; LINGEN, 2001).

Há dois mecanismos para a formação de novos vasos sanguíneos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação de vasos pela agregação de células endoteliais, e apresenta importância durante o processo inflamatório. A angiogênese, por sua vez, pode ser

definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de microvasos já existentes (BATEGAY, 1995).

A angiogênese é essencial no processo de cicatrização, visto que o suprimento sanguíneo abundante é necessário para suprir a grande demanda metabólica local necessária para o desbridamento e fibroplasia do tecido lesado. A célula endotelial tem papel na organização e regulação da cicatrização, e constitui-se atualmente em alvo primário para a manipulação terapêutica no processo de reparo.

O processo de neoformação vascular tem início nos primeiros dias após a lesão, originando-se predominantemente nas vênulas, enquanto uma fina camada de superfície necrótica está presente. As células endoteliais são estimuladas pelos fatores angiogênicos, e secretam proteases que degradam a membrana basal em torno do vaso, criando-se espaços entre as mesmas. São abertos espaços para projeções celulares que migram em direção ao tecido desvitalizado, proliferando e formando novos capilares nas margens da ferida, que se unem produzindo novo leito vascular. Se as margens da ferida estão aproximadas, os capilares podem atravessá-la, formando verdadeiras pontes (ARNOLD; WEST, 1991).

As hemácias e o plasma começam então a fluir através dos novos microvasos, levando a união das redes capilares com redes vasculares mais profundas. A combinação de uma densa camada de neovasos com fibroblastos recebe o nome de tecido de granulação. Uma vez que exista a aproximação das bordas da lesão, ocorre a remodelação capilar, devido à regressão da demanda metabólica na área lesada e à secreção de fatores inibidores da angiogênese, o que leva à formação de cicatrizes maduras e relativamente avasculares (ORGILL; DEMLING, 1988; ARNOLD; WEST, 1991).

2.2.2.2 Proliferação fibroblástica

Essa subfase inclui a fibroplasia e a formação de matriz extracelular, extremamente importante na formação do tecido de granulação. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e os principais produtores de fibras colágenas e materiais intercelulares amorfos, são responsáveis pela síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Fatores de crescimento derivados principalmente de plaquetas, macrófagos e linfócitos, especialmente o PDGF e o FGF, estimulam os fibroblastos do tecido circundante a lesão a proliferar e migrar para a área lesada (DIEGLMANN; COHEN; KAPLAN; 1981; NEILSON; PHILIPS; JIMENEZ, 1982).

A cicatrização da ferida depende de dois outros fenômenos: a epitelização, definida como a replicação e a mobilização das células epiteliais, a formação e a contração do tecido de granulação. Este último é essencial para manter a continuidade tecidual, pois reduz o tamanho da lesão e estimula a formação da cicatriz definitiva, e sua ação é completada pela epitelização (CARREL; HARTMANN; 1916; GABBIANI, 1971).

O fenômeno da contração cicatricial é caracterizado pelo movimento centrípeto de aproximação das bordas da ferida e envolve complexa interação entre células, matriz celular e citocinas. A partir do início da segunda semana da cicatrização, fibroblastos assumem o fenótipo de miofibroblastos, caracterizados pela presença de espessos feixes de actina-miosina, contêm microfilamentos dispostos ao longo de sua membrana citoplasmática e apresentam sítios de ligação intercelular e célula matriz (GRINNEL; 1994; CLARK, 1976).

Foi descrita a presença, no tecido cicatricial, de fibroblastos modificados, contendo sistema fibrilar citoplasmático lembrando células musculares, o que implicaria no seu importante papel na contração cicatricial (GABBIANI; RYAN; MAJNO, 1971). MAJNO et

al. (1972), descreveram a presença de fibroblastos com características intermediárias entre fibroblastos típicos e células musculares lisas no tecido de granulação, demonstrando que o tecido de granulação é órgão contrátil e que o mesmo requer oxigênio para exercer suas funções, e sugeriram, pela primeira vez, o nome de miofibroblastos.

Os miofibroblastos foram definidos como células altamente diferenciadas que apresentam organelas especializadas e apresentam características comuns a fibras musculares e fibroblastos. Estruturalmente apresentam três elementos morfológicos essenciais: 1) feixes de actina paralelos ao maior eixo da célula; 2) sítios de ligação célula-estroma e 3) espaços para ligação intracelular. Essas células têm sua ativação intermediada por citocinas PDGF e FGF, assim como por interleucina dois (SCHURCH; SEEMAYER; GABBIANI, 1998).

SERINI e GABBIANI (1999) descreveram que os miofibroblastos são interconectados entre si por junções especiais e com a matriz extracelular pelo chamado fibronexus, uma complexa membrana que envolve microfilamentos intracelulares em continuidade com fibronectina extracelular. HINZ et al., (2001), LORENA et al., (2002) e TOMASEK et al., (2002) relataram também que estas células são importantes produtoras de colágeno dos tipos I e III, informando existir direta correlação entre o nível do principal marcador destas células, a actina- α -sm e o grau de contração dos miofibroblastos. No processo de cicatrização normal, o tecido de granulação começa a desaparecer quando a reepitelização encontra-se em fase final, ocorrendo, então, maciça apoptose dos miofibroblastos e componentes vasculares, levando à formação de cicatriz com baixa celularidade.

2.2.2.3 Reepitelização

Esta fase envolve a replicação e o movimento de células epiteliais, com o objetivo de reconstituir a continuidade tecidual. Para tanto, novas células são formadas, estimuladas por citocinas, liberadas entre outras células pelos miofibroblastos, oriundas da camada basal, e

migram verticalmente para a região da ferida, formando inicialmente uma camada celular simples (ORGILL; DEMLING, 1988; POWELL et al., 1999).

2.2.3 Fase de Maturação ou Remodelação

Essa fase inicia-se em torno da segunda semana após a lesão, e apresenta como característica marcante a deposição do colágeno no sítio da lesão. Clinicamente, é a fase mais importante, pois a quantidade e a qualidade do colágeno determinarão a força mecânica do tecido remodelado (DIEGELMANN; ROTHKOPF; COHEN, 1975; WITTE; BARRULL, 1997).

As moléculas de colágeno consistem de três cadeias de polipeptídeos (cadeias- α) idênticas ou similares, as quais formam uma tripla hélice. As hélices são secretadas no espaço extracelular como procolágeno. Após deixar a célula, os propeptídeos são removidos e se agrupam às moléculas de colágeno em fibrilas ou a outras estruturas que ocupam seu lugar. Na produção do colágeno ocorre a hidroxilização dos aminoácidos prolina ou lisina, o que confere estabilidade à molécula (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI; 2000; ROCHA; 2004; TRUBIAN, 2004; HAYASHI; MIZUNO, 2006; PEREIRA, 2006).

O colágeno pode ser classificado de acordo com a estrutura da hélice dominante e com o seu tamanho molecular em cerca de três tipos, subdivididos em cerca de vinte e sete subtipos de cadeias distintas. (ROCHA; 2004; TRUBIAN; 2004; HAYASHI; MIZUNO, 2006).

TABELA 1– TIPOS E SUBTIPOS DO COLÁGENO

Colágeno	Tipos
Fibrilar	I, II, III, XI e XXIV
Não-fibrilar grande	IV, VI, VII e XII
Cadeia curta	VIII, X e XIII

FONTE: ROCHA; TRUBIAN, 2004

Os colágenos tipo I e III são os mais importantes colágenos fibrilares produzidos pelo tecido de granulação durante a cicatrização de feridas, e sua taxa varia em diferentes tecidos e durante as fases da formação do tecido de granulação (ROCHA; 2004; TRUBIAN; 2004; PEREIRA, 2006). Os fibroblastos são as principais células produtoras do colágeno tipo I, o qual é o mais comum e perfaz aproximadamente 90% desta proteína no corpo dos mamíferos. Também produzem o colágeno tipo III, que frequentemente encontra-se associado ao primeiro. A proteína colágena representa 30% do total de proteínas presentes no organismo humano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O colágeno tipo III deposita-se inicialmente no tecido de cicatrização, e caracteriza-se por ser proteína imatura. Mais tardiamente, com a remodelação, surge o tipo I, de características maduras. Nesta fase final da cicatrização ocorre a maturação do tecido de reparação, que progride gradualmente de estado altamente celular e vascularizado até a formação da cicatriz, com poucas células e vasos sanguíneos e com o resultado final de um tecido resistente e com fibras colágenas com alto grau de orientação (CRONIN; JACKSON; DUNPHY; 1968; GAFFNEY et al., 2002). O colágeno derivado do tecido de granulação difere do colágeno do tecido intacto, pois apresenta maior hidroxilação e glicosilação, o que confere àquele diâmetro maior, assim como a organização paralela ao tecido vizinho das fibras colágenas não corresponde à organização dos tecidos intactos, que demonstram padrão de “cesto trançado” (FORREST, 1983).

Ainda, a deposição do colágeno do tipo III na ferida inicia-se precocemente, atinge seu

pico em torno do 3º. dia e reduz-se progressivamente até o 7º dia. A presença de colágeno do tipo I aumenta progressivamente após o 2º dia por pelo menos quatro a cinco semanas (EHRlich; KRUMMEL, 1996).

Para que ocorra boa cicatrização é necessário que exista equilíbrio entre a formação e degradação do colágeno. Sua destruição é mediada pela enzima colagenase, que por sua vez é regulada por citocinas (WITTE; BARBUL, 1997).

2.3 IMUNOISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

A imunistoquímica é a aplicação de métodos e técnicas imunológicas ao estudo de células e tecidos, baseada no princípio das ligações antígeno-anticorpo. O método consiste da utilização de anticorpos específicos previamente conhecidos e manipulados quimicamente para que, ao se ligarem aos seus antígenos tissulares ou celulares correspondentes, devido a diversas reações e utilização de cromógenos, produzam alteração de cor visível ao microscópio óptico, indicando a localização do antígeno em estudo.

Em pesquisa sobre a cicatrização de colágeno maduro e imaturo foi utilizado como técnica imunistoquímica o anticorpo. Para identificação de colágenos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), analisaram-se os cortes histológicos os quais foram incubados com o anticorpo primário (anticorpos policlonais feitos em coelhos anti-colágeno de suíno tipo I e anticorpo policlonais feitos em coelho anti-colágeno bovino tipo III (Novotec, EUA), Adicionou-se aos cortes o anticorpo secundário (Envision®, Dako, Dinamarca).

Ultra-estruturalmente pode-se identificar a trama fibrilar imuno reativa para o colágeno tipo I e tipo III, corado homogeneamente em tonalidade marrom, demonstrando desta maneira que a imunistoquímica para o colágeno evidencia-se como um método específico para análise das moléculas colágenas inteiras.

2.3.1 Imunoistoquímica para Miofibroblastos e Vasos Sangüíneos

A imunoistoquímica consiste na utilização de anticorpos específicos conhecidos e manipulados quimicamente para que; ao se ligarem aos seus antígenos celulares ou teciduais correspondentes, devido a diversas reações e utilização de cromógenos, produzam alteração de coloração visível à microscopia óptica, a qual indica o antígeno específico e o quantifica.

Para o estudo imunoistoquímico, os cortes foram processados e na seqüência, aplicaram-se os anticorpos primários antifator VIII na diluição de 1:200 (Policlonal, Código 0082, DakoCytomation – Capintaria, Califórnia, EUA), em lâminas separadas, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotinilado quando então foi aplicado o complexo estreptavidina-peroxidase.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada.

As lâminas foram analisadas, continham apenas um código, sem a identificação dos grupos dos animais.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Este estudo foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná, sediada no município de Piraquara.

Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000), obedecidos aos princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA, (1991).

Os 30 suínos foram divididos em grupos separados aleatoriamente: os animais do grupo Experimento composto por 24 animais foram subdivididos em 2 grupos: Grupo EI (GEI), composto por 12 animais, foram submetidos à exérese de mucosa do bordo livre do terço anterior de prega vocal direita realizado com tesoura curva (a frio) o Grupo EII (GEII) composto por 12 animais foram submetidos à exérese de mucosa do bordo livre do terço anterior de prega vocal esquerda com laser CO₂. Os suínos do grupo C (GC), composto por 6 animais que não foram submetidos à exérese de fragmento de mucosa.

TABELA 2 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

GRUPOS	MÉTODO CIRURGICO	PREGA VOCAL & PROCEDIMENTO
GRUPO E (n = 24)	Grupo E I Instrumental a frio (n=12)	Prega vocal direita. Realizado exérese de fragmento de bordo livre de terço anterior com tesoura curva
	Grupo E II Laser CO ₂ (n=12)	Prega vocal esquerda. Realizado exérese de fragmento de bordo livre de terço anterior com laser CO ₂
GRUPO C (n =6)	Não realizada cirurgia	Pregas vocais não submetidas a procedimento cirúrgico

3.2 AMOSTRA

Trinta suínos da raça *Larger White* (12 machos e 18 fêmeas) oriundos da fazenda da UFPR foram utilizados neste experimento (FIGURA 2).

Os animais pesaram entre 8700 g e 11562 g com média de 10.131 g e a idade variaram de 27 a 31 dias.

Todos os animais foram avaliados clinicamente, por médicos veterinários, foram considerados sadios e apresentavam-se dentro de uma distribuição normal de peso para a idade, seguindo-se os padrões da EMBRAPA.

Os animais foram numerados conforme o padrão adotado na Fazenda Experimental, utilizando marcas nas orelhas, e alojados em grupo de 6 animais por pocilga.

FIGURA 2 – SUÍNOS *LARGER WHITE* UTILIZADOS NO EXPERIMENTO



3.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas pocilgas de 1,2 x 1,8 metro, com piso ripado para coleta de dejetos e dotada de comedouro manual com ração padrão. O bebedouro estava situado no mesmo lado do comedouro e fornecia água “*ad libitum*”.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Pré-operatório: todos os animais foram submetidos a jejum por 12 horas e o suprimento de água foi retirada 6 horas antes do procedimento cirúrgico.

Per-operatório:

Todos os animais foram anestesiados pelo mesmo veterinário especializado em animal de médio e grande porte.

Todos os animais receberam antes da indução anestésica Midazolam (Dormonid[®] 1mg/ml) na dose de 0,1 mg/Kg por via IM, Acepromazina 1% (Acepran[®] 1%) na dose de 0,1 mg/Kg por via IM., Ketamina (Ketalar[®] 50 mg/ml) na dose de 10 mg/Kg por via IM e Atropina 0,5 mg/ml na dose de 0,06 mg/kg por via IM.

Após a realização da medicação pré-anestésica foi obtido acesso venoso utilizando as veias superficiais da orelha, do abdome ou dos membros através de agulha 22G. A indução anestésica foi feita com Propofol, na dose de 6 mg/kg por via IV, e a anestesia de manutenção com a mesma droga na dose de 0,4 mg/kg por via IV. Os animais foram monitorizados por ECG através de cardioscópio (Funbep[®]). Havia oxigênio disponível em recipiente portátil no caso de eventual depressão respiratória ou apnéia.

3.5 ATO CIRÚRGICO

Seguem-se as descrições das etapas cirúrgicas.

3.5.1 Posicionamento

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em mesa especial para castração, coberta com campo cirúrgico estéril. A cabeceira da mesa foi elevada e na região dorsal superior foi colocado coxim para aumentar a angulação e facilitar a retificação da laringe (figura 3).

FIGURA 3 – POSIÇÃO CIRÚRGICA



3.5.2 Introdução do laringoscópio

Foi utilizado laringoscópio infantil da marca Storz[®], (Storz, Tuttlingen, Alemanha) com angulação para comissura anterior (figura 4).

FIGURA 4- INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO



NOTA: Posição do laringoscópio de suspensão com apoio sobre o tórax

3.5.3 Microscopia das pregas vocais

As pregas vocais suínas foram visibilizadas através de microscópio óptico D. F. Vasconcelos[®], (dfv, São Paulo, SP) binocular reta com lente de 400mm, com sistema de câmera acoplada Storz[®], (Storz, Tuttlingen, Alemanha). Todos os procedimentos cirúrgicos foram gravados em fita VHS (Aparelho de TV vídeo AG-513 A Panasonic[®], (Panasonic, Secaucus, NJ, USA) (FIGURA 5)

FIGURA 5– MICROSCÓPIO CIRÚRGICO



NOTA: OBSERVA-SE A POSIÇÃO DO CIRURGIÃO VISIBILIZANDO AS PREGAS VOCAIS COM MICROSCÓPIO CIRÚRGICO ACOPLADO AO LASER CO₂

3.5.4 Preensão e exérese de fragmento de mucosa do bordo livre da prega vocal direita realizada com micro tesoura laríngea.

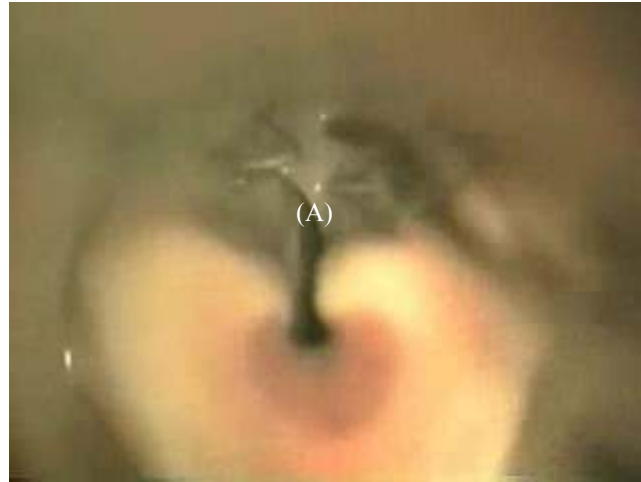
O procedimento iniciou-se na preensão do bordo livre de terço anterior de prega vocal direita com pinça de Bouchayer Microfrance[®] (Microfrance, Paris, França), procedendo-se à exérese de fragmento do bordo livre com tesoura curva para esquerda de aproximadamente 1mm.

