

PAULO ANTONIO MONTEIRO CAMARGO

**DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DE SINÉQUIAS NA PREGA
VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA COM
LASER DE CO₂ :EFEITO DA MITOMICINA-C TÓPICA.**

CURITIBA

2004

PAULO ANTONIO MONTEIRO CAMARGO

**DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DE SINÉQUIAS NA PREGA
VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA COM
LASER DE CO₂: EFEITO DA MITOMICINA-C TÓPICA.**

**Dissertação 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
Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Repka

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2004

Paulo Antonio Monteiro Camargo

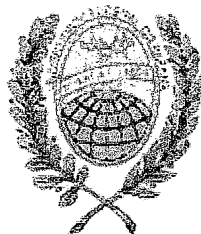
Deposição de colágeno e formação de sinéquias na prega vocal de suínos após exérese de fragmento de mucosa com laser de CO₂: efeito da Mitomicina-C tópica - Curitiba 2004.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos.

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

1. Experimental, Mitomicina-C. 2. Cicatrização. Prega vocal. Suínos. Laser CO₂

I. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

DECLARAÇÃO

Declaramos, que o Doutor **PAULO ANTONIO MONTEIRO CAMARGO** completou os requisitos necessários para obtenção do Grau Acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica, ofertado pela Universidade Federal do Paraná.

Para obtê-los, concluiu os créditos didáticos previstos no Regimento do Programa e apresentou sua dissertação sob título: "**DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DE SINÉQUIAS NA PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA COM LASER DE CO₂: EFEITO DA MITOMICINA-C TÓPICA**", em tempo hábil.

A Dissertação foi defendida nesta data e aprovada pela Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores João Luiz Garcia de Faria (Membro) e Antonio Celso Nunes Nassif Filho (Membro) e Marcos Mocellin (Presidente).

E, por ser verdade, firmo a presente.

Curitiba, 22 de dezembro de 2004

Jorge Eduardo F. Matias

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR

Dedico esta dissertação 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 dissertação.

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, co-orientador, pelo apoio e por dar soluções para minhas dúvidas, principalmente pelas horas dispensadas em várias etapas na realização desta pesquisa.

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

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

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

Ao Prof. Dr. AMADEU BONA FILHO, médico veterinário, diretor do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda no planejamento e preparo dos animais e na realização da parte experimental em suas instalações para realização de parte deste estudo.

Ao Dr. ROGÉRIO MOREIRA, médico veterinário, especialista em anestesiologia em animais de médio e grande portes, os nossos agradecimentos pelo planejamento, preparo e realização do experimento.

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 Prof^a. Dra. LÚCIA NORONHA 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 Dr. VINÍCIUS RIBAS FONSECA, médico integrante do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia Buco-Maxilo-Facial do Hospital Angelina Caron pelo seu entusiasmo, 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, Professor do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, o nosso eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO AUGUSTO FLEISCHFRESSER, Professor Adjunto do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, Professor de Matemática Financeira e Estatística da Faculdade UNIBRASIL, os nossos sinceros agradecimentos pela sua disponibilidade e horas dispensadas durante a elaboração desta tese.

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

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

“ *Os sonhos não envelhecem* “

Mario Borges

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ANATOMIA DA PREGA VOCAL.....	5
2.2 PROCESSO CICATRICAL.....	6
2.3 LASER NA CIRURGIA DA LARINGE.....	7
2.4 INTERAÇÃO LASER-TECIDO.....	9
2.5 IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	9
2.6 COLORAÇÃO DE <i>PICROSIRIUS RED</i>	9
2.7 INFLUÊNCIA DA MTC TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO.....	11
2.7.1 Estudos em humanos.....	11
2.7.2 Estudos em ratos.....	12
2.7.3 Estudos em cães.....	12
2.7.4 Estudos em suínos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO.....	15
3.2 AMOSTRA.....	16
3.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS.....	17
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	18
3.5 ATO CIRÚRGICO.....	18
3.5.1 Posicionamento.....	18
3.5.2 Introdução do laringoscópio.....	19
3.5.3 Microscopia das pregas vocais.....	20
3.5.4 Exérese de fragmento de mucosa na prega vocal esquerda com laser de CO ₂	22
3.5.5 Utilização da MTC tópica no grupo experimento.....	25
3.6 PÓS-OPERATÓRIO.....	26