FIGURA 6– PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE MUCOSA DA PREGA VOCAL DIREITA



NOTA: Prega vocal direita (a)

FIGURA 7 – EXÉRESE DA MUCOSA DO BORDO LIVRE DA PREGA VOCAL DIREITA

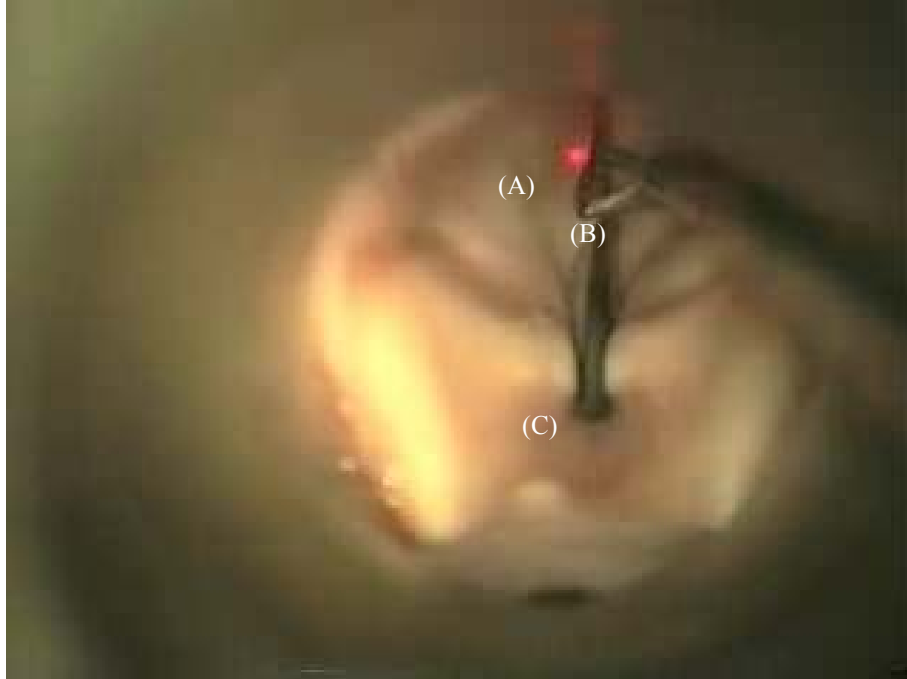


NOTA: Exérese de fragmento em 1/3 anterior de prega vocal direita(A)

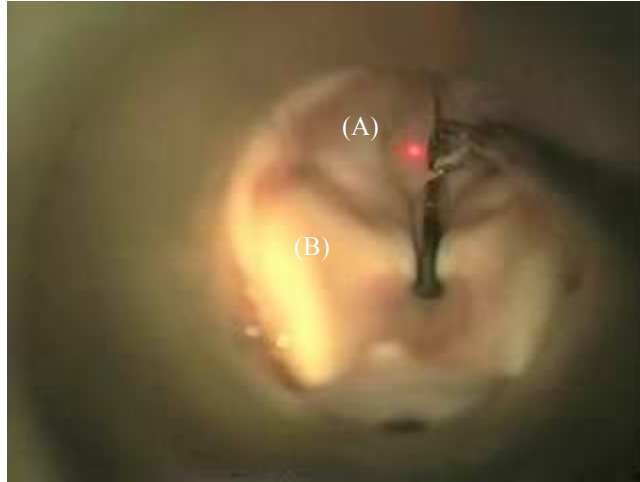
3.5.5 Preensão e exérese de fragmento de mucosa do bordo livre da prega vocal esquerda realizada com laser CO₂

O procedimento iniciou-se na preensão do bordo livre de terço anterior de prega vocal esquerda com pinça de Bouchayer Microfrance[®] (Microfrance, Paris, França). Procedeu-se ao uso de laser CO₂ Sharplan[®] (Sharplan, Tel Aviv, Israel), com 2W de potência, de forma contínua, no modo focado, em superpulso com *microspot* de 250 micra, procedendo-se à exérese de fragmento do bordo livre de aproximadamente 1 mm (figuras 8 9 10).

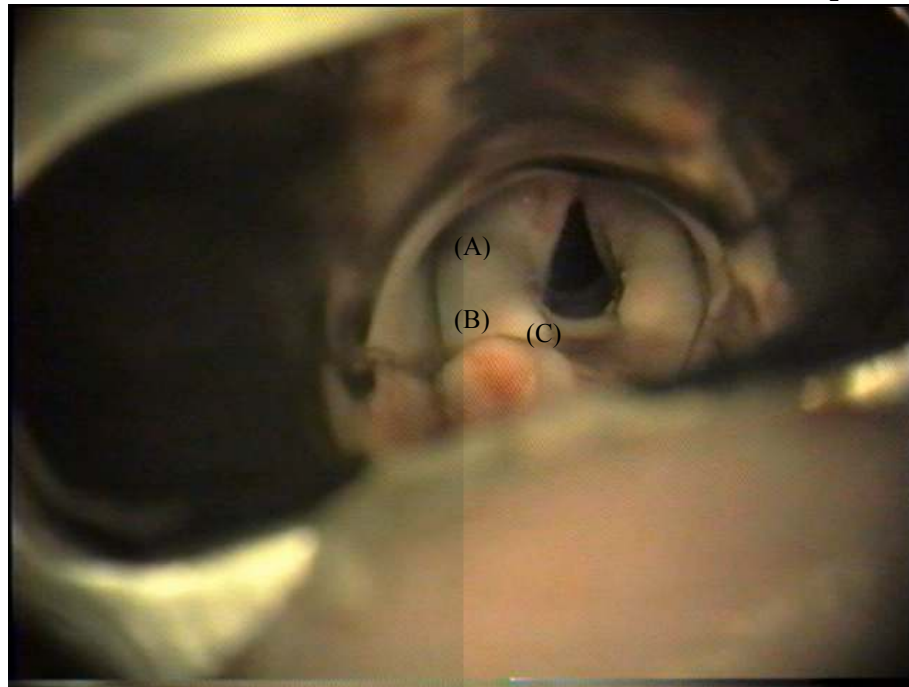
FIGURA 8 – PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE PREGA VOCAL ESQUERDA



NOTA: Prega vocal esquerda (a) Prega vocal direita (b) Comissura posterior (c)

FIGURA 9 - INÍCIO DA EXÉRESE A LASER CO₂

NOTA: Laser CO₂, 2 watts de potência, no modo focado, em superpulso, com *microspot* de 250 micra. Exérese de fragmento em 1/3 anterior de prega vocal esquerda (A), Aritnóide esquerda (B).

FIGURA 10 – ASPECTO PÓS EXÉRESE A LASER CO₂

NOTA: Area da exérese em nível de 1/3 anterior de prega vocal esquerda (A) aritnóide esquerda (B) comissura posterior (C).

3.6. PÓS-OPERATÓRIO

Após a recuperação anestésica, os suínos foram recolocados em suas pocilgas, onde voltaram a receber água, sendo liberada ração com 12 horas de pós-operatório. O fornecimento da dieta foi feito duas vezes ao dia, a partir de 24 horas de pós-operatório.

3.7. DADOS AVALIADOS

3.7.1 EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO

A evolução pós operatória ocorreu sem intercorrências e não houve óbito durante o estudo.

3.8. SACRIFÍCIO E COLETA DA LARINGE

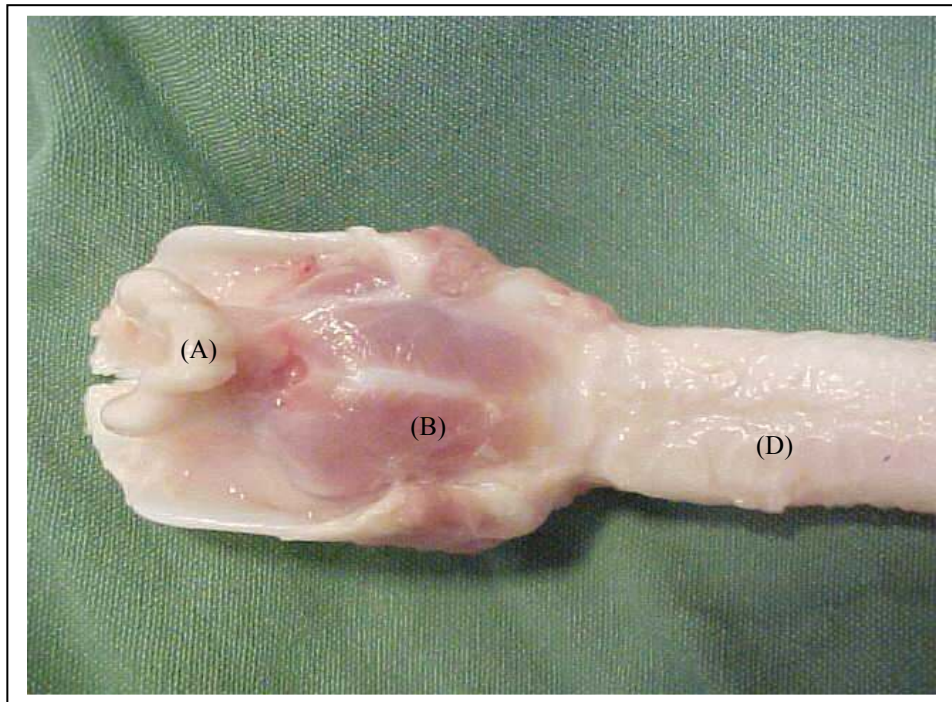
Trinta dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos pré-anestésico e anestésico (item 3.4), seguido de eletrocussão. Após a verificação da morte do animal, pela supressão cardio-respiratória e reflexo midriático, foram

avaliadas macroscopicamente as pregas vocais de todos os espécimes e procedidas as coletas das amostras das pregas vocais e, imediatamente, após acondicionadas em formol (10%) e enviadas para processamento histológico.

3.9 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

A laringe do animal foi retirada em bloco, da base da língua ao quarto anel traqueal (figura 11). Foi realizada uma incisão longitudinal anterior na laringe retirada (figura 12), exposta a região das pregas vocais (figura 13 e 14) e outra incisão da cartilagem tireóide (figura 15) para a retirada de toda a musculatura da prega vocal, com preservação da cobertura mucosa. A peça foi fixada sobre um retângulo de papel cartão com alfinetes, a fim de mantê-la estirada. No papel cartão de fixação foi registrada a identificação do animal, bem como indicada a região anterior da prega vocal (área operada). Neste momento a prega vocal foi numerada para análise microscópica sem que o patologista conhecesse o grupo a que pertencia o suíno. Posteriormente este retalho foi fixado em formol a 10% durante 24 h.

FIGURA 11 – LARINGE SUÍNA RETIRADA EM BLOCO, DA BASE DA LÍNGUA AO QUARTO ANEL TRAQUEAL



NOTA: Epligote (A) Cartilagem tireoidiana (B) Membrana Crico-tireoidiana (C) Traqueia (D)

FIGURA 12– INCISÃO LONGITUDINAL ANTERIOR

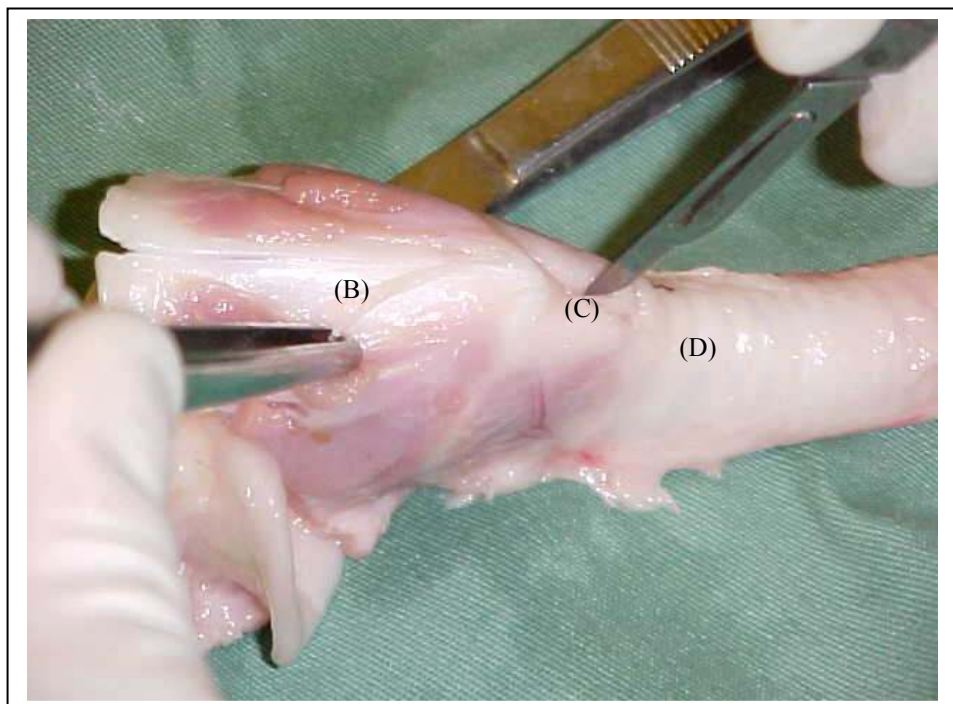
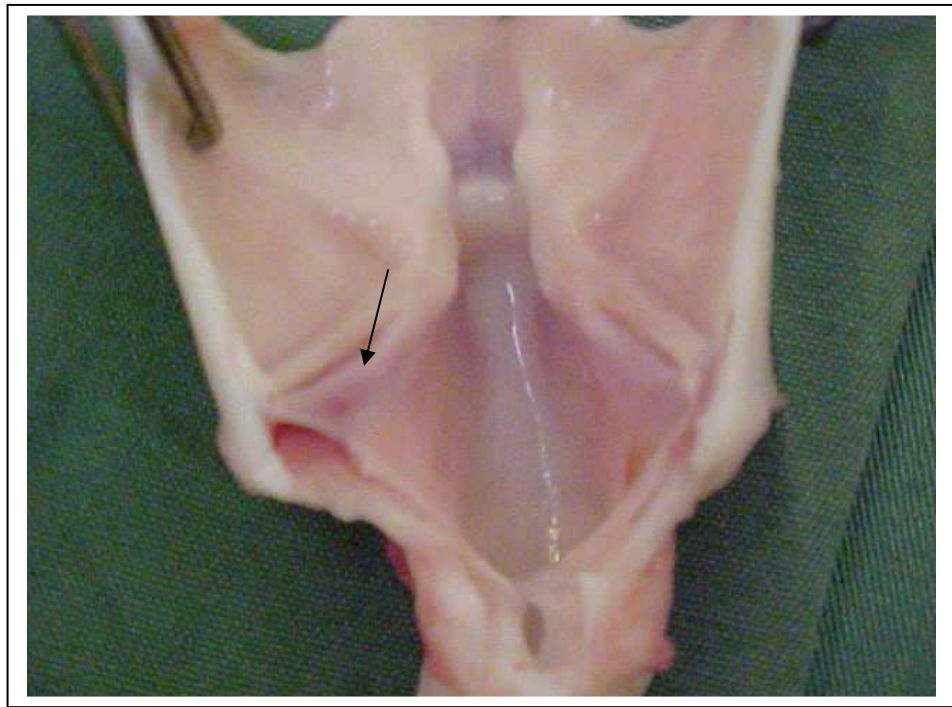


FIGURA 13– OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE



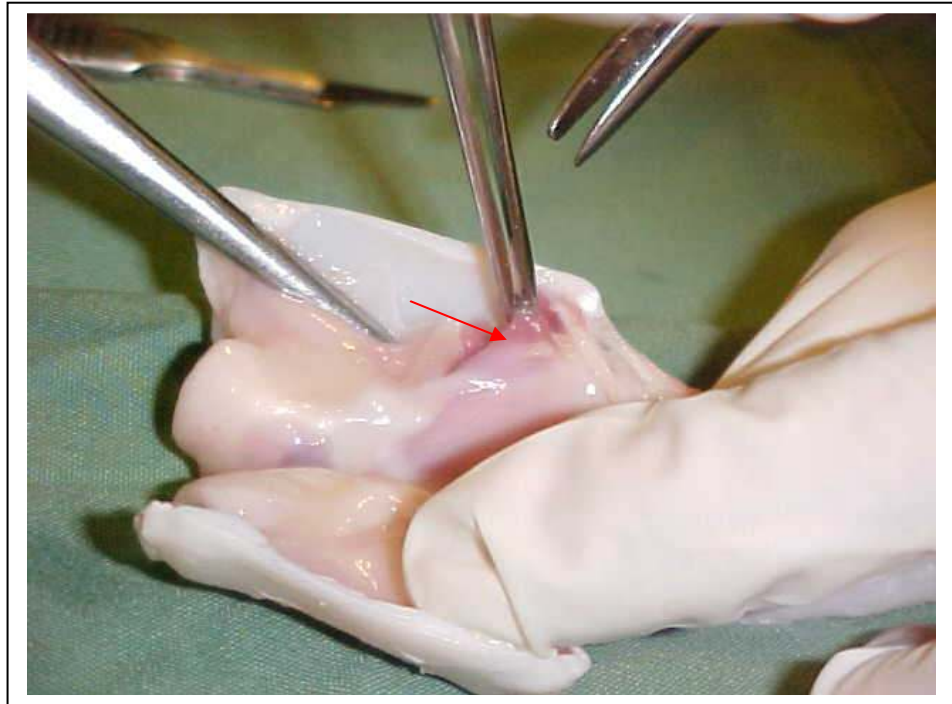
NOTA: A SETA APONTA PARA A ÁREA SUBMETIDA A EXÉRESE DO FRAGMENTO DE MUCOSA. EM 1/3 ANTERIOR DE PREGA VOCAL ESQUERDA COM LASER CO₂.

FIGURA 14– OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE



NOTA: A SETA APONTA PARA A ÁREA SUBMETIDA A EXÉRESE DO FRAGMENTO DE MUCOSA. EM 1/3 ANTERIOR DE PREGA VOCAL DIREITA COM INSTRUMENTAL A FRIO.

FIGURA 15 INCISÃO DA CARTILAGEM TIREÓIDE



NOTA: A seta aponta para a área submetida a exérese de fragmento de mucosa.

3.10 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Finalizado o período de fixação de 24 horas e utilizando-se lâmina histológica sobre tábua de macroscopia, foram retiradas duas amostras retangulares. Todas as amostras foram acondicionadas em cápsula histológica e colocadas no autotécnico Leica[®] modelo RM 2145, (Leica, Hanover, Alemanha), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em concentrações diferentes e crescentes de álcool etílico a 70%, 80% e 90%. Posteriormente foram diafanizadas em xilol contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante 12 h. Em seguida, incluídas em parafina quente no auto inclusor Leica[®] modelo EG 1160, (Leica, Hanover, Alemanha). Os blocos de parafina foram em cortes de 4 μ m e dispostos em lâmina de vidro de 76x26mm, tendo sido executados dois níveis de corte para cada área de estudo no bloco de parafina.

3.11 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜINEOS.

3.11.1 Análise Qualitativa do Colágeno pela técnica de imunistoquímica.

Para a análise qualitativa do colágeno foi obtido fragmento da área de cicatrização. Estas amostras foram conservadas em frascos separados em formol a 10%. Os fragmentos foram acondicionados em papel poroso de maneira que a superfície mucosa estivesse voltada para cima, mantendo, assim, a peça esticada.