3.7 DADOS AVALIADOS.....	26
3.7.1 Evolução clínica no pós-operatório.....	26
3.8 EUTANÁSIA E COLETA DA LARINGE.....	26
3.9 COLETA DE AMOSTRA PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	27
3.10 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31
3.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA MORFOMÉTRICA.....	31
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 PRESENÇA DE SINÉQUIAS.....	37
4.2 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO.....	37
4.3 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO TOTAL ENTRE OS GRUPOS SUBMETIDOS A EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA COM LASER DE CO ₂ COM E SEM APLICAÇÃO DE MTC TÓPICA.....	37
4.4 ASPECTO HISTOLÓGICO.....	39
5 DISCUSSÃO.....	42
5.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL	43
5.2 USO DA MTC TÓPICA NAS PREGAS VOCAIS.....	43
5.3 MICROCIRURGIA A LASER DE CO ₂	44
5.4 MÉTODO DE COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO.....	45
5.5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
6 CONCLUSÕES.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DAS POCILGAS.....	15
FIGURA 2 – SUÍNOS <i>LARGER WHITE</i> UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	17
FIGURA 3 – POSIÇÃO CIRÚRGICA.....	19
FIGURA 4 – INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO.....	20
FIGURA 5 – MICROSCÓPIO CIRÚRGICO.....	21
FIGURA 6 – EQUIPAMENTO DE CAPTAÇÃO E REPRODUÇÃO DE IMAGEM	22
FIGURA 7 – PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE PREGA VOCAL ESQUERDA	23
FIGURA 8 – INÍCIO DA EXÉRESE A LASER DE CO ₂	24
FIGURA 9 – ASPECTO PÓS EXÉRESE A LASER DE CO ₂	25
FIGURA 10 – APLICAÇÃO DA MTC TÓPICA.....	26
FIGURA 11 – LARINGE SUÍNA RETIRADA EM BLOCO, DA BASE DA LÍNGUA AO QUARTO ANEL TRAQUEAL.....	28
FIGURA 12 – INCISÃO LONGITUDINAL ANTERIOR.....	28
FIGURA 13 – OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE.....	29
FIGURA 14 – INCISÃO DA CARTILAGEM TIREÓIDE.....	30
FIGURA 15 – EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM.....	32
FIGURA 16 – DIGITALIZAÇÃO DE LÂMINA CORADA PELO <i>PICROSIRIUS</i> <i>RED</i> ANTES DA POLARIZAÇÃO.....	33
FIGURA 17 – LÂMINA CORADA PELA SOLUÇÃO DE <i>PICROSIRIUS RED</i> APÓS POLARIZAÇÃO.....	34
FIGURA 18 – TRANSPORTE DOS DADOS DA SOMATÓRIA DA ÁREA POLARIZADA PARA A PLANILHA DO EXCEL.....	35
FIGURA 19 – LÂMINA CORADA PELO <i>PICROSIRIUS RED</i> ANTES DA POLARIZAÇÃO DO COLÁGENO NO GRUPO CONTROLE CONTROLE.....	39
FIGURA 20 – LÂMINA CORADA PELO <i>PICROSIRIUS RED</i> DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO DA LÂMINA PRÓPRIA ANTES DA POLARIZAÇÃO.....	40
FIGURA 21 – LÂMINA CORADA PELO <i>PICROSIRIUS RED</i> DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS A POLARIZAÇÃO.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂: dióxido de carbono

ECG: eletrocardiograma

et al. : e outros (as)

G: grupo

g: grama

GC: grupo controle

GE: grupo experimento

h: hora

IM: intra-muscular

IV: intra-venoso

kg: quilograma

mg: miligrama

mm: milímetro

ml: mililitro

ms: milisegundo

N. : número

nm: nanômetro

p: página

pH: pontencial hidrogenado

Prof.: professor

Prof.^a: professora

seg: segundo

TV: televisor

v: volume

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

W: watt

μm²: micrômetros quadrado

μm: micrômetro ou micra

μs: microsegundo

%: porcentual

LISTA DE SIGLAS

ATP: adenosina trifosfato

CEFET-PR: Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA: ácido desoxirribonucléico

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

LASER: empréstimo da sigla em língua inglesa- laser- (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

Microflap: retalho de mucosa microscópico

Microspot: ponto microscópico de radiação dirigida

MTC: mitomicina-C

RNA : ácido ribonucléico

TA: músculo tireoaritenóide

UFPR: Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

N: número de amostra

°C: graus Celsius

p: nível de significância estatística

x: por (descrição de área)

X: vezes (aumento no microscópio)

%: porcentagem

<: menor que

=: igual a

≤: menor ou igual a

RESUMO

DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DE SINÉQUIAS NA PREGA VOCAL DE SUÍNOS APÓS EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA COM LASER DE CO₂ : EFEITO DA MITOMICINA-C TÓPICA.