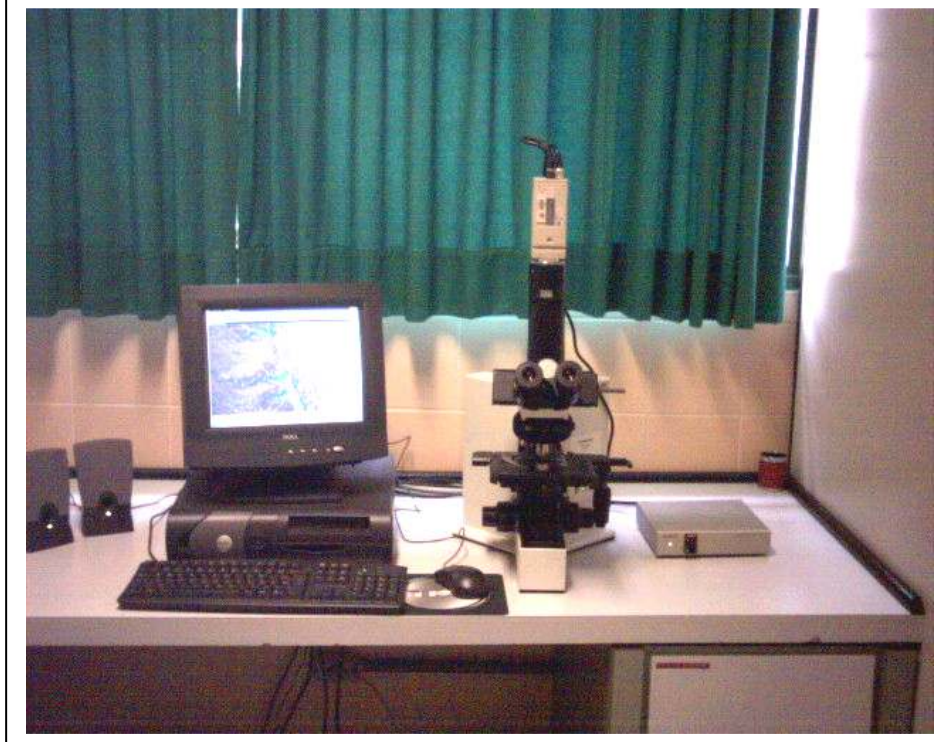
No Laboratório de Anatomia Patológica da UNICEMP foram efetuadas secções perpendiculares ao maior eixo do fragmento. Estes foram encaminhados para processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica.

Para identificação de colágenos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), analisaram-se os cortes histológicos por meio de microscópio óptico da marca *Olympus*[®] (*Olympus*, Tokyo, Japão), em aumento de 400 vezes.

Os blocos de peças cirúrgicas parafinizados provenientes dos animais em estudo foram cortados em micrótomo, espessura de 4 μ m e fixados em lâminas silanizadas. Procedeu-se então a desparafinização através de 3 banhos de xilol (%) por 15 minutos cada. A seguir, hidratação dos cortes através de 3 banhos com etanol em concentrações decrescentes (100%, 90% e 80%) por 5 minutos cada e água destilada (2 banhos de 10 minutos). Foi feita lavagem

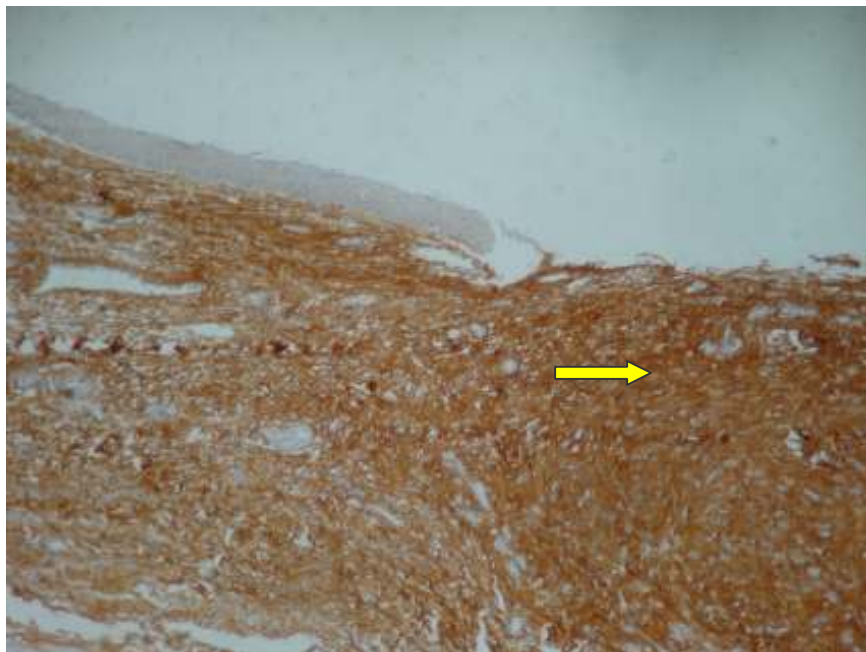
com tampão PBS pH 7,2 e realizada a recuperação antigênica através de solução de hialuronidase 0,2% em tampão PBS pH 7,2 (Sigma, EUA) em estufa a 37°C. Após 3 lavagens durante 5 minutos foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com o uso de solução PBS acrescido de 5% de albumina, por 1 hora em estufa a 37°C. Feitas duas lavagens em tampão PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anticorpos policlonais feitos em coelhos anti-colágeno de suíno tipo I e anticorpo policlonais feitos em coelho anti-colágeno bovino tipo III (Novotec, EUA) diluídos 1/500 em tampão PBS-BSA 3%) “overnight” em câmara úmida a 4°C. Após duas lavagens com tampão PBS, foi realizada a inibição das peroxidases endógenas com solução de metanol contendo 3% de água oxigenada por 10 minutos. Efetua-se três lavagens de 5 minutos com tampão de lavagem PBS-Tween 0,2% pH 7,2. Adicionou-se aos cortes o anticorpo secundário (Envision[®], Dako, Dinamarca) por 1 hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens de 5 minutos em tampão PBS-Tween 0,2% a revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB, Dako, Dinamarca), controlando-se o ponto final de reação em microscópio ótico. Efetuou-se nova lavagem, contracoloração com hematoxilina de Harris 30% por 5 minutos. Os cortes foram então desidratados em bateria de álcool e xilol e as lâminas montadas com Entellan[®] (Merck, Alemanha).

FIGURA 16– EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM



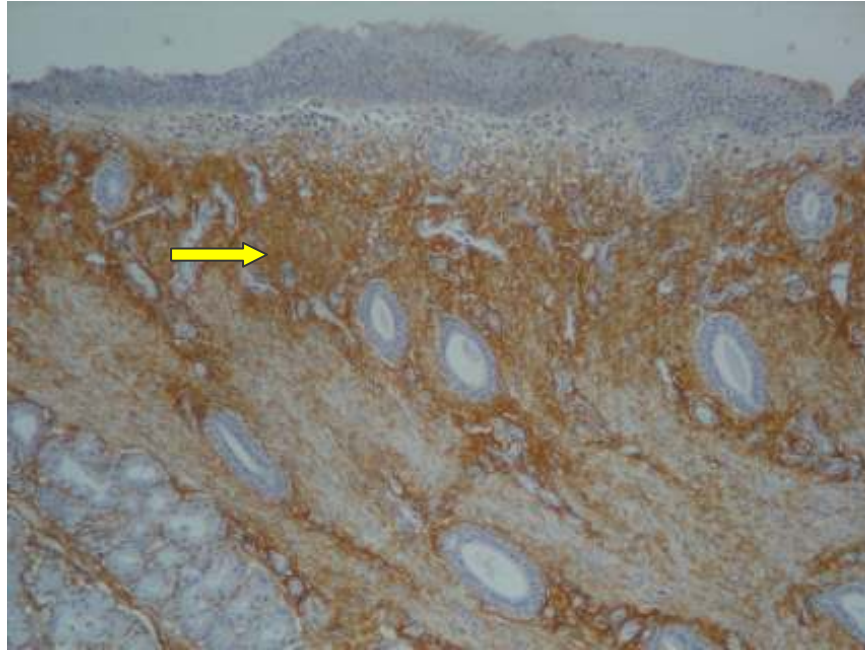
NOTA: Computador Pentium IV[®] acoplado ao microscópio Olympus[®] BX50.

FIGURA 17 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DO COLÁGENO TIPO I



NOTA: Fotomicrografia revelando coloração para anti-colágeno tipo I no córion (seta)

FIGURA 18 EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DO COLÁGENO TIPO III



NOTA: Fotomicrografia revelando coloração para anti-colágeno tipo III no córion. Magnificação original 400x (seta)

As imagens foram captadas por uma câmara *Sony*[®] CCDÍris (Sony, Tokyo, Japão), transmitidas a monitor colorido Triniton *Sony*[®] (Sony, Tokyo, Japão), congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX. Finalmente, foi realizada a análise das imagens com o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para *Windows* (Mídia Cibernética, São Paulo, SP). A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (“*pixels*”) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. Nos cortes histológicos analisados determinou-se o campo microscópico sobre a área de cicatrização e foram obtidas medidas de três áreas distintas. Em cada uma delas o *software* calculou a área ocupada pelas fibras que continham colágenos dos tipos I e III em relação à área total examinada. Considerou-se como medida da área de fibras colágenas a média em micrometros quadrados das três áreas analisadas.

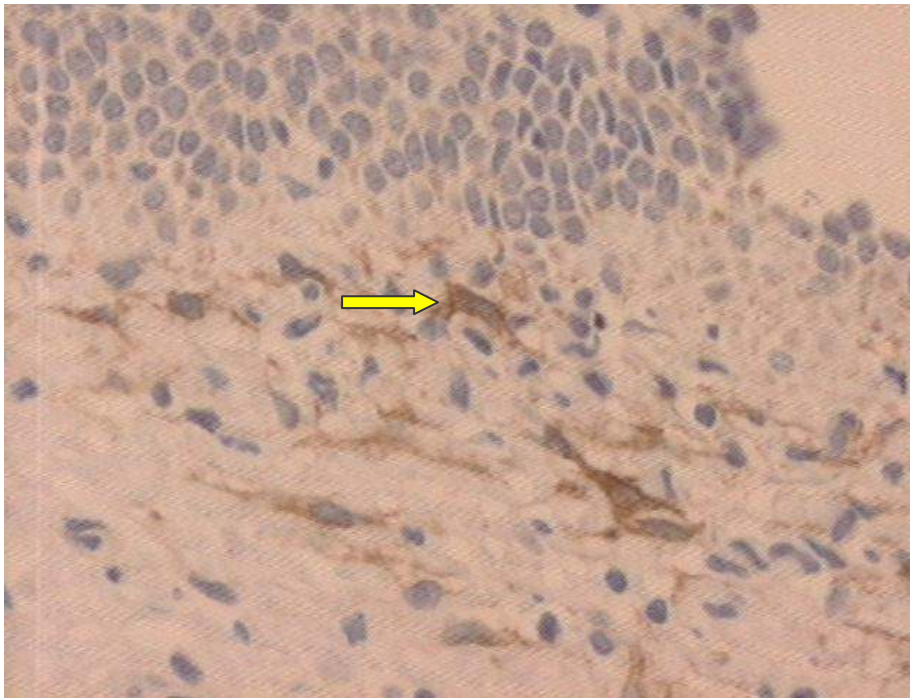
3.11.2 Avaliação imunoistoquímica da quantidade de miofibroblastos

A identificação dos miofibroblastos foi realizada contando-se as células coradas positivamente pela coloração imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti-actina muscular lisa em campo de grande aumento (objetiva de 40X), em três campos distintos aleatoriamente na área de cicatrização correspondendo a uma área de 17.7726 μ^2 , expressas

em médias aritméticas. As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Califórnia, EUA), para Windows, por meio da ferramenta Measures, calibrada previamente para a objetiva de 40 vezes. Utilizou-se um sistema constituído por microscópio óptico BX50 (Olympus[®], Tóquio, Japão), acoplado com câmera de vídeo Sony[®] DXC-970MD (Sony[®], Tóquio, Japão), conectado a computador da linha Pentium e monitor colorido de alta resolução da marca Samsung (Samsung, Coréia do Sul).

A contagem foi realizada analisando-se as imagens individualmente, marcando-se os miofibroblastos por meio da ferramenta Manual Tag (figura 16).

FIGURA 19- EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS



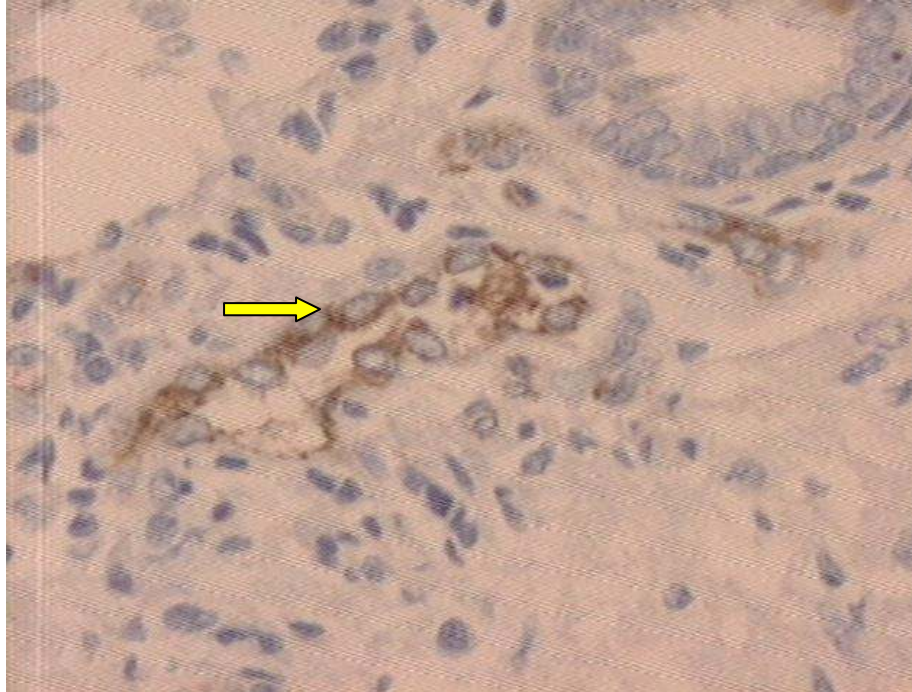
NOTA: Corados em marrom pela técnica avidina-estreptavidina peroxidase diaminobenzina utilizando-se anticorpos anti-actina músculo liso, os miofibroblastos apresentam formato poligonal, com projeções citoplasmáticas e núcleos vesiculosos. Magnificação original 400x (SETA)

3.11.3 Avaliação imunoistoquímica da quantidade de vasos sanguíneos

A identificação dos vasos sanguíneos foi efetuada contando-se o número de estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo policlonal antifator viii, que revela as células endoteliais da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área de cicatrização em aumento de 40 vezes, em três campos distintos aleatoriamente, em área de $17726\mu^2$, expressas em médias aritméticas.

Imagens de toda esta região foram capturadas por sistema acoplado ao microscópio óptico Olympus (Tóquio, Japão), e constituído por câmera de vídeo Sony DXC-970MD (Sony, Tóquio, Japão (Figura 16)

FIGURA 20 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGÜÍNEOS COM A ÍNTIMA CORADA



NOTA: Em marrom revelando positividade para antifator VIII, pela técnica da biotina-estreptavidina-peroxidase-diaminobenzidina, antifator VIII, magnificação original 100X (seta).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foram considerados 2 grupos. O grupo Experimento (n=24) foi subdividido em 2 grupos: Grupo EI, composto de 12 animais (grupo experimento I) foi realizada cirurgia a frio em prega vocal direita. No grupo EII composto de 12 animais (grupo experimento II) foi realizada cirurgia a laser CO₂ em prega vocal esquerda. O segundo grupo C composto de 6 animais (grupo Controle) não foi submetido à cirurgia. Foram realizadas nestes grupos: análise qualitativa do colágeno, avaliação da quantidade de miofibroblastos e vasos sanguíneos na cicatrização das pregas vocais.

As comparações foram realizadas através do teste não-paramétrico de Wilcoxon. Quando de comparações de resultados em grupos diferentes, considerou-se o teste não paramétrico de Friedman. Em todas as comparações efetuadas, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos sob comparação e a hipótese alternativa a resultados diferentes, tendo como valor de $p \leq 0,05$ o limite de significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM RELAÇÃO AO COLÁGENO MADURO (TIPO I) E COLÁGENO IMATURO (TIPO II)

TABELA 3: Quantificação do colágeno maduro e imaturo nos grupos controle e experimento

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>LASER</i>	<i>FRIO</i>
COLAGENO MADURO	2657,42 ± 504,90	1433,34 ± 53,07	1332,68 ± 77,60
COLAGENO IMATURO	458,91 ± 122,84	1215,58 ± 162,50	1020,61 ± 111,81

Valor de P* entre os grupos

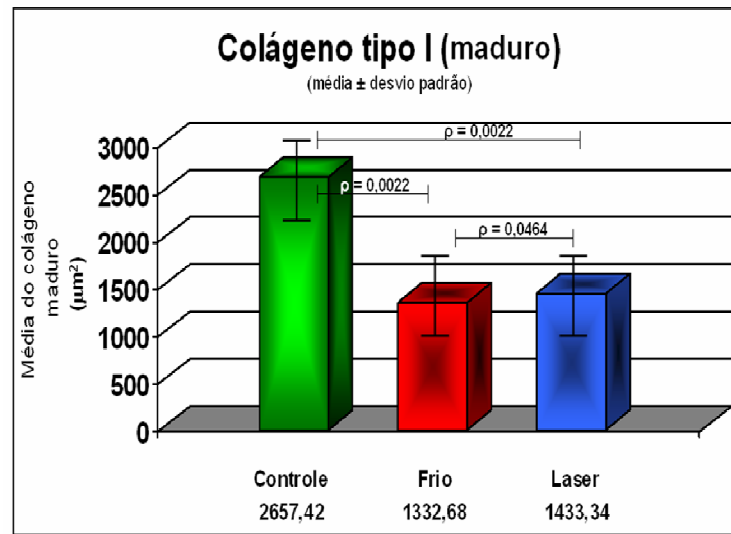
Colágeno Maduro	Controle x frio	P=0,022
	Controle x laser	
	Laser x frio	P=0,0464
Colágeno Imaturo	Controle x frio	P=0,022
	Controle x laser	
	Laser x frio	P=0,1159

* valor de significância

Houve diferença estatisticamente significativa, com relação à quantificação do colágeno maduro quando comparado o grupo experimento (laser e frio) e o grupo controle ($p=0,0022$) havendo diminuição da quantificação do colágeno maduro no grupo experimento. Da mesma forma houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo experimento laser versus frio ($p = 0,0464$) com diminuição da quantificação do colágeno maduro no grupo experimento instrumental a frio.

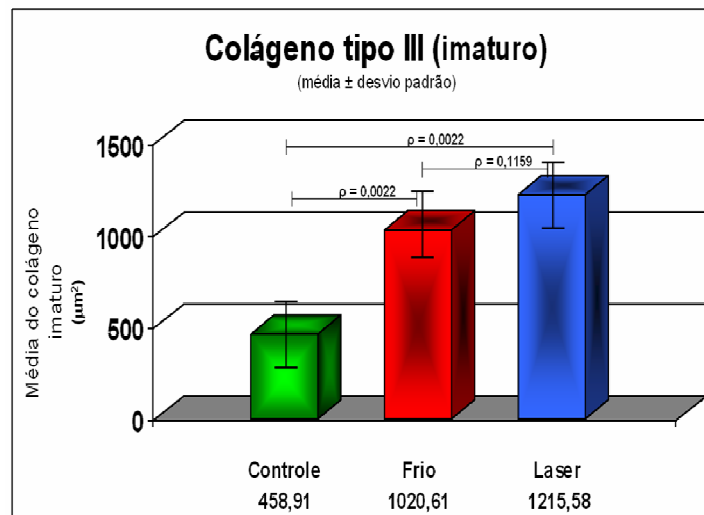
Houve diferença estatisticamente significativa, com relação à quantificação do colágeno imaturo quando comparado o grupo experimento (laser e frio) e o grupo controle ($p= 0,0022$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo experimento laser versus frio ($p = 0,1159$).

GRÁFICO 1 –DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO TIPO I MÉDIAS ± DP



NOTA: μ^2 = micrometro quadrado, p=nível de significancia

GRÁFICO 2 DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO III (MÉDIAS ± DP)



NOTA: μ^2 = micrometro quadrado ,p= nível de significancia

4.2 AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM RELAÇÃO AO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS E NÚMERO DE VASOS

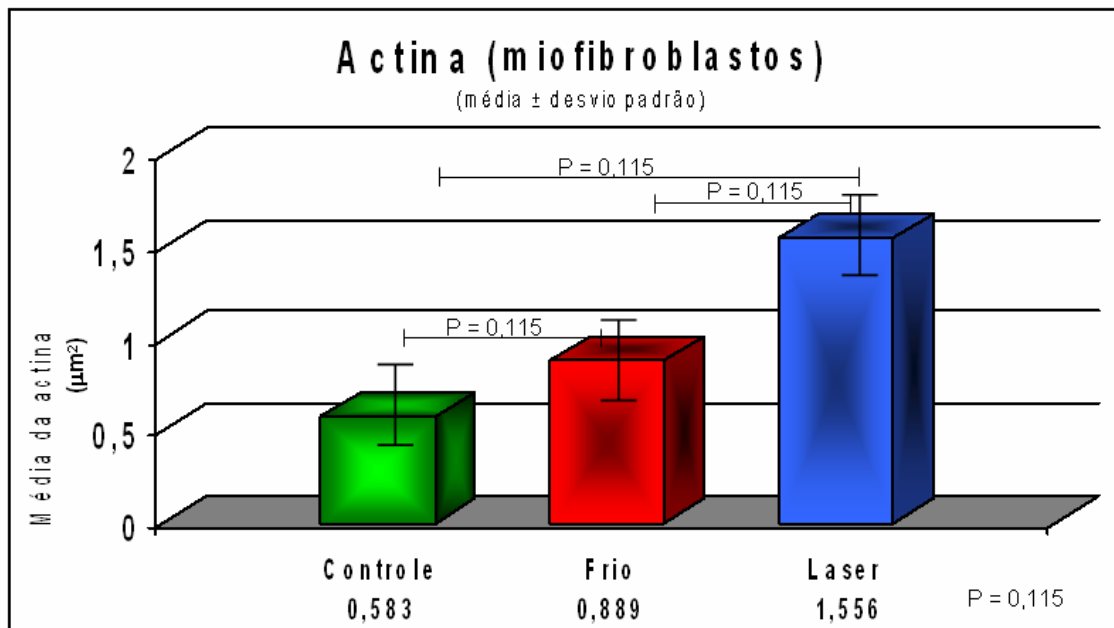
TABELA 4 Quantificação do número de miofibroblastos e número de vasos nos grupos controle e experimento

VARIAVEL	CONTROLE	LASER	FRIO	P*
Número de miofibroblastos	0,583 ± 0,585	1,556 ± 1,559	0,889 ± 0,455	0,115
Número de vasos	0,917 ± 0,585	6,500 ± 1,894	4,889 ± 1,747	0,006

NOTA-(*) Valor de significância no teste não paramétrico de Friedmann , $p < 0,05$

4.2.1 NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS

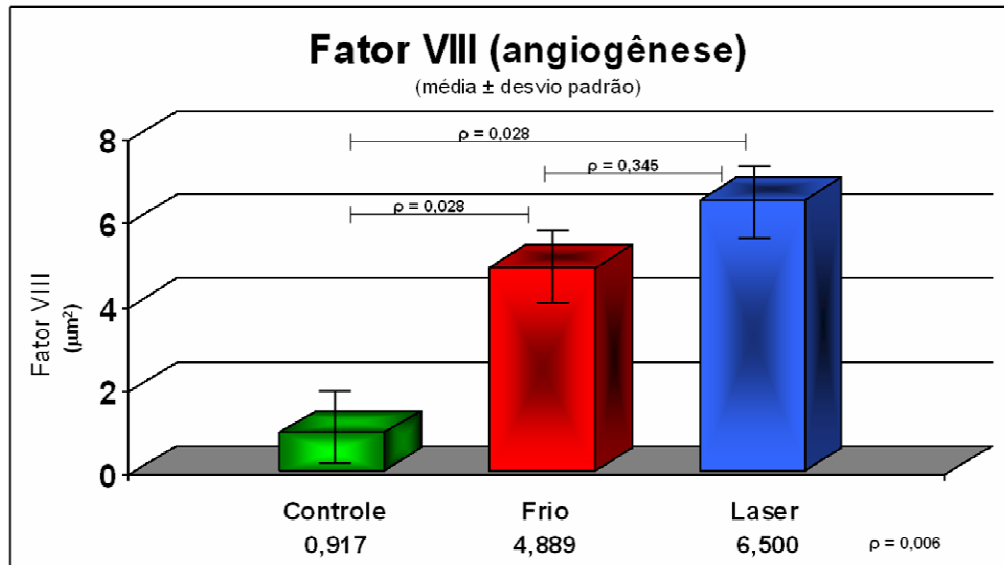
Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de miofibroblastos nos grupos estudados ($p = 0,115$).

GRÁFICO 3 - NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS MÉDIAS \pm DP

NOTA: μ^2 = micrometro quadrado , p=nível de significancia

4.2.2 NÚMERO DE VASOS SANGÜINEOS

Houve diferença estatisticamente significativa com relação ao número de vasos sangüíneos entre o grupo controle e o grupo experimento ($p=0,028$). Havendo aumento dos vasos sangüíneos no grupo experimento. Porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos laser e instrumental a frio ($p = 0,345$).

GRÁFICO 4 – NÚMERO DE VASOS SANGÜINEOS MÉDIAS \pm DP

NOTA: μ^2 = micrometro quadrado ,p=nível de significancia

5 DISCUSSÃO

5.1 MÉTODO

5.1.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

A escolha da exérese do fragmento de prega vocal como técnica cirúrgica para estudo da cicatrização teve como intuito provocar uma lesão potencialmente hiper cicatrizante sem lesionar o ligamento vocal, simulando exérese de lesão que tipicamente provocam hiper cicatrização resultando em cicatriz na prega vocal, com prejuízo para a fonação.

Nos grupos estudados, para a realização da exérese do bordo livre de prega vocal foi utilizada micro tesoura curva como também laser CO₂ e a prega vocal suína se mostrou de consistência similar à prega vocal de humanos.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que comparam modelos de experimentação em suínos para fonomicrocirurgia. (GARRET et al. 2000) compararam as pregas vocais em cães, observando a quantidade de colágeno e fibras de elastina e que além das quantidades dessas substâncias serem semelhante na raça humana, apresentam plano de dissecção similar. Em estudo laringostroboscópico, sugeriram que o cão seria o melhor animal para o estudo funcional da laringe. SANTOS, (2003), compararam a deposição de colágeno em pregas vocais caninas utilizando incisões com instrumental a frio e com laser de CO₂. No presente trabalho, o modelo experimental exigiu animal de médio porte e devido a facilidade de obtenção, como a padronização de idade, peso e raça foi escolhido o suíno da raça *Larger White*. Todos os animais faziam parte da criação da fazenda experimental da Universidade Federal do Paraná, onde as condições de alojamento e tratamento foram adequadas. O suíno é animal dócil e de fácil trato. Não foi encontrada dificuldade técnica, mostrando a prega vocal suína consistência e elasticidade similar à humana. A anatomia da laringe suína mostrou-se adequada para este estudo.

5.1.2 FONOMICROCIRURGIA LARÍNGEA À FRIO E A LASER CO₂

Nas últimas décadas, inovações tecnológicas levaram a melhora substancial na técnica da fonomicrocirurgia laríngea. O processo foi facilitado pelo avanço da fisiologia da laringe (HIRANO, 1993), que produziu melhor entendimento da função laríngea na saúde e na doença.

Novas técnicas cirúrgicas tornaram-se possíveis com o progresso na anestesiologia, adaptação do microscópio cirúrgico para magnificação do interior laríngeo (ALBRECH, 1954), como também instrumentos microcirúrgicos (KLEINSASSER, 1964) e o laser CO₂ (JAKO, 1972).

Apesar de a técnica microcirúrgica ter sido aperfeiçoada e difundida por (KLEINSASSER, 1964) o termo fonomicrocirurgia foi introduzido por (ZEITELS, 1995), buscando uma melhor precisão cirúrgica, a fim de preservar ao máximo as camadas da microestrutura das pregas vocais.

A escolha da técnica cirúrgica a frio foi baseada em estudos de (KLEINSASSER, 1964), graças a instrumentos longos para permitirem uma adequada manipulação com o laringoscópio, porém não tão longos que prejudiquem o uso do microscópio (SATALOFF, 1988).

O trauma deve ser sempre que possível evitado o máximo em nível da margem vibratória da mucosa (SHAPSHAY, 1988). Quando isto não for possível, as lesões devem ser removidas com o mínimo de tecido adjacente, evitando-se especialmente as camadas intermediárias e profundas da lâmina própria (SATALOFF, 1988).

A escolha da técnica cirúrgica com instrumental a frio foi baseada em estudos de vários autores como (KLEINSASSER, 1962; SATALOFF, 1988), que a empregaram no tratamento de lesões benignas preservando ao máximo os tecidos, evitando desta maneira cicatrização excessiva.

ZEITELS, (2000), defende que a técnica específica a ser utilizada depende do tamanho, localização e tipo da doença. No entanto os princípios discutidos acima se aplicam: boa visualização, preservação do tecido normal, evitar danos as camadas intermediárias e profundas da lâmina própria e evitar cirurgias simultâneas bilaterais na maioria dos casos, independentemente se a técnica preconizada for com instrumental a frio ou laser CO₂ (OSSOF, 1989).

BENNINGER, ALESSI E ARCHER, (1996), compararam em humanos as técnicas com instrumental a frio e laser CO₂, na ressecção de lesões benignas como nódulos, pólipos e cistos nos bordos livres das pregas vocais e concluíram que não há diferença clinica no resultado final utilizando uma ou outra técnica.

A técnica a laser CO₂ desde os anos 60 têm sido acompanhados de controvérsias e frustrações. Apesar disso, enquanto sua utilidade para alguns procedimentos laríngeos é universalmente aceita, sua eficácia para muitos procedimentos laríngeos comuns é

controversa. De qualquer forma suas vantagens devem ser pesadas contra suas potenciais desvantagens.

Lasers geram calor, conseqüentemente eles introduzem a possibilidade de complicações relacionadas a esse agente “dano termal”. Quanto maior for a exposição do tecido maior é a energia termal lateral espalhada, e maior o risco de dano as estruturas subjacentes (ligamento vocal) (ABITBOL, 1995). O laser corta não apenas com o centro, mas também com a borda, existindo desta maneira um dano térmico além da borda. Por isso o cirurgião deve centrar o raio da lesão usando a borda para criar a margem da excisão (ABITBOL, 1995).

O laser CO₂ tem vantagens distintas sobre instrumentos tradicionais. Ele permite melhor hemostasia, melhor visibilidade e menor manipulação dos tecidos. No entanto o laser tem também importantes desvantagens. Estas incluem a perda do tecido pela vaporização e conseqüências do dano térmico. A vaporização a laser retira a chance de um exame histopatológico potencialmente importante (SATALOFF, 1995).

A difusão lateral da energia térmica é uma causa comum de complicação relacionada com o uso de laser na cirurgia das pregas vocais, tornando cada vez mais comuns como complicações como cura mais demorada e cicatrizes após cirurgia. A confirmação dessas impressões foi relatada por (ABITBOL, 1984; TAPIA, 1984).

As observações histológicas de (DURKIN, 1986) apoiaram tais observações de que a cirurgia a laser poderia atrasar a cura como também aumentar a formação cicatricial.

No presente estudo, apesar de pouca diferença em relação à deposição do colágeno também observou-se atraso cicatricial com o uso do laser.

No entanto, (SANTOS et al. 2003) compararam incisões em pregas vocais caninas realizadas com instrumental frio e laser CO₂ avaliando, através de cortes histológicos, a quantidade de fibroplasia. Os resultados mostraram que a quantidade de colágeno nas pregas vocais foi maior no grupo de animais submetidos à lesão instrumental a frio do que com laser de CO₂. No entanto no presente, estudo os resultados evidenciaram que a quantidade de colágeno tipo I (colágeno maduro) foi menor no grupo submetido à lesão com instrumental a frio em relação ao grupo laser.

A justificativa para tais controversas talvez estejam no uso de baixa potência, com diminuição do microponto (*microspot*), e com superpulso (SHAPSHAY, 1988), como também o tipo de incisão, pois enquanto em nosso estudo foi realizado exérese de fragmento de mucosa no estudo referido foi realizado incisão linear em nível de camada superficial de

lâmina própria modificando desta maneira o processo cicatricial. No entanto mais pesquisas são necessárias para confirmar ou refutar essa afirmação.

Em suma técnicas com instrumental a frio e com laser CO₂ são métodos seguros em relação à deposição do colágeno quando comparados, evidentemente obedecendo-se os princípios fundamentais da fonomicrocirurgia.

5.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A imunistoquímica é um método sensível e específico, identificando mesmo em quantidades pequenas, epítomos dos colágenos na superfície celular.

A imunistoquímica tem a capacidade de amplificação, permitindo maior superfície reacional (técnica antígeno-anticorpo).

Comparando-se diversos métodos de coloração para a análise do colágeno, a imunistoquímica tem vantagens como especificidade e sensibilidade, não necessitando *software* para leitura. Por outro lado, suas desvantagens são o alto custo, técnica laboriosa e técnico-dependente.

O corante picrossírius é mais seletivo e de fácil execução e interpretação, sendo específico para o colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade de proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma (SWEAT; PUCHTLER; ROSENTHAL; 1964; JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

As preparações, quando coradas pelo picrossírius ao microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes e que apresentam coloração em tons amarelo a vermelho, e que representam o colágeno tipo I; as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes e que apresentam coloração esverdeada representam o colágeno tipo III. Tais propriedades conferem ao picrossírius características de excelência para a difinicação histológica do colágeno. (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

Em estudo sobre a angiogênese na cicatrização de feridas, (RUITER et al., 1993) utilizaram como antígeno a técnica imunistoquímica de *PAL-E*, que é altamente específica para endotélio de vaso sangüíneo, porém o fator VIII e o CD 34 apresentam maior sensibilidade e são expressos também em arteríolas. No presente estudo, a contagem dos vasos sangüíneo foi feita pela técnica imunistoquímica através do antígeno do fator VIII.

Para o estudo dos miofibroblastos foi realizado igualmente estudo de imunistoquímica, utilizando-se para tal anticorpo anti- α -actina muscular lisa (anti- α -sm),

estudado pela primeira vez por (SKALLI et al., 1986), que demonstraram positividade para a identificação dessas células.

5.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.3.1 DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO

No presente estudo foi comparada a deposição do colágeno e a percentagem de fibras colágenas maduras (colágeno tipo I) e imaturas (colágeno tipo III).

Houve diminuição do colágeno maduro e imaturo, quando realizada lesão em mucosa de prega vocal, seja esta feita a laser CO₂ ou com instrumental a frio. Este achado sugere que exista processo contínuo de fibroplasia e regeneração do tecido lesado.

Houve diminuição do colágeno maduro (colágeno tipo I) no grupo instrumental a frio quando comparado ao grupo laser CO₂, porém não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao colágeno imaturo (colágeno tipo III) quando comparado os grupos experimentos (E1 e E2). Este achado sugere um processo de fibroplasia mais ordenada no grupo instrumental a frio que pode favorecer melhor cicatrização, com maior capacidade de resistência tecidual concordando com WITTE; BARBUL (1997).

5.3.2 NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS

Segundo CHANSON et al. (1980) os miofibroblastos são células produtoras de colágeno predominantemente do tipo I, e a sua diminuição poderia estar relacionada a menor síntese de sua proteína.

No estudo, apesar da diminuição da quantidade de colágeno maduro (colágeno tipo I) quando comparados os grupos experimento e controle e os grupos experimentos entre si, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados com relação à quantificação de miofibroblastos. O que pode salientar que as diferentes técnicas de fonomicrocirurgia não promovem a diminuição destas células na cicatriz de prega vocal. É possível que outros fatores tenham levado à diminuição da produção de colágeno maduro neste experimento, como a influência dos componentes da matriz extracelular e diminuição do aporte sanguíneo no processo inflamatório cicatricial.

5.3.3 NÚMERO DE VASOS SANGÜÍNEOS

Angiogênese é a formação de novos vasos sangüíneos por meio de um processo em que são formados brotos capilares em resposta a estímulos químicos externos. Isto ocorre durante a embriogênese, no crescimento de tumores sólidos e na cicatrização de feridas. O desenvolvimento de neovasos é essencial na cicatrização estando relacionados a fatores locais, mediadores químicos, matriz extracelular e gradientes metabólicos. Por esses motivos esta variável foi incluída no presente estudo (ARNOLD; WEST; 1991; PETTET; BYRNE; MCELWAIN; NORBURY, 1996).

A angiogênese está relacionada com a liberação de fatores de crescimento produzidos por diversas células envolvidas no processo de cicatrização. A fibroplasia e a síntese do colágeno iniciam-se nas primeiras vinte e quatro horas após o ferimento, enquanto nas seguintes 48 a 72 horas ocorre a migração endotelial. A partir do quarto dia os macrófagos produzem fatores de crescimento que estimulam tanto a proliferação fibroblástica como a neovascularização (ORGILL; DEMLING, 1988).

No presente estudo houve diferença estatística em relação aos vasos sangüíneos entre o grupo controle e os grupos experimento (laser CO₂ e instrumental a frio). Houve aumento dos vasos sangüíneos nos grupos experimento, o que denota o processo inflamatório cicatricial através da neovascularização. Porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimento (laser CO₂ e instrumental a frio) o que exclui a participação da neovascularização no aumento da fibroplasia com relação a estas diferentes técnicas cirúrgicas

5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo foi demonstrado que ocorre diminuição da fibroplasia (diminuição do colágeno maduro), no processo cicatricial pós exérese de fragmento de mucosa de prega vocal com instrumental a frio ou com laser CO₂. Apesar desta influência os fatores estudados que poderiam explicar a diminuição do colágeno maduro (número de miofibroblastos e número de vasos sangüíneos) não foram capazes de explicar tal fato.