Introdução: A fonocirurgia a laser de CO₂, a partir da alta tecnologia desenvolvida nos últimos anos, tem permitido cirurgias mais precisas e conservadoras. Várias terapias adjuvantes têm sido estudadas na tentativa de modular o processo de cicatrização. Recentemente foi demonstrado que a Mitomicina-C tópica (MTC tópica) reduz a fibrose pós-operatória experimentalmente em diversos modelos animais e no ser humano. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da MTC tópica no processo de cicatrização de pregas vocais de suínos 30 dias após exérese de fragmento de mucosa com laser de CO₂ mediante a mensuração da deposição de colágeno e formação de sinéquias. **Material e método:** Foram estudados 12 suínos jovens (6 machos e 6 fêmeas), separados em 2 grupos: controle (n=6) e experimento (n=6). Grupo controle, realizada exérese de fragmento de mucosa a laser de CO₂ sem o uso da MTC tópica. Grupo experimento: após a exérese de fragmento de mucosa a laser de CO₂ foi aplicada MTC tópica. Os procedimentos cirúrgicos a laser de CO₂ foram realizados com 2 watts de potência, de forma contínua, no modo focado em superpulso, com *microspot* de 250µ. Após 30 dias os animais foram submetidos à eutanásia e coletadas amostras das pregas vocais para avaliação macroscópica da formação de sinéquias e para análise histológica, a fim de quantificar a deposição de colágeno, mediante coloração de *Picrosirius Red*, através do programa Pro Image-plus 4.5[®] acoplado ao microscópio Olympus[®] BX50. Os resultados foram comparados pelo teste de Wilcoxon, com $p \leq 0.05$. **Resultado:** A média da área do colágeno total das pregas vocais do grupo controle foi de 2648,03 µm², enquanto a média do colágeno total das pregas vocais, quando utilizada a MTC tópica foi de 2200,30 µm², ($p = 0,0043$). Não houve formação de sinéquias em nenhum animal. **Conclusão:** A MTC usada topicamente após 30 dias da exérese de fragmento de mucosa da prega vocal a laser de CO₂ em suínos diminuiu, significativamente, a deposição do colágeno total, e não se associa à formação de sinéquias pós cirúrgicas em nenhum dos animais estudados.

Palavras-chave: Experimental, Mitomicina-C, Cicatrização, Prega vocal, Suínos, Laser CO₂

ABSTRACT

COLLAGEN DEPOSITION AND ADHERENCE FORMATION IN SWINE VOCAL FOLDS AFTER MUCOSAL FRAGMENT EXCISION WITH CO₂ LASER: EFFECTS OF TOPICAL MITOMYCIN-C.

Introduction: Laser phonosurgery, due to new technology development over the last years, allowed more conservative and precise surgical procedures. Several adjuvant therapies have been investigated to help modulate the wound healing process. Recently, topical Mitomycin-C.(MTC) has been associated with reduction in post-operative adherences. **Objectives:** To evaluate the effects of topical MTC on the healing process in vocal folds mucosa of swines after mucosal fragment excision with CO₂ laser by measuring collagen deposition and adherence formation in a 30 day period. **Material and Method:** Twelve *larger white* pigs were divided into two groups of 6 animals each: control group, where surgical excision was made with CO₂ laser without application of topical Mitomycin-C and experimental group, in which MTC was applied after the vocal fold CO₂ laser excision. The CO₂ laser surgical procedures were performed with 2 watts, in continuous mode and superpulse 250 μ *microspot*. After 30 days, by the time of euthanasia, the formation of adherences was evaluated by macroscopic evaluation and the collagen depositions, by *Picrosirius Red* stain under polarized light. The histologic examinations were analysed by Pro-Image Plus[®] 4,5 connected to a Olympus[®] microscope BX 50. The results were compared using the Wilcoxon test with $p \leq 0,05$. **Results:** The amount of total collagen deposition on the vocal folds in the control groups was 2648,03 μm^2 , while the amount of total collagen of vocal folds using MTC was 2200,30 μ^2 ($p=0,0043$). Adherence formation was not observed in any group **Conclusion:** Topical MTC used after 30 days of parcial excision of swines vocal folds using CO₂ laser is associated with a significant decrease in the area of total collagen deposition, without formation of adherences.

Key-words: Experiment, Mitomycin-C, Healing, Vocal fold, Swines, CO₂ laser.

1 INTRODUÇÃO

A laringologia teve grande avanço com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de várias técnicas de visibilização da laringe, em particular com o emprego do microscópio cirúrgico e, mais recentemente da video endoscopia. 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.

O laser mais comumente utilizado em cirurgia da laringe é o de CO₂, tornado popular após os relatos de JAKO, et al ,(1972). Os “fonocirurgiões” atuais executam cada vez mais procedimentos que visam melhorar a qualidade vocal e aumentar a velocidade na recuperação da função fonatória GARRET, et al, (2001). As técnicas atuais de fonomicrocirurgia usando laser de CO₂ são baseadas na compreensão recente dos mecanismos fisiopatológicos da prega vocal, como também nos princípios físicos e biológicos da tecnologia do laser de CO₂, levando em consideração a sua interação com os tecidos.