Outros fatores estão sendo estudados como o papel do fator de crescimento de hepatócitos (HGF – “hepatocyte growth factor”) como fator antifibrótico, prevenindo fibrose e a formação de tecido cicatricial (HIRANO et al., 2002).

HIRANO, (2003), concluiu que o HGF tem atividade antifibrótica, pois estimula atividade de proteases para degradar a matriz e regenerar células epiteliais e endoteliais, mediante da interação com o estroma. Nesse trabalho os autores investigam como o HGF altera a produção do colágeno em fibroblastos de prega vocal de cães em cultura, assim como o efeito do fator de crescimento tecidual $\beta 1$ (TGF $\beta 1$ – “tissue growth factor $\beta 1$ ”), que tem função oposta ao HGF. Os autores avaliam a produção do ácido hialurônico, colágeno tipo I e fibronectina com ou sem adição de HGF e TGF $\beta 1$, através de imuno enzimático. O HGF estimula a síntese de ácido hialurônico e diminui a de colágeno tipo I, porém não altera fibronectina, enquanto o TGF $\beta 1$ estimula os 3 componentes. Tais fatores poderiam explicar a diminuição do colágeno tipo I sem a diminuição do número de miofibroblastos, como o observado no presente estudo.

Estudos futuros, com amostras maiores, com maior tempo de seguimento e outras variáveis serão necessários para confirmar estes resultados e para definir os reais fatores que diminuem a deposição de colágeno maduro e como poder-se-ia prevenir ou retardar a fibroplasia de prega vocal.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Após 30 dias da exérese de fragmento de mucosa de pregas vocais suínas, com instrumental a frio e laser de CO₂ pelo método imunoistoquímico podemos concluir:

1.a. Há menor concentração da deposição do colágeno maduro no grupo experimento (instrumental a frio e laser CO₂) quando comparado com o grupo controle (sem lesão). Da mesma forma há menor concentração da deposição do colágeno maduro no grupo experimento instrumental a frio quando comparado ao grupo laser CO₂.

1.b. Há maior concentração da deposição do colágeno imaturo quando comparado o grupo experimento (instrumental a frio e laser de CO₂) e o grupo controle (sem lesão). Não há diferença quando comparada a concentração da deposição de colágeno imaturo entre os grupos experimento instrumental a frio o grupo laser CO₂.

2. Não há diferença quanto ao número de miofibroblastos nos grupos experimento e controle como também entre os grupos experimento instrumental a frio ao grupo laser CO₂.

3. A exérese de fragmento de mucosa em prega vocal com instrumental a frio e laser CO₂ associa-se a aumento da angiogênese em relação ao grupo controle não operados. Porém, não há diferença quando comparados o grupo experimento instrumental a frio ao grupo laser CO₂.

7 REFERÊNCIAS

- ABITBOL, J. Limitations of the laser in microsurgery of the larynx. Transactions of the Twelfth Symposium. Care of the Professional Voice. v. 1, p. 297-301, 1984.
- ABITBOL, J. **Atlas of Laser Voice Surgery**. Singular. San Diego, p.1-21, 1995.
- ALBRECH, R. Uber den wert kolposkopischer untersuchungsmethoden bei leukoplakien und carcinomen des mundes und kehlkopfes. v. 164, p. 459-63, 1954.
- ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Patologia**, 1999.
- ANJOS, A.R. dos; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Leukemia and extracelular matrix. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 22, n. 3, p. 404-12, 2000.
- ARANTES, A.; GUSMÃO, S.; RUBINSTEIN, F.; OLIVEIRA, R. Anatomia microcirúrgica do nervo Laríngeo recorrente: aplicações no acesso cirúrgico anterior à coluna cervical. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 62, n. 3-A, p. 707-10, 2004.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.** Oxford, v. 52, p. 407-22, 1991.
- ARNOLD, G.E. Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. **ARCH Otolaryngol** v. 52, p. 1-17, 1955.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURTI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BATEGAY, E. J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 73, p. 333-46, 1995.
- BENNINGER, M.S.; ALESSI, D.; ARCHER, S. Vocal fold scarring: Current concepts and management. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 115, n. 5, p. 474-82, nov. 1996.
- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; **Cicatrização**. In: ROBE Modelo Experimentais de Pesquisa em Cirurgia, ed São Paulo, 265-74, 1998.
- BOENISH, T. **Dako Handbook on immunohistochemistry Staining Methods**. 3. ed. Carpinteria, California: Dako Corporation, 2001.
- BOUCHAYER, M.; CORNUT, G. Microsurgery for benign lesions of the vocal folds. **Ear Nose Throat J**, v. 67, p. 446-66, 1988.
- BREDERNIER, H.C. Laser accessory for surgical applications. US Patent, v. 3, p. 613-59, 1972.
- BRUNETAUD, J.M.; DECOMPS, B. Les laser en medicine. **La Recherche**, v. 13, p. 1122-9, 1982.
- CAMARGO, P.A.M.; RISPOLI, D.Z.; PEREIRA, M.C. **Cirurgia para elevar o "Pitch"vocal**. In: CAMPOS, C.A.H.de; COSTA, H.O.L. (Ed). Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo SP: Roca. p. 427-33, 2003.

CAMARGO, P.A.M.; CAMPOS, A.C.L.; MATIAS, J.E.F.; RISPOLI, D.Z.; PRZYSIEZNY, P.E.; FONSECA, V.R. Efeito da mitomicina C tópica na cicatrização de prega vocal em modelo suíno. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 72, n. 5, p. 601-4, marc./abr. 2006.

CARREL, A.; HARTMANN, A. The relation between the size of a wound and the rate of its cicatrization. *J. Exp. Med.*, New York, v. 24, p. 429-50, 1916.

CASTRO, S.V. de. Esplanologia. **Anatomia fundamental**. 2. ed. McGraw-Hill. p. 427-556, 1980.

CHAMSON, A.; GARRONE, R.; AVGER, C.; FREY, J. J. Effects of tobacco extraction on the ultrastructure of fibroblasts in culture. *J. SUBMICROSC.CYTOTOL.BOLOGNA*, v. 12, p. 401-06, 1980.

CLARK, R. A.; STONE, R. D.; LEUND, D. Y. K.; SILVER, I.; HOHN, D. C.; HUNT, T. K. Role of macrophages in wound repair. *Surg. Forum*, Chicago, v. 27, n. 16, p. 17-8, 1976.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991)**, Disponível em < www.cobea.org.br/ética >. Acesso em 19 de outubro de 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. **Robbis - Pathologic basis of disease**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 51-92, 1994.

COUREY, M.S.; GARDNER, G.M.; STONE, R.E., OSSOFF, R.H. Endoscopic vocal fold microflap: a three-year experience. *Ann Otol Rhino Laryngol.*, v. 104, p. 267-73, 1995.

COUREY, M.S.; SHOHET, J.A.; SCOTT, M.A.; OSSOFF, R.H. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhino Laryngol.*, v. 105, p. 525-58, 1996.

COUREY, M.S.; GARRETT, C.G.; OSSOFF, R.H. Medial microflap excision of benign vocal fold lesions. *Laryngoscope*, v. 107, p. 340-4, 1997.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S.; DUNPHY, J. E. Specific activity of hydroxyproline tritium in the healing colon. *Surg. Gynecol. Obstet.*, New York, v. 126, n. 5, p. 1061-5, 1968.

DIEGELMANN, R. F.; ROTHKOPF, L. C.; COHEN, L. K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. *J. Surg. Res.*, v. 19, p. 239-43, 1975.

DIEGELMANN, R. F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 107-13, 1981.

DURKIN, G.E. Wound healing of true vocal cord squamous epithelium after co2 laser ablation and cup forceps stripping. *OTOLARYNGOL HEAD NECK SURG.* v. 95, p. 273-77, 1986

ECKERSLEY, J. R.; DUDLEY, J. R. Wounds and wound healing. *Br. Med. Bull.*, London, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

EHRlich, H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen.*, v. 4, p. 203-6, 1996.

ENGLISH, G.M. Embriology and Anatomy of the mouth and throat. Philadelphia, J.B. Lippicott, v. 1, 1984.

- FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 401, p. 212-27, 1982.
- FORREST, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing (review). **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 70, p. 133-42, 1983.
- GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**. Basel, v. 15, n. 5, p. 549-50, 1971.
- GAFFNEY, E. A.; PUGH, K.; MAINI, P. K.; ARNOLD, F. Investigation a simple model of cutaneous wound healing. **J. Math. Biol.**, Berlin, v. 45, p. 337-74, 2002.
- GARRET, C.G.; COLEMAN, J.R.; REINISCH, L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: Implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. **Laryngoscope**, v. 110, p. 814-24, 2000.
- GARRETT, C.G.; SOTO, J.; BILLANTE, C.R.; RIDDICK, J.; REINISCH, L. Effect of mitomycin-C on vocal fold healing in a canine model. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 110, p. 25-30, 2001.
- GARRET, C.G.; REINISH, L. New generation pulse carbon dioxide laser: comparative effects on vocal fold wound healing. **Ann Otol Rhinol Laryngol.**, V.26, P. 471-6, 2002.
- GRAY, S.D.; TRITTE, N.; L.I, W. The effect of mitomycin C on extracellular matrix proteins in a rat wound model. **Laryngoscope**, v. 113, p. 237-42, 2003.
- HARAF, D. J. Treatment selection in T1 and T2 vocal cord carcinomas. v. 2, p. 41-50, 1988.
- HAYASHI T. ; MIZUNO K. **Collagen.**, Disponível em:
< <http://users.easystreet.com/kxm/eng/collagen.htm> >. Acesso em: 14 dez. 2006.
- HERTIG, A. T. Angiogenesis in the early human chorion and in primary placenta of the macaque monkey. **Contr. Embryol.**, v. 146, p. 37-82, 1935.
- HINZ, B.; MASTRANGELO, D.; ISELIN, C. E.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and miofibroblast differentiation. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 159, n. 3, p. 1009-20, 2001.
- HIRANO, M. Morphological structure of the vocal cord as vibrator and its variations. **Folia Phoniatica**. v. 26, p. 89-94, 1974.
- HIRANO, M. Vocal mechanisms in singing. Laryngological and phoniatic aspects. **J. voice**. v. 2, p. 51-69, 1988.
- HIRANO, M. Surgical anatomy and physiology of the vocal fold. In: Gould WJ, SALATOFF, R.T.; SPIEGEL, J.R. **Voice surgery**. Chicago, Ill: Mosby-Year Book, p. 125-58, 1993.
- HIRANO, S.; THIBEAULT, S. L.; FORD, C.; BLESS, D. M.; KANE, M. Hepatocyte growth factor and its receptors –met in rat and rabbit vocal folds. **ANN OTOL RHINOL LARYNGOL.**, v. 6, p. 661-6, 2002.
- HIRANO, S.; BLESS, D.; HEISEY, D.; FORD, C. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor β 1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblast. **LARYNCOSCOPE**, v. 3a, p. 144-8, 2003.

HIRANO, S.; BLESS, D.; MASSEY, R. J.; HARTING, GK.; FORD, C. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. **ANN OTOL RHINOL LARYNGOL.**, v, 3b, p. 1026-33, 2003.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hiperplastic dental follicle: study with Picrosirius red and polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathol Med.**, v. 25, p. 125-7, 1996.

HIRSHBERG, A.; SHERMAN, S.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. **J Oral Pathology Med.**, v. 28, n. 9, p. 410-2, oct. 1999.

HOLLINGER, L. D.; LUSK, R. P.; GREEN, C. G. Laryngeal development. **In: Pediatric Laryngology and Broncoesophagology**, Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997.

HUNGRIA, H. **Anatomia e fisiologia**. 7. ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro RJ, p. 157-60, 1995.

HUPP, J.R. Reparação de feridas. In: PETERSON, L.J.; ELLIS III, E.; HUPP, J.R.; TUCKER, M.R. (Ed.). **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. Rio de Janeiro RJ: Guanabara Koogan, 2000. p. 57-67.

IMAMURA, R.; TSUJI, D.H.; SENNES, L.U. Fisiologia da laringe. In: CAMPOS, C.A.H. de; COSTA, H.O.L. (Ed.). **Tratado de otorrinolaringologia**. São Paulo SP: Roca, p. 751-67, 2003.

JAKO, G. J.; STRONG, M. S. Laser surgery in the larynx: early clinical experience with continuous CO₂ laser. **Ann Otol Rhinol Laringol.**, v. 81, p. 791-8, 1972.

JASSIR, D.; BUCHMAN, S.A.; GOMES-MARIN, O. Safety and efficacy of topical Mitomycin-C in miringotomy patency. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.124, p. 368-73, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and II by sirius red and polarization microscopy. **Arch Histol Jap.**, v. 41, p. 267-74, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy. A specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-55, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, P. J. Tecido Conjuntivo. In: ____ . **Histologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 69-84,1995.

KHAN, P.T.; DOYLE, J.W.; SHERWOOD, M. D.; RIERSON, I.; SCHULTZ, G.S.; MCGORRAY, S. Prolonged localized tissue effects from 5 minutes exposure to fluorouracil and mitomycin. **C Arch Ophthalmol.**, v. 111, p. 263-7, 1993.

KITZING, P. Stroboscopy - a pertinent laryngological examination. **J. Otolaryngol.**, v. 14, p. 151-7, 1985.

KLEINSASSER, O. Mikrochirurgie in Kehlkopf. **Arch. Ohrenheilk**, v. 183, p. 428-33, 1964.

KNICHTON, D. R.; HUNT, T. K.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. H. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 126, n. 4, p. 379-68, 1982.

- KNICHTON, D. R.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B. J.; WERB, Z.; BANDA, M. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**, Washington D.C., v. 221, p. 1283-5, 1983.
- LEONG, A. S.Y.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in the tumor diagnosis. **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-305, 1997.
- LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northbrook, v. 125, n. 1, p. 67-71, 2001.
- LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M.; DESMOLIERA, A. Normal scarring: importance of miofibroblasts. **Wound Repair Regen.**, Maiden, v. 10, n. 2, p. 86-92, 2002.
- MACHADO, A. **Nervos cranianos**. Neuroanatomia funcional. 2. ed. Atheneu. São Paulo SP, p. 119-28, 1993.
- MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. **Science**, Washington, D. C., v. 173, p. 548-50, 1972.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares Parte I. **An bras Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.
- MARTINS, A.P.Z. Embriologia e anatomia da laringe. In: CAMPOS, C.A.H. de; COSTA, H.O.L. (Ed.). **Tratado de otorrinolaringologia**. São Paulo SP: Roca, p. 743-50, 2003.
- MELO, E.C.M.; LEMOS, M.; XIMENES, J.A.; SENNES, L.U.; SALDIVA, P.H.H.; TSUGI, D.H. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. **Laryngoscope**, v. 113, p. 2187-91, 2003.
- MELO, E.C.M. Distribuição das fibras colágenas na lâmina própria e no músculo da prega vocal humana: Estudo descritivo morfométrico. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2004.
- NEVES, B.M.J.; NETO, J.G.; PONTES, P. Diferenciação histopatológica e imunoistoquímica das alterações epiteliais no nódulo vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.*, v. 70, n.4, 439-48, jul./ago. 2004.
- NASRI, S; SERCAZ, JA; BEIZAI, P; KIM, Y; BERKE, GS. Gross-inervation of the thyroarytenoid muscle by a brach from the external division of the superior laryngeal nerve. **Ann Otol Rhinol Laryngol.**, v. 106, p. 594-8, 1997.
- NEILSON, E. G.; PHILIPS, S. M.; JIMENEZ, M. S. Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 128, n. 3, p. 1484-6, 1982.
- ORGILL, D. & DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. **Criect Care Méd.**, v. 16, p. 899-907, 1988.
- OSSOF, R.H.; KARLAN, M.S. Instrumentation for CO₂ laser surgery of the larynx and tracheobronchial tree. *Surgery Clin North Am*, v 64, p. 973-80, 1980.
- OSSOF, R.H.; KARLAN, M.S. Laser surgery in otolaryngology head and neck surgery : Anesthetic and educational considerations for laryngeal surgery. **Laryngoscope**, v. 81, p 791-890, 1989.

PEARSON, B.W. **Anatomofisiologia**. In: LOPES FILHO, O.; CAMPOS, C.A.H. de. Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo sp: Roca, p. 973-94,1994.

PEREIRA, M.C. **Efeito da mitomicina-C tópica sobre os depósitos de colágenos total na submucosa das pregas vocais íntegras de suíno**. Curitiba, 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia / Universidade Federal do Paraná.

PICCINATO, C.E.; NETTO, J.C.; CHERRI, J. Cicatrização. In: CAMPOS, C.A.H. de; COSTA, H.O.L. (Ed.). **Tratado de otorrinolaringologia**. São Paulo SP: Roca, 2003, p. 189-200.

POWELL, D. W.; MIFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Miofibroblasts. Intestinal sub-epithelial myofibroblasts. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 14, p. 183-201, 1999.

PRATER, R.J.; SWIFT, R.W. Anatomia y fisiologia de la produccion de la voz. **Manual de terapeutica de la voz**. Barcelona: Salvat, p. 1-26, 1986.

RIBEIRO, F.A.Q.; GUARALDO, L.; BORGES, J.P.; ZACCHI, F.F.S.; ECKLEY, C.A. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with Mitomycin C. **Laryngoscope**, v. 114, p. 148-52, 2004.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **RBPS**, v. 17, n. 1, p. 44-8, 2004.

ROSENFELD, D.B.; MILLER, R.H.; SESSIONS, R.B.; PATTEN, B.M. Morphologic and histochemical characteristics of laryngeal muscle. **Arch Otolaryngol.**, v. 108, n. 10, p. 662-6, oct. 1982.

SANTORO, P.P.; BOHADANA, S.C.; TSUJI, D.H. **Fisiologia da deglutição**. In: CAMPOS, C.A.H. de; COSTA, H.O.L. (Ed.). Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo SP: Roca, v. 2, p. 768-82, 2003.

SANTOS, C.C.; RELLET, M.; JUNIOR, A.R.; JAMUR, M.C.;PINTO, J.A.;FOMIN, D.S. Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser CO₂ em modelo animal.**Rev Bras. Otorrinolaringol.**,v.69, n.6, p.753-9, nov/dez. 2003.

SATALOFF, R.T.; SPIEGEL, J.R.; CARROLL, L.M. Stroboscovideolaryngoscopy in professional voice users: Results and clinical value. **J.VOICE**, v. 1, p.359-364, 1988

SATALOFF, R.T.; SPIEGEL, J.R.; HEUER, R.J. Laryngeal minimicroflap: a new technique and reassessment of microflap saga. **J Voice**, v. 9, p. 198-204, 1995.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-7, 1998.

SENNES, L.U.; TSHJI, R.K.; IMAMURA, R.; TSUJI, D.H. Mitomycin-C in the endoscopic tratment of laringeal stenosis, **Arq Otorrinolaringol.**, v. 7, p. 22-7, 2003.

SERINI, G; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 250, p. 273-83, 1999.

SHAPSHAY, S.M.; WALLACE, R.A. New microspot micromanipulator for carbon dioxide laser surgery in otolaryngology. Early clinical results. **ARCH OTOLARYNGOL HEAD**

NECK SURG., v. 114, p. 1012-15, 1988.

SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. A monoclonal antibody against smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **J. CELL BIOL.**, New York, v. 103, n. p. 2787-2796, 1986

SWANSON, P.E. Foundations of immunohistochemistry. A practical review. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 90, n. 3, p. 333-9, 1988.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S.I. Sirius Red F3BA as stain for connective tissue. **Arch Pathology**, v. 78, p. 69-72, 1964.

TAPIA, R.G.; PARDO, J. Effects of the laser upon Reinke space and the neural system of the vocalis muscle. Transactions of the Twelfth Symposium. Care of the Professional Voice. v. 1, p. 289-291 1984.

TAYLOR, C. R. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. **Human Pathology**, v. 25, n. 1, p. 2-11, 1994.

TITZE, I.R. Comments on the myoelastic aerodynamic theory of phonation. **J. Speech Hear. Res.**, v. 23, p. 492-510, 1980.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 3, p. 349-63, 2002.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Maiden, v. 5, n. 1, p. 40-6, 2000.

TRUBIAN, P.S. **Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno.** Curitiba, 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia / Universidade Federal do Paraná.

TSCHIASSNY, K. Therapeutically induced paralysis of cricothyroid muscle or its removal in paralytic laryngeal stenosis. **Arch otolaryngol.**, v. 65, p. 133-42, 1957.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos.** Curitiba: Editora da UFPR, v. 10, 2000.

VAN DEN BERG, J.; ZANTEMA, J.T.; DOORNENBAL, P. On the air resistance and the Bernoulli effect of the human larynx. **J. Acoust. Soc. Am.**, v. 29, p. 626-31, 1957.

VARELA, D.G.; GRELLET, M. Histologia da camada superficial da lâmina própria da prega vocal ao se aplicar retalho pediculado de mucosa: estudo experimental em cães. **Rev Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 3, p. 318-24, maio/jun.2005.

Von LEDEN H: The mechanism of phonation- A search for a rational theory of voice production., v. 74, p. 660-76, 1961

Von LEDEN, H: The history of phonosurgery. In: Ford CN, Bless DM (eds): Phonosurgery. New York, Raven Press, p. 3-24, 1991.

WAHL, S. M.; WAHL, L. M.; MC CARTHY, J. B. Lymphocit-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 247-54, 1978.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. N. Am.**,

Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 509-27, 1997.

ZEITELS, S.M. Premalignant epithelium and microinvasive cancer of the vocal fold: The evolution of phonomicrosurgical management. **Laryngoscope**, v. 105 (suppl 67), p. 1-51, 1995.

ZEITELS, S.M. **Phonomicrosurgery I: principles and equipment**. In: MURRY, T., ed. The Otolaryngologic Clinics of North America: Voice Disorders and Phonosurgery II. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v.3, n.5, p. 1047-62, 2000.

ANEXO I

EMBRIOLOGIA DA LARINGE.

ENGLISH, (1984), divide o desenvolvimento laríngeo no período embrionário em oito fases:

FASE I – Aproximadamente na 3ª semana gestacional surge o primeiro sinal do sistema respiratório, correspondente a um espessamento epitelial ao longo do aspecto ventral do intestino primitivo, chamado de *primórdio respiratório* (separado do primórdio hepático pelo septo transversal).

FASE II – Surge o *divertículo respiratório*, uma evaginação do intestino primitivo em direção ao primórdio respiratório, a partir do assoalho faríngeo primitivo (no adulto corresponde à região glótica). A porção cefálica do divertículo respiratório desenvolve-se em direção à subglote. Na 4ª semana gestacional o divertículo respiratório dá origem a outras duas projeções laterais (*brotos broncopulmonares*), que evoluirão para o trato respiratório inferior.

FASE III – A parte superior do intestino primitivo e o divertículo respiratório migram superiormente e os brotos broncopulmonares são projetados caudal e inferiormente, dando origem aos *brônquios principais e à carina*. A distância entre o divertículo respiratório e a carina aumenta progressivamente, dando origem à traquéia. A subglote continua a se desenvolver.

FASE IV – Surge a *laringofaringe primitiva* (no adulto corresponde à supraglote) por volta da 5ª semana gestacional, como extensão da quarta bolsa faríngea. Nessa fase surgem também as cartilagens, músculos, nervos e artérias a partir do segundo, terceiro e quarto arcos branquiais.

FASE V – A laringofaringe primitiva é obliterada pela lâmina epitelial, exceto por uma estreita comunicação entre a hipofaringe e a subglote, o *ducto faringoglótico*. Músculos, nervos e cartilagens continuam a se desenvolver. Desenvolve-se o *ceco laríngeo* (depressão entre as cartilagens aritenóide e epiglote).

FASE VI – O ceco laríngeo cresce ao longo do aspecto ventral das aritenóides e desce até o nível da região glótica.

FASE VII – Inicia-se a canalização da lâmina epitelial, dorso-ventralmente e céfalo-caudalmente, com restabelecimento da comunicação entre o ceco laríngeo e o ducto faringoglótico. A última parte a recanalizar é a glote. A lâmina epitelial é a principal indutora da diferenciação do mesênquima branquial em tecido laríngeo.

FASE VIII – Corresponde ao início do período fetal, quando o ventrículo cresce a partir da face ventral do ceco laríngeo. Com a completa recanalização da lâmina epitelial estabelece-se comunicação entre supra e subglote.

O epitélio de revestimento laríngeo deriva do endoderma e é inicialmente poliédrico embrionário. Por volta do 3º mês gestacional, esse epitélio espessa-se e recebe os primeiros cílios. No 6º mês já é pavimentoso estratificado, recebendo posteriormente glândulas nas pregas vestibulares, ventrículos e subglote.

Entre o 3º e 5º mês de gestação se completam os desenvolvimentos da cartilagem tireóidea (4º arco branquial), cartilagem cricóide (5º arco branquial), osso hióide (3º arco branquial), aritenóides e epiglote.

ANEXO II

ANATOMIA DA LARINGE

A laringe está situada na região cervical anterior mediana, onde se pode facilmente palpar uma proeminência piramidal que pertence à cartilagem tireóide, a qual é denominada proeminência laríngea (CASTRO, 1980). A laringe é um órgão músculo-cartilaginoso, que segue a faringe e precede a traquéia, tendo tríplice função (MARTINS, 2003, PEREIRA, 2006):

- Age como válvula protetora, impedindo a passagem de partículas alimentares para a via respiratória e do ar para o esôfago durante a deglutição.
- É via aerífera, conduzindo ar à traquéia e alvéolos para que ocorra a hematose.
- É órgão essencial na formação dos sons (função vocalizadora).

Cartilagens laríngeas

Da laringe até os alvéolos pulmonares, as vias aeríferas devem permanecer como tubos constantemente abertos para assegurar a livre passagem de ar, o que se realiza graças à existência de anéis cartilagíneos incompletos. Ao nível da laringe, esses anéis se tornam muito irregulares e as cartilagens que os constituem merecem descrição mais acurada (MARTINS, 2003).

As cartilagens da laringe são divididas em ímpares (epiglote, tireóide e cricóide) e pares (aritenóides, corniculadas e cuneiformes). Essas cartilagens são ligadas entre si por ligamentos e articulações, que possibilitam o deslizamento entre elas. Tem-se o ligamento tireo-hióideo lateral, os ligamentos tireoepiglóticos, tireoaritenóideos inferiores e cricoaritenóideos. As articulações são a cricotireoidéia e a cricoaritenoidéia (CASTRO, 1980; MARTINS, 2003).

A tireóide, cricóide e aritenóide são cartilagens hialinas e podem sofrer calcificações que se iniciam após os vinte anos de idade, sendo as restantes, cartilagens elásticas (CAMARGO; RISPOLI; PEREIRA, 2003).

Cartilagem tireóide

Seu nome em grego significa “escudo” (CASTRO, 1980). É a maior das cartilagens laríngeas, mediana e única. Está constituída por duas lâminas divergentes dispostas em “V”, o que lhe confere a forma de escudo e justifica sua etimologia. No ponto de união superior das lâminas, há uma projeção anterior, a proeminência laríngea (pomo de *Adão*), mais acentuada no homem, palpável e visível *in vivo*. As bordas anteriores das lâminas divergem superiormente formando a incisura tireóidea. A borda posterior de cada lâmina prolonga-se superior e inferiormente para constituir o corno superior e inferior, respectivamente. Os cornos inferiores articulam-se com as facetas no arco posterior da cartilagem cricóide, formando a articulação cricotireoidéia, que é sinovial, portanto, sujeita à artrite (CASTRO, 1980; MARTINS 2003; PEREIRA, 2006).

As lâminas da cartilagem tireóide possuem um reparo anatômico superficial nos seus três quartos posteriores, a linha oblíqua, que corresponde ao ponto de inserção de vários músculos extrínsecos da laringe: omo-hióideo, esternotireóideo e constritor inferior. Internamente, as lâminas são revestidas por mucopericôndrio, exceto na comissura anterior (porção interna do ângulo). Neste local, tem-se a inserção de duas pregas vestibulares e duas pregas vocais. Nessa região, os ligamentos penetram no pericôndrio, formando uma estrutura denominada ligamento de *Broyle*, que contém vasos sanguíneos e linfáticos, consistindo em local de disseminação de tumores laríngeos (CASTRO, 1980; MARTINS; 2003; PEREIRA, 2006).

Cartilagem cricóide

Seu nome em grego significa “anel” (CASTRO, 1980). Tem a forma de anel de sinete com o arco mais largo (lâmina) na região posterior. Em cada lado da borda superior da lâmina há uma faceta para a articulação com a aritenóide correspondente (articulação cricoaritenoidéia). Une-se à cartilagem tireóide na linha média pelo ligamento cricotireóideo. Sua borda inferior delimita o término da laringe e o início da traquéia e do esôfago. Situa-se ao nível da sexta vértebra cervical (CASTRO, 1980; MARTINS, 2003; PEREIRA, 2006).

Cartilagem epiglote

Cartilagem única, em forma de folha. Sua porção inferior é intralaringea, enquanto sua porção superior fica em direção à base da língua. Desempenha uma importante função de proteção do ádito da laringe durante a deglutição. Sua porção inferior ou pecíolo une-se à cartilagem tireóide através do ligamento tireoepiglótico. Na sua porção anterior convergem três pregas mucosas originadas na base da língua, a prega glossoepiglótica mediana e as pregas glossoepiglóticas laterais. A depressão formada a cada lado da prega mediana é denominada valécula. A mucosa da face laríngea prossegue até as cartilagens aritenóides, formando as pregas ariepiglóticas. A epiglote apresenta depressões nas quais se alojam glândulas e forames, através dos quais passam nervos e vasos sanguíneos (CASTRO, 1980; MARTINS, 2003; PEREIRA, 2006).

Cartilagens aritenóides

Têm a forma de pirâmide, com ápice superior e base inferior. A partir da base têm-se os processos musculares e vocais os quais se articulam com o bordo superior da cartilagem cricóide, em uma junta sinovial. Essa articulação participa mais ativamente das funções de respiração e fonação, através das mudanças na posição das pregas vocais. A principal propriedade mecânica dessa cartilagem é sua massa reduzida, com pequeno momento de inércia, permitindo oscilações de abdução e adução das pregas vocais em intervalos de menos de 0,1 ms durante a articulação das palavras. As pregas ariepiglóticas inserem-se no ápice das aritenóides com o ligamento vestibular, enquanto as pregas vocais inserem-se na porção medial da base (processo vocal). O processo muscular contém a inserção dos músculos cricoaritenóideos lateral e posterior (PEREIRA, 2006).

Cartilagens corniculadas (de *Santorini*)

Articulam-se com o ápice das aritenóides através de uma sindesmose, e têm forma cônica (CASTRO, 1980; MARTINS, 2003).

Cartilagens cuneiformes (de *Wrisberg*)

Situam-se na prega ariepiglótica, anteriormente às cartilagens corniculadas, e têm forma de bastonetes (MARTINS, 2003).

Músculos, inervação e irrigação da laringe

Identificam-se na laringe dois grupos musculares: extrínsecos e intrínsecos. Os músculos extrínsecos movimentam a laringe como um bloco, exercendo sua ação principalmente por ocasião da deglutição. São presos por uma das extremidades na laringe ou cercanias e podem ser subdivididos em elevadores e abaixadores da laringe PEARSON, (1994). Entre os elevadores têm-se os músculos supra-hióideos (digástrico, estilo-hióideo, milo-hióideo e genio-hióideo) e os que se relacionam com a faringe (palatofaríngeo, estilofaríngeo e os constritores médio e inferior da faringe). Entre os abaixadores da laringe ressaltam em importância os músculos infra-hióideos (esterno-hióideo, esternotireóideo e omo-hióideo) (CASTRO, 1980).

Os intrínsecos inserem-se nas cartilagens da laringe e desempenham sua função no sentido da fonação (e acessoriamente também na deglutição), sendo todos pares (exceto o músculo aritenóideo transverso) (CASTRO, 1980). ROSENFELD et al. (1982) analisaram o músculo vocal, mediante técnicas histoquímicas, e concluíram que ele se assemelha aos demais músculos estriados esqueléticos do corpo humano, apresentando, no entanto, grande especialização para as funções de fonação e proteção das vias aéreas superiores (função de esfíncter), com características morfológicas e metabólicas únicas.

Os nomes dos músculos laríngeos intrínsecos refletem suas origens e inserções, e estão sumarizadas na tabela 1. (HUNGRIA,1995; IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003).

TABELA 5 – MÚSCULOS INTRÍNSECOS DA LARINGE

	CT	TA	CAL	IA	CAP
Posição	Paramediana	Adução	Adução	Adução	Abdução
	++	+++	+++	+++	+++
Nível	Abaixo	Abaixo	Abaixo	0	Acima
	++	++	+++		+++
Comprimento	Alongado	Encurtado	Alongado	Encurtado	Alongado
	+++	+++	++	+	+++
Espessura	Fina	Espessa	Fina	Espessa	Fina
	+++	+++	++	+	+
Borda	Reta	Arredondada	Reta	0	Arredondada
	+++	+++	++		++
Músculo	Endurecido	Endurecido	Endurecido	Frouxo	Endurecido
Corpo	+++	+++	++	+	++
Mucosa	Endurecida	Frouxa	Endurecida	Frouxa	Endurecida
	+++	+++	++	+	++
NLS	+	0	0	0	0
NLR	0	+	+	+	+
ATS	+	+	+	0	0
ATI	0	0	0	+	+

NOTA: 0 = nenhum efeito, + = Efeito discreto, ++ = Efeito moderado, +++ = Efeito Marcante. CT: Músculo Cricotireóideo; TA: Músculo Tireoaritenóideo; CAL: Músculo Cricoaritenóideo Lateral; IA: Músculo Interaritenóideo; CAP: Músculo Cricoaritenóideo Posterior

NLS: Nervo laríngeo superior; NLR: Nervo laríngeo recorrente; ATS: Artéria tireóidea superior; ATI: Artéria tireóidea inferior.

FONTE: Modificado de ABITBOL, 1995

Os músculos adutores e tensores aproximam as pregas vocais e desempenham função fonatória. Os abdutores afastam as pregas vocais e garantem a função respiratória (HUNGRIA, 1995; MARTINS, 2003).

O nervo vago (X par) é o maior dos nervos cranianos, tem sua origem aparente no sulco lateral posterior da medula oblonga, entre o nervo acessório (XI par) e glossofaríngeo (IX par), e, juntamente com esses, atravessa o forame jugular para se exteriorizar do crânio MACHADO, (1993). O termo “vago” vem “daquele que vaga”, em razão de seu longo trajeto através do pescoço, tórax e finalmente abdome (SANTORO; BOHADANA; TSUJI, 2003).

No sentido descendente, o nervo vago emite o nervo laríngeo superior (NLS) e mais inferiormente o nervo laríngeo inferior ou recorrente (NLI). O NLS se subdivide em ramos externo (inerva o músculo CT) e interno (inerva a mucosa laríngea supraglótica) (SANTORO; BOHADANA; TSUJI, 2003). O NLI possui um trajeto diferente em relação aos lados direito e esquerdo, sendo que à esquerda passa pelo arco da aorta, e à direita contorna a artéria

subclávia direita, o que confere uma extensão maior do NLI esquerdo, 9,4 cm em média, em relação ao direito, 5 cm em média (ARANTES, et al., 2004).

A mucosa da laringe é inervada pelo ramo interno do NLS e pelo NLI. O primeiro inerva a mucosa da epiglote até as pregas vocais. O segundo é responsável pela inervação sensitiva inferiormente às pregas vocais. Assim, a rima da glote é a linha divisória entre os territórios de inervação do NLS e do NLI (SANTORO; BOHADANA; TSUJI, 2003).

O ramo interno do NLS é aferente e emite fibras sensitivas da túnica mucosa, que atravessam a membrana tireóidea, sendo responsáveis pela sensibilidade da endolaringe, da epiglote das valéculas, do sulco glossoepiglótico e do dorso das aritenóides. O ramo externo do NLS é eferente, emite fibras motoras que descem junto à face posterior do esterneoiódeo, sendo responsável pela motricidade do músculo CT e do constritor inferior da faringe (SANTORO; BOHADANA; TSUJI, 2003). Existem vários estudos que identificam fibras motoras provenientes do ramo interno dirigindo-se aos músculos aritenóideos (HIRANO, 1988; TSCHIASSNY, 1957).

Mais recentemente, (Nasri et al.1997) demonstraram a existência de fibras motoras para os músculos aritenóideos, também evidenciaram por eletromiografia a existência de fibras motoras do ramo externo para o músculo TA, mais especificamente para o terço anterior da prega vocal, em alguns indivíduos (NASRI; SERCAZ; BEIZAI; KIM; BERKE, 1997).

A laringe é irrigada pelas artérias laríngea superior e inferior, derivadas, respectivamente, da artéria tireóidea superior e inferior. Elas acompanham os NLS (ramo interno) e NLI. As veias acompanham as artérias e drenam para a veia jugular interna (PEARSON, 1994).

A laringe tem uma rica rede linfática drenando para linfonodos contralaterais, sobretudo na supraglote. A exceção fica por conta das pregas vocais, onde praticamente não existem linfáticos (PEARSON, 1994; HUNGRIA, 1995).

Ádito e cavidade da laringe

O ádito é a entrada da laringe, encaminhando o ar da laringo-faringe para a cavidade da mesma. Seu limite superior corresponde à borda da epiglote, as pregas ariepiglóticas e, posteriormente, a prega interaritenóide. O fechamento do ádito protege a via respiratória contra a penetração de partículas alimentares e corpos estranhos (PEREIRA, 2006).

Galeno usou a palavra grega *glottis* (bocal de flauta), derivada de *glossa* (língua) para denominar a laringe. *Vesálio* usou a palavra para designar a região abrangendo as pregas vestibulares, as pregas vocais e os ventrículos. As pregas vocais estendem-se da cartilagem tireóide ao processo vocal da cartilagem aritenóide e incluem o ligamento e o músculo vocal, revestidos pela mucosa. A parte mais anterior da rima da glote, localizada entre as pregas vocais, é sua parte intermembranosa, enquanto a porção que se situa entre os processos vocais é a parte intercartilaginosa (PEREIRA, 2006).

Compartimentos laríngeos

A cavidade laríngea é dividida em três andares (figura 1) (HUNGRIA, 1995):

Andar supraglótico

Vai do orifício superior da laringe até as pregas vocais. A superfície interna do andar supraglótico (vestíbulo) apresenta, nas suas paredes laterais, duas pregas mucosas denominadas falsas cordas vocais, que delimitam com as cordas verdadeiras um espaço, o ventrículo laríngeo ou de *Morgani*.

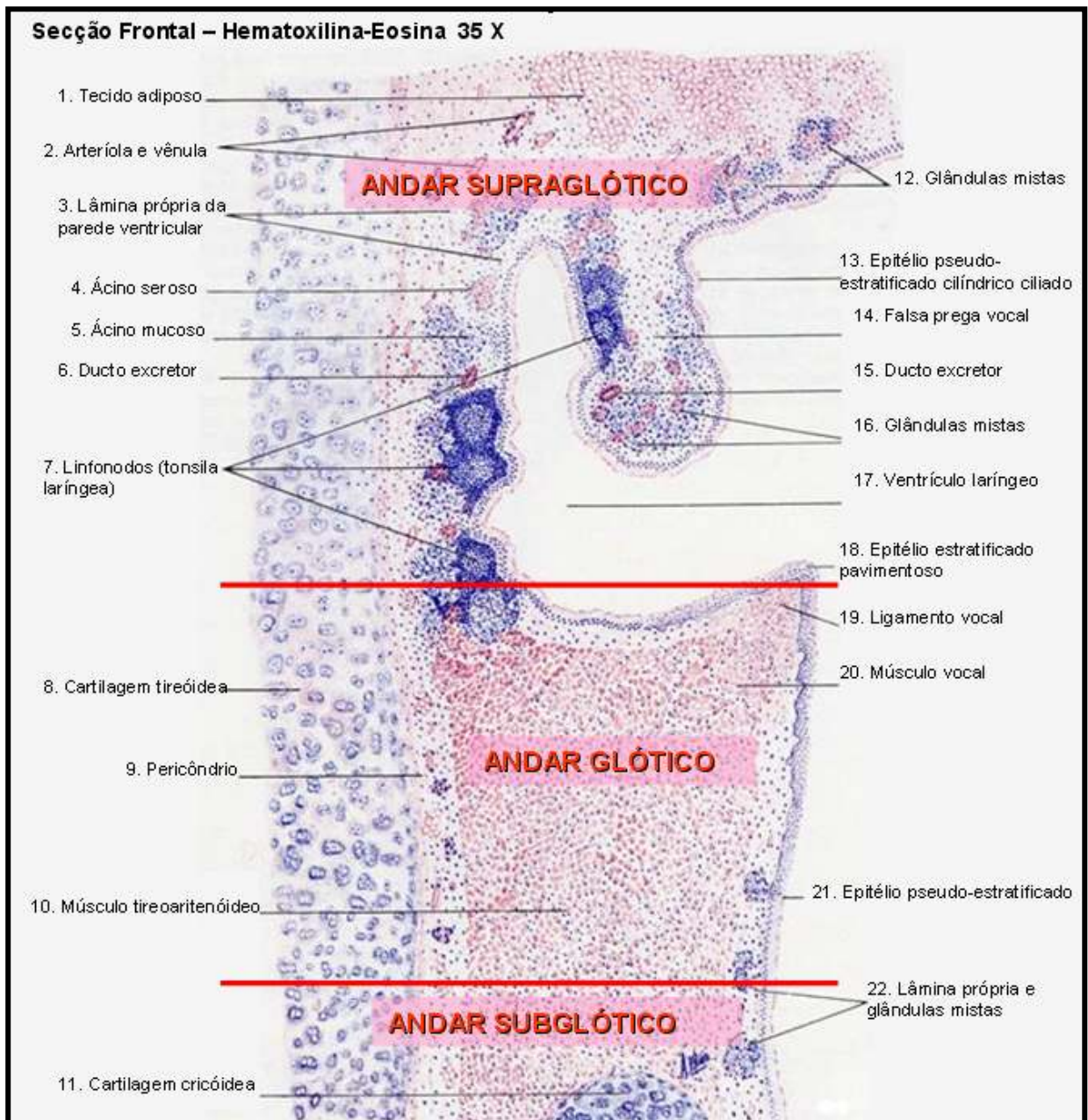
Andar glótico

Constituído pelas pregas vocais que limitam entre si a rima da glote. É a porção da laringe com menor área de secção transversa. A rima da glote está, aproximadamente, ao nível do ponto médio da cartilagem tireóide. Uma membrana fibroelástica denominada cone elástico, se estende da prega vocal à superfície interna da cricóide.

Andar subglótico ou infra-glótico

Vai desde as pregas vocais até um plano que passa pela borda inferior da cricóide.

FIGURA 21 – SECÇÃO FRONTAL DE CORTE LARÍNGEO, DEMONSTRANDO COMPARTIMENTOS LARÍNGEOS E ESTRUTURAS HISTOLÓGICAS LARÍNGEAS



FONTE: Modificado de DI FIORE; MANCINI; DE ROBERTIS, 1974

ANEXO III

HISTOLOGIA E ULTRA ESTRUTURA DA PREGA VOCAL

Os seres humanos podem emitir sons dentro de ampla faixa de frequência e intensidade, com grande variedade de qualidades tonais. Para isso, utilizam suas pregas vocais, que possuem características histológicas e estruturais muito bem adaptadas à função de fonação (MELO, 2004).

Anatomicamente, a prega vocal é definida como uma estrutura par, em forma de prega, localizada bilateralmente entre a comissura anterior situada na face posterior da cartilagem tireóidea, e o processo vocal da cartilagem aritenóidea constituída por uma mucosa, formada por epitélio e lâmina própria, e pela parte medial do músculo TA, denominada músculo vocal (MELO, 2004).

Do ponto de vista fonatório a noção mais importante da histologia da PV é que ela se constitui de estrutura com múltiplas camadas, que têm propriedades mecânicas diferentes. A PV não funciona como um vibrador de estrutura uniforme, como a corda de um instrumento musical, mas sim como um vibrador de camadas diferentes do ponto de vista ultra-estrutural e mecânico. Esta estrutura laminar é que permita a ampla gama de ajustes de frequência e intensidade da voz humana (MELO, 2004).

Do ponto de vista ultra-estrutural, a prega vocal é composta por cinco camadas: epitélio de revestimento; lâmina própria, com camada superficial, intermediária e profunda; e músculo vocal. O epitélio e a camada superficial da lâmina própria apresentam uma espessura média de 0,3mm. A camada intermediária e profunda juntas tem a espessura de 0,8mm, o que confere uma espessura total, de 1,1mm (MELO, 2004).

As pregas vocais são estruturas vibráteis que se localizam no andar glótico da laringe, sendo compostas, fundamentalmente, por mucosa e músculo. A mucosa, por sua vez, é constituída por epitélio e pela camada superficial da lâmina própria (LP) (NEVES; NETO; PONTES, 2004). A camada intermediária e profunda da LP constitui a submucosa das pregas vocais (NEVES; NETO; PONTES, 2004).

O epitélio de revestimento do bordo livre da PV é estratificado pavimentoso não queratinizado, enquanto o epitélio próximo ao ventrículo laríngeo ou à subglote é do tipo pseudo-estratificado ciliado, com uma região de transição entre eles (MARTINS, 2003; MELO, 2004).

Uma importante estrutura do epitélio que faz transição com a camada superficial da LP, estando em íntimo contato com esta, é a membrana basal (MB). A MB apresenta pequenos sulcos em toda sua extensão e com isso promove acentuado aumento da área de apoio para as células teciduais (PEREIRA, 2006). A MB é constituída por fina camada de matriz extracelular especializada, sintetizada pelas células epiteliais e fibroblastos da LP. É uma estrutura importante para a vibração da mucosa, pois, assim como a LP, promove elasticidade e, ao mesmo tempo, resistência às pregas vocais (NEVES; NETO; PONTES, 2004). A MB normal não é observada com detalhes por meio da técnica da hematoxilina-eosina, rotineiramente utilizada na microscopia óptica. Microscopia eletrônica é o melhor meio para estudo desta estrutura. Ultra-estruturalmente a MB consiste de três camadas que são denominadas, da superfície para profundidade, lâmina lúcida (ou *pars rara*), lâmina densa (ou lâmina basal) e lâmina fibro-reticular (ou sub-lâmina densa). Sua principal função é a adesão celular, que é realizada por meio das fibras de ancoragem (MELO et al., 2004). Estudos demonstram que as fibras de ancoragem conectam a lâmina densa com a camada superficial da LP. As fibras de colágeno tipo III da camada superficial da LP passam através dos "elos" formados pelas fibras de ancoragem, formando uma "corrente" que adere firmemente o epitélio da PV à LP. (MELO et al., 2004).

Em relação à sua composição química, técnicas de imunoistoquímica demonstraram que a MB é composta, principalmente, por três tipos de macromoléculas: colágenos tipo IV e VII, laminina e proteoglicano heparan sulfato. O colágeno tipo IV é o responsável pela força e elasticidade da MB. O tipo VII é o principal componente das fibras de ancoragem. A laminina e o proteoglicano heparan sulfato estão implicados na adesão celular e no controle da passagem de substâncias através da MB. Fibronectina e entactina são glicoproteínas também encontradas na MB, porém não se sabe ao certo sua função (NEVES; NETO; PONTES, 2004; MELO et al, (2004).

A LP é a estrutura mais importante da PV, pois é a que mais vibra durante a fonação (MELO et al., 2003). Tem papel fundamental na viscosidade, contratilidade e formação de onda mucosa, sendo que seu bom funcionamento é determinante para o início e manutenção da vibração sustentada pelo fenômeno de *Bernoulli* (VARELA; GRELLET, 2005).

A LP é composta por células (fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos) e principalmente, por tecido extracelular: fibras elásticas, colágenas (tipo III), elastina, ácido hialurônico, fibronectina e vasos sangüíneos, podendo ser dividida, de acordo com a distribuição dos componentes fibrosos, em três camadas: superficial, intermediária e profunda. A camada superficial, ou espaço de *Reinke*, apresenta poucos componentes fibrosos

(fibras elásticas e colágenas), sendo composta, fundamentalmente, por substância fundamental amorfa. A camada intermediária é composta por fibras elásticas dispostas simetricamente, enquanto a camada profunda é composta principalmente por fibras colágenas maduras, as quais ajudam na sustentação (GARRETT; COLEMAN; REINISCH, 2000; MARTINS, 2003; NEVES; NETO; PONTES, 2004; MELO, 2004).

A matriz extracelular da camada superficial da LP é composta por fibras protéicas e por proteínas intersticiais. Em humanos, as fibras protéicas distribuem-se paralelamente à borda livre. Dentre elas, as fibras colágenas são as responsáveis pela manutenção da arquitetura local, regulação osmótica e viscosidade. As fibras colágenas tipo I são maiores, melhor visualizadas e mais rígidas. Já as do tipo III são mais finas e flexíveis (GARRETT; COLEMAN; REINISCH, 2000; VARELA; GRELLET, 2005).

A porção vibratória, ou parte intermembranácea da glote, apresenta as três camadas da LP conectadas ao rígido esqueleto laríngeo por zonas de transição altamente diferenciadas na extremidade anterior e posterior da prega vocal: as máculas flavas anteriores e posteriores. As máculas flavas são continuações da camada intermediária da LP e parecem funcionar como amortecedores nas inserções da PV, levando a mudança gradual na resistência da estrutura das cartilagens rígidas para a mucosa flexível. Anteriormente à mácula flava anterior, observa-se uma massa de fibras colágenas, o tendão da comissura anterior, que se insere na cartilagem aritenóidea e se continua posteriormente com a camada profunda da LP (MELO, 2004).

Não se observam glândulas nem vasos sangüíneos calibrosos próximos ao bordo livre da prega vocal. Na camada superficial da LP se observam apenas capilares, enquanto na camada intermediária e profunda encontram-se arteríolas, vênulas, pequenas artérias e veias. Os vasos sangüíneos da mucosa, no bordo livre, originam-se das regiões anterior e posterior da parte intermembranácea da glote, e a partir daí correm paralelamente ao bordo livre da prega vocal. Alguns poucos vasos penetram na mucosa diretamente do músculo subjacente, sendo todos muito pequenos. Este arranjo vascular ajuda a manter a vibração do tecido (HIRANO; 1993; MELO, 2004).

As camadas intermediárias e profundas da LP das pregas vocais constituem o ligamento vocal, o qual corresponde a zona de transição que funcionaria como acoplador entre a mucosa superficial e o músculo vocal (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003; MELO, 2004).

O músculo vocal (músculo TA) é a base da prega vocal. Ele possui inserção anterior no ângulo da cartilagem tireóidea e posterior na apófise vocal. Possui dois feixes de fibras, um interno, que se insere no processo vocal, com fibras de atividade lenta e de ação na fonação, e

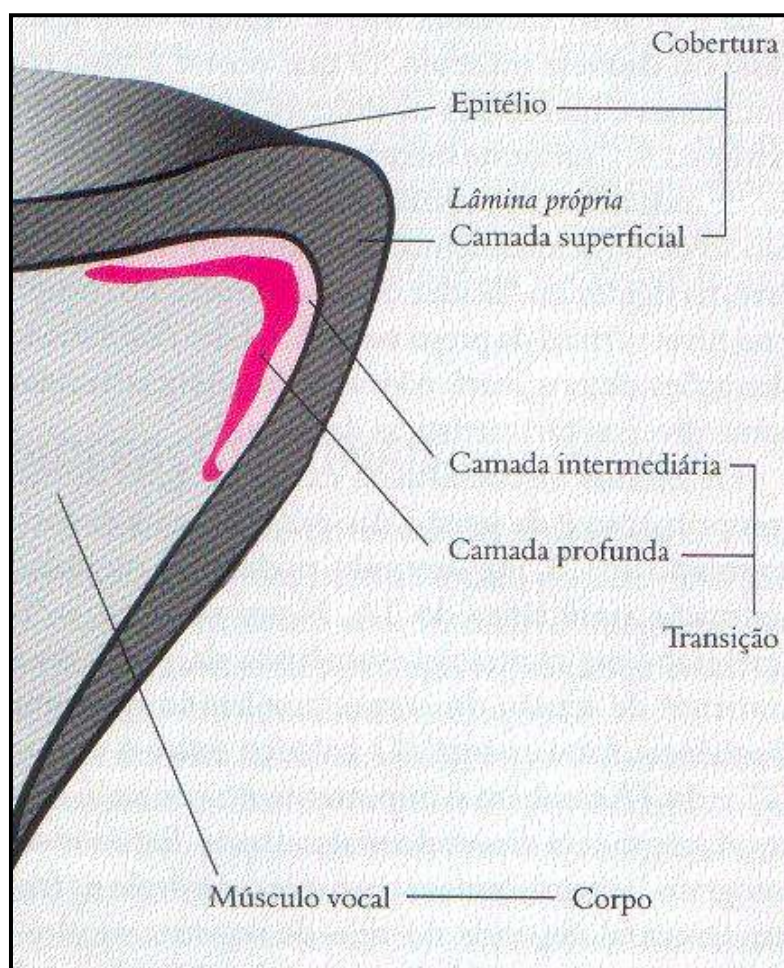
outro externo, que se insere no processo muscular, relacionado ao processo de adução. Apresenta mitocôndrias, as quais são responsáveis pelo suprimento energético mediante a formação de adenosina trifosfato, com o dobro de tamanho em relação às mitocôndrias encontradas na musculatura do bíceps (ABITBOL, 1995).

HIRANO (1974 e 1993), baseado na análise da organização estrutural das pregas vocais, as quais mostraram variação gradativa da rigidez de cada camada, sendo mais maleáveis na superfície e tornando-se cada vez mais rígidas em direção ao músculo vocal, introduziu o conceito "cobertura-corpo", segundo o qual as cinco camadas histológicas da prega vocal são agrupadas conforme suas diferentes propriedades mecânicas, podendo, então serem constituídos três compartimentos (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003; MELO, 2004) (figura 22):

1. Cobertura: epitélio e camada superficial da lâmina própria
2. Transição: camada intermediária e camada profunda da lâmina própria.
3. Corpo vocal: músculo vocal.

Outro elemento importante na organização estrutural da prega vocal é a camada de muco que recobre a mucosa. A presença de um filme mucoso de composição e viscosidade adequadas, que é continuamente deslocado sobre o epitélio, mantém as pregas vocais úmidas e lubrificadas, possibilitando a vibração. Não existem glândulas nas pregas vocais, sendo esse muco produzido pelas glândulas do ventrículo e bandas ventriculares (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003).

FIGURA 22 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PREGA VOCAL. TEORIA DA “COBERTURA E CORPO”



FONTE: IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003

ANEXO IV

FUNÇÃO FONATÓRIA DA LARINGE

A produção da fala envolve basicamente três processos: a produção do som glótico pela vibração das pregas vocais, seguida da ressonância e articulação deste som, que ocorrem no trato vocal supraglótico. Desta forma não só a laringe, mas todo o sistema respiratório e também o trato vocal são importantes na produção da fala (PEARSON, 1994).

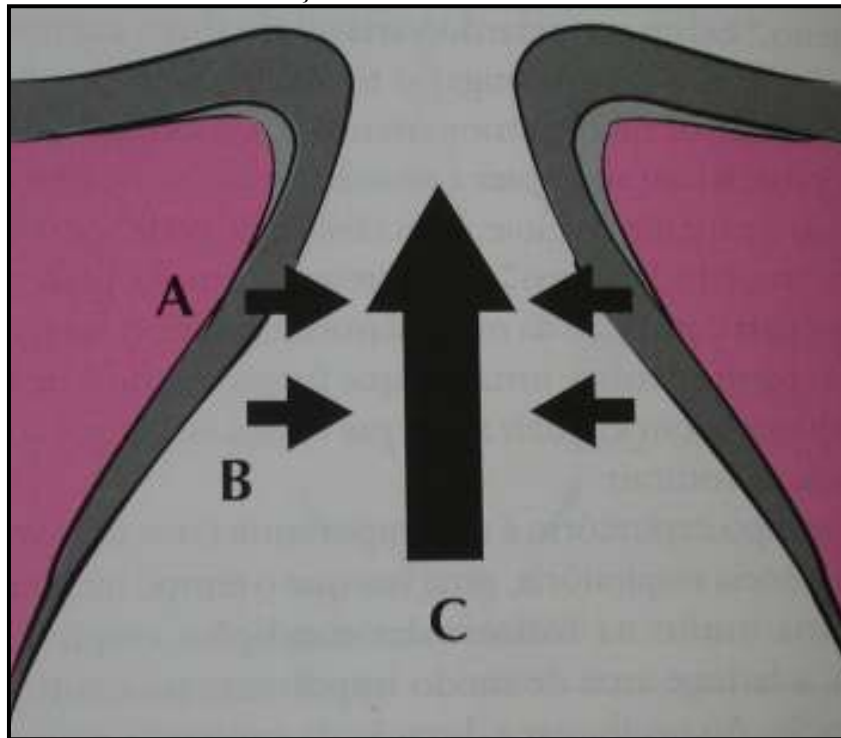
Do ponto de vista vocal, a laringe poderia ser considerada como fonte de transdução de energia aerodinâmica em acústica (KITZING, 1985).

A teoria aceita para explicar o fenômeno vibratório é a teoria mioelástica-aerodinâmica da produção vocal. Na descrição de Van den berg as pregas vocais são ativadas por uma corrente de ar vinda dos pulmões e traquéia, de forma que a frequência de vibração parece depender da massa efetiva e tensão de pregas vocais, que são reguladas, nos mais refinados detalhes, pela inervação sustentada dos músculos intrínsecos e extrínsecos da laringe e pela atividade de órgãos inferiores e dos ressoadores associados (VAN DEN BERG; ZANTEMA; DOORNENBAL, 1957).

Segundo essa teoria, sob controle neuromuscular, as pregas vocais são aduzidas na linha média, assumindo a postura fonatória, constituindo o componente mioelástico. A atividade neuromuscular participa ainda do controle da massa, tensão e elasticidade das pregas vocais, fatores importantes para manutenção e modulação da vibração (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003).

A partir daí, o fenômeno vibratório ocorre basicamente por forças aerodinâmicas relacionadas ao fluxo aéreo expiratório. Uma vez que as pregas vocais estão em posição fonatória, o fluxo expiratório encontra resistência no nível glótico (resistência glótica), gerando pressão subglótica crescente. Em determinado momento, essa pressão é suficientemente alta para vencer a resistência glótica e deslocar as pregas vocais lateralmente, promovendo sua abertura gradual numa posição de inferior para superior (figura 23) (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003).

FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS FORÇAS QUE DETERMINAM A VIBRAÇÃO DAS PREGAS VOCAIS



NOTA: a força de abertura é representada pela pressão subglótica (C), e as forças de fechamento são representadas pela elasticidade da prega vocal (A) e pelo efeito de *Bernoulli* (B)

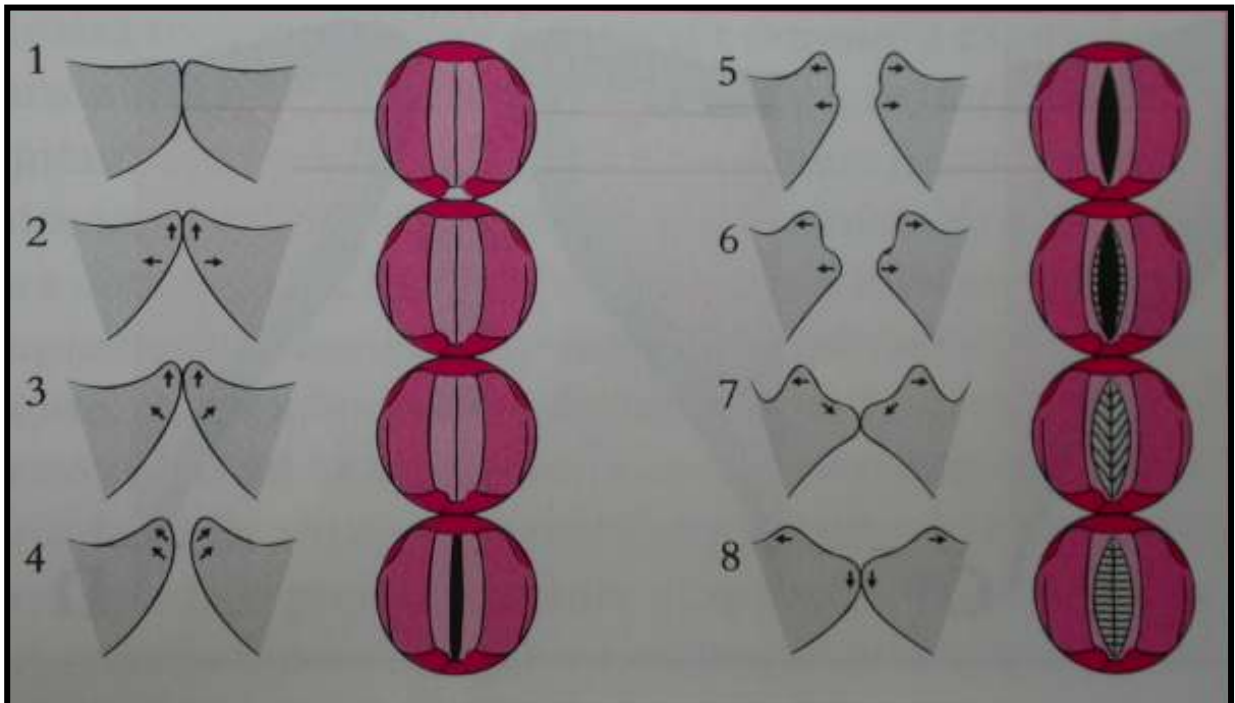
FONTE: IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003

Uma vez que a glote é aberta pela passagem do ar, diversas forças interagem imediatamente para promover o fechamento glótico. Existem duas forças de fechamento principais: a elasticidade das pregas vocais e o efeito de *Bernoulli*. Alguns autores consideram a redução da pressão subglótica decorrentes do escape de ar pela abertura glótica, como uma força de fechamento. A elasticidade é regulada pela atividade da musculatura intrínseca das pregas vocais, que controla o grau de tensão, massa e estiramento das pregas vocais. O efeito de *Bernoulli* estabelece que o ar escapando através da glote estreita gera pressão negativa nesse nível e torna possível a criação de um vácuo parcial entre as pregas vocais, que propicia seu contato por uma força de sucção, permitindo o início da sua vibração. O mecanismo básico de produção da voz depende dessa relação equilibrada das forças exercidas pelos músculos intrínsecos da laringe e corrente aérea expiratória (VAN DEN BERG, 1957; TITZE, 1980; PRATER; SWIFT, 1986). Essa sucção auxilia na aproximação das pregas vocais. Finalmente, com o escape de ar pela glote, a pressão subglótica cai, reduzindo a força que mantém as pregas vocais separadas. Pelo efeito conjunto desses três fatores, as pregas vocais

são aproximadas. Esse ciclo de vibração é chamado ciclo glótico ou vibratório (figura 24) (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003).

Observações das pregas vocais por estroboscopia evidenciam a importância do efeito de Bernoulli no fechamento glótico. Esses estudos determinam que o ciclo vibratório consiste de três fases: a fase de abertura, de fechamento e a fase fechada. A prega vocal possui uma dimensão vertical no plano coronal, que se fecha em diferentes momentos no sentido súpero-inferior. A este fenômeno se dá o nome de diferença de fase vertical (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003). TITZE, (1980) descreveu, com detalhes, a natureza dos movimentos verticais de pregas vocais e (KITZING, 1985) reforçou a teoria, salientando que há diferença de fase entre as bordas superior e inferior. O último autor relacionou os princípios de vibração à proposta de existência de dois movimentos vibratórios básicos de pregas vocais, os transversos do corpo muscular e verticais da onda viajante da cobertura mucosa (KITZING, 1985).

FIGURA 24 – CICLO VIBRATÓRIO NORMAL



NOTA: por atuação da pressão subglótica, o lábio inferior começa a se afastar (2 e 3), ainda durante a fase fechada (1 a 3). Quando a glote se abre (4), tanto o lábio inferior como superior estão se afastando. Contudo, antes que o lábio superior atinja sua abertura máxima (7), o lábio inferior, que já atingiu (5), começa a se fechar, por atuação da elasticidade da prega vocal e do efeito de *Bernoulli*

FONTE: IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003

A cobertura é a região que mais vibra durante a fonação, por ser uma estrutura frouxa e flexível. Devido á sua maior maleabilidade quando comparada às estruturas mais internas, esse compartimento oscila sobre o corpo mais rígido, levando à formação de movimentos muco-ondulatórios, vistos à laringostroboscopia. Quando a estrutura da prega vocal é violada, sobretudo em suas camadas mais profundas, essa organização estrutural é substituída por fibrose, e as propriedades viscoelásticas vibratórias das pregas vocais, ao menos na região lesada, são perdidas. Como consequência, a progressão das ondas mucosas fica prejudicada e a qualidade vocal se deteriora (IMAMURA; TSUJI; SENNES, 2003)

ANEXO V

PRINCÍPIO DA IMUNOLOGIA

Anticorpo é uma molécula que tem a propriedade de combinar-se especificamente a uma segunda molécula, chamada de antígeno. Além disso, a produção de um anticorpo em um animal é induzida especificamente pela presença de um antígeno e esta é a base da resposta imunológica LEONG; WRIGHT, (1997); SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994). Os anticorpos são moléculas de imunoglobulinas que consistem de duas unidades básicas: um par de cadeias leves (K ou A) e um par de cadeias pesadas (α , γ , μ , δ ou E) ligadas entre si por ligações de dissulfídios. O sítio de ligação do antígeno na molécula de imunoglobulina é chamado de idiotopo e é formado pelas terminações "N" de uma cadeia leve e de uma cadeia pesada.

A variação na composição dos aminoácidos destas regiões é o que fornece a variabilidade e a especificidade das moléculas de imunoglobulinas SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994). Antígeno é qualquer tipo de molécula suficientemente complexa que possua uma estrutura tridimensional relativamente rígida e que seja estranha ao organismo no qual é introduzido. Um antígeno pode ter uma ou mais regiões que induzam a formação de anticorpos. Estas regiões são chamadas de epítomos e são elas que se ligam aos idiotopos dos anticorpos SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994).

As moléculas de imunoglobulinas são suficientemente complexas para elas mesmas servirem de antígenos quando introduzidas em um organismo. A imunoglobulina pode servir tanto de anticorpo, ligando-se especificamente a antígenos tissulares ou celulares, como antígeno, sendo sítio de ligação para outros anticorpos. Nas reações imuno-histoquímicas, chama-se de anticorpo primário aquele que se liga diretamente ao antígeno pesquisado, anticorpo secundário ao anticorpo que se liga ao anticorpo primário, e assim sucessivamente. Estas formas de ligação entre anticorpos e antígenos são amplamente exploradas pelas técnicas imuno-histológicas, e elas são os princípios da grande especificidade e versatilidade do método SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994).

Além da especificidade das ligações, há grande afinidade entre as moléculas de anticorpos e antígenos, fazendo com que as ligações sejam estáveis e duradouras. Tanta especificidade como afinidade permitem que os anticorpos sejam utilizados como sondas para detecção de antígenos localizados em tecidos ou preparações celulares. Contudo, os

anticorpos não podem ser visualizados por microscopia óptica ou eletrônica a não ser que estejam marcados de alguma maneira que permita a sua visualização. Existem inúmeras maneiras de se marcar o anticorpo para esta finalidade. Uma delas é a marcação de anticorpos com compostos fluorescentes, como explicados anteriormente. Outra forma é a utilização de ouro ou mercúrio para marcar os anticorpos e visualizá-los com a utilização de microscopia eletrônica. A terceira e mais importante forma é a marcação de anticorpos com enzimas, que na presença de um sistema de substratos adequado, induz a formação de um produto colorido, detectável pelo olho humano ao microscópio óptico SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994).

Anticorpos

Existem dois tipos de anticorpos utilizados nas técnicas imuno-histoquímicas, os policlonais e os monoclonais SWANSON, (1988), TAYLOR; COTE, (1994).

Anticorpos policlonais são aqueles obtidos através da purificação do soro de um coelho previamente sensibilizado por um antígeno que contém diversos epitopos. Diversos clones de plasmócitos produzem diferentes anticorpos contra vários epitopos de um mesmo antígeno. Conseqüentemente, os anticorpos presentes no soro são imunoquimicamente desiguais; eles reagem com diversos epitopos do antígeno contra os quais foram produzidos. Os anticorpos policlonais, de modo geral, são bastante sensíveis mas, por outro lado, menos específicos SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994).

Anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de linfócitos B. O animal utilizado geralmente é um camundongo previamente sensibilizado por um antígeno. Linfócitos B do baço deste animal são fusionados a uma cultura de células de mieloma animal geneticamente manipuladas e que perderam a capacidade de produzir as suas próprias imunoglobulinas. Após a hibridização, as células neoplásicas passam a produzir apenas um anticorpo contra um epítipo do antígeno, de maneira clonal. Utilizando técnicas complexas e laboriosas, os clones celulares são separados, bem como os anticorpos produzidos por cada clone. Estes anticorpos são imunoquimicamente idênticos entre si e reagem contra um epítipo específico do antígeno contra o qual eles foram produzidos. Apesar dos anticorpos monoclonais serem relativamente menos sensíveis, eles são altamente específicos SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994).

Métodos imunoenzimáticos

Os métodos imunoenzimáticos, ou "técnicas imunoistoquímicas" como são mais

conhecidos na prática de patologia cirúrgica, baseiam-se na ligação de uma enzima ativa a um anticorpo específico, utilizando-se a atividade enzimática da enzima para produzir mudança de coloração de um substrato nos locais onde o complexo anticorpo-enzima está localizado no tecido. Com a produção de uma cor a localização da ligação do anticorpo ao antígeno tecidual ou celular pesquisado pode ser visível SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994); ALVES; BACCHI; VASSALLO, (1999); BOENISH, (2001).

Existe grande número de técnicas imunoistoquímicas SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994), ALVES; BACCHI; VASSALLO, (1999); BOENISH, (2001).

Isto se deve a variações quanto ao número de anticorpos aplicados nos métodos, aos tipos de enzimas utilizadas e aos tipos de substâncias não-imunológicas introduzidas nas reações. Quanto ao número de anticorpos aplicados nos métodos, eles podem ser métodos diretos ou indiretos.

Método direto é mais simples de todos, no qual o complexo anticorpo-enzima primário é introduzido diretamente ao tecido ou preparado citológico em estudo. Com a adição do substrato para a enzima, os locais aos quais os conjugados se ligaram são revelados. Apesar de serem extremamente rápidos, estes métodos são pouco específicos e têm difícil controle da qualidade das reações TAYLOR; COTE, (1994).

No método indireto o tecido ou preparado citológico em estudo é incubado com um anticorpo primário, é lavado, e em seguida é aplicado um conjugado anticorpo-enzima, cujo anticorpo tem especificidade contra o anticorpo primário. Todos os sistemas de detecção mais comumente aplicados são baseados em variações dos métodos indiretos, como será comentado adiante TAYLOR; COTE, (1994).

Os métodos imunoenzimáticos mais comumente utilizadas são: método de imunocomplexo do tipo peroxidase-antiperoxidase e técnica imunoenzimática avidina-biotina SWANSON, (1988); TAYLOR; COTE, (1994); ALVES; BACCHI; VASSALLO, (1999); BOENISH, (2001).

Método peroxidase-antiperoxidase (PAP)

Este método consiste na aplicação de um anticorpo secundário que se liga tanto ao anticorpo primário como a um imunocomplexo do tipo enzima-anticorpo, no caso, peroxidase-antiperoxidase. O segundo anticorpo age como uma ponte entre o primeiro anticorpo e o complexo peroxidase-antiperoxidase; são utilizadas três moléculas de antígeno (peroxidase) que se liga a duas moléculas de anticorpo TAYLOR; COTE, (1994).

Método avidina-biotina-peroxidase (ABC)

A avidina é uma glicoproteína básica com quatro sítios de ligação com alta afinidade pela biotina, e qualquer uma das duas pode ser conjugada à enzima peroxidase para serem utilizadas em reações imunoistoquímicas. Um anticorpo biotinilado (isto é, conjugado com biotina) serve como ponte entre o anticorpo primário (aquele que se liga diretamente ao antígeno) e o complexo enzimático avidina-biotina-peroxidase. Neste caso, usufrui-se da intensa afinidade da biotina pela avidina, que é muito mais forte que a afinidade do anticorpo pelo antígeno e que produz uma reação praticamente irreversível, para que o anticorpo marcado ligue-se com alta sensibilidade ao antígeno correspondente TAYLOR; COTE, (1994).

Outros métodos imunoenzimáticos

Método fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP) - tecnicamente, este método é muito parecido ao peroxidase-antiperoxidase; a diferença é no complexo enzimático empregado. Este método é particularmente útil quando se trata de tecidos ou preparados citológicos com alta concentração de peroxidase endógena (comentada adiante), como medula óssea e tecido linfóide. Ele também é usado quando se realiza dupla marcação imunoenzimática num mesmo tecido ou preparado citológico. Um antígeno é pesquisado com o método peroxidase-antiperoxidase que usa um substrato de coloração marrom, e o outro antígeno são pesquisados com o método fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina que usa um substrato de cor vermelha. Outra diferença em relação ao método peroxidase-antiperoxidase é que no método fosfatase alcalina antifosfatase alcalina são utilizados duas moléculas de antígeno (fosfatase alcalina) e um anticorpo. Este tipo de ligação é muito semelhante ao normalmente encontrado em anticorpos bivalentes e faz com que os complexos fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina possam ser arquivados por prolongados períodos TAYLOR; COTE, (1994).

Método da proteína A faz parte da parede celular da maioria das cepas de *Staphylococcus aureus*. Esta proteína tem alta afinidade por imunoglobulinas de diversas espécies mamárias, como o homem, coelho e camundongo, e isto permite que a proteína A seja utilizada de diversas maneiras nas técnicas imunoenzimáticas. Uma delas é introduzir um conjugado da proteína A com peroxidase ou fosfatase alcalina sobre um tecido ou preparado citológico em estudo após a aplicação do anticorpo primário, que geralmente é uma imunoglobulina de coelho ou camundongo TAYLOR; COTE, (1994).

Método estreptavidina-biotina - neste caso, a avidina é substituída pela estreptavidina,

glicoproteína análoga à avidina que é isolada da bactéria *Streptomyces avidinii*. Como a avidina, a estreptavidina tem alta afinidade pela biotina, e as reações imunoenzimáticas que usam esta proteína têm grande sensibilidade e especificidade na detecção dos sítios de ligação dos anticorpos, com menor coloração inespecífica, quando comparado ao método avidina-biotina. Tanto a enzima peroxidase como a fosfatase alcalina podem ser usadas como conjugados TAYLOR; COTE, (1994).