O laser de CO₂, que utiliza um manipulador do tipo *microspot*, concentra a energia em um ponto mais localizado na área irradiada e, teoricamente, elimina de maneira eficaz o efeito da falta de precisão. 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 de 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 cicatriz, 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 ELIASHAR, et al, (1999).

Com as novas técnicas cirúrgicas em laringe, como a preservação da mucosa e do ligamento vocal, tem-se obtido melhor qualidade vocal pós-operatória. No entanto, a formação de tecido cicatricial permanece sendo fonte potencial de problema para o fonocirurgião na busca da qualidade vocal. Terapias adjuvantes têm sido investigadas

para ajudar a modular o processo cicatricial na prega vocal, após excisão de sua cobertura mucosa. Corticoesteróides sistêmicos ou tópicos, resfriamento prévio ao procedimento cirúrgico, cola de fibrina, dentre outros métodos, são usados no sentido de melhorar a cicatrização da cobertura mucosa após o procedimento fonocirúrgico. ABITBOL, (1995); BOUCHAYER, et al, (1998).

Dentre os vários métodos investigados para modular o processo cicatricial, a MTC é um agente antimetabólico que inibe a proliferação de fibroblastos quando aplicado topicamente, inibindo de forma seletiva a síntese de DNA e, em altas doses, a síntese de RNA, alterando, desta maneira, a síntese protéica. Por esta razão tem sido utilizada freqüentemente na oftalmologia para reduzir a formação de cicatriz KHAN, et al, (1993). A MTC demonstrou ter efetividade na diminuição da fibrose quando utilizada experimentalmente para o tratamento da estenose subglótica e estenose glótica posterior. Nestes estudos, a cicatrização anormal e a formação de estenoses foram controladas e substituídas pelo retorno da mucosa de revestimento pelo uso tópico de MTC. ELIASHAR, et al, (1999).

A MTC é um quimioterápico que apresenta capacidade de inibir fibroblastos *in vitro*. Esta característica estimulou o seu uso experimentalmente em animais e no ser humano. Não foram identificados na literatura estudos que tivessem resultados avaliados os efeitos da MTC tópica após cirurgia a laser de CO₂ em pregas vocais suínas.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a cicatrização em pregas vocais de suínos após exérese de fragmento de mucosa com laser de CO₂ com ou sem a utilização de MTC tópica e analisar após 30 dias os seguintes parâmetros:

- a. a deposição de colágeno total.
- b. a formação de sinéquias pós-operatórias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA DA PREGA VOCAL

As pregas vocais localizam-se na laringe, e são constituídas por conjunto arquitetônico de cartilagens unidas por ligamentos, membranas e músculos. 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:

- e. músculo vocal.

1- Cobertura:

O epitélio da prega vocal, pavimentoso estratificado não queratinizado, pode ser considerado uma fina camada que mantém as estruturas da prega vocal em seu formato original. A membrana basal apresenta pequenos sulcos em toda sua extensão promovendo acentuado aumento da área de apoio para as células teciduais. Os desmossomos localizados na junção entre as células, diminuem de frequência quando se aproximam da camada mais superficial da prega vocal, permitindo melhor movimento vibratório.

A camada superficial da lâmina própria é composta de uma substância amorfa, a qual é a principal responsável pelo processo de vibração da prega vocal.

Entre o epitélio e a camada superficial da lâmina própria existe uma área membranosa, rica em proteínas, responsável em dar sustentação à prega vocal.

2- Transição

A camada intermediária da lâmina própria é composta por fibras elásticas dispostas simetricamente, e a camada mais profunda, é constituída por fibras de colágeno, e ajuda na sustentação. A porção entre a camada intermediária e a profunda é chamada de ligamento vocal, situada no ápice da prega vocal e é constituída de fibras elásticas densas, que passam entre as duas camadas que a formam e vão originar o esqueleto do músculo vocal.

Não existem glândulas, nódulos linfáticos e pouco sangue flui entre as três camadas da prega vocal. As glândulas responsáveis pela umidificação estão localizadas no ventrículo e nas bandas ventriculares.

Os capilares estão dispostos paralelos, raramente vasos adentram a mucosa, porém são eles os responsáveis por manter a temperatura e a oxigenação da prega vocal.

3- Corpo vocal

É formado pelo músculo vocal sendo a base da prega vocal e corresponde à musculatura esquelética. É formado por fibras musculares longas, cilíndricas e constituídas por miofibrilas. Apresenta mitocôndrias, as quais são responsáveis pelo suprimento energético através da formação de ATP e têm o dobro de tamanho em relação às mitocôndrias encontradas na musculatura do bíceps. ABITBOL, (1995).

O músculo tiroaritenóide (TA) compõe a prega 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.

2.2 PROCESSO CICATRICAL

No processo de reparação das lesões nos animais vertebrados ocorre uma seqüência de eventos moleculares, que visa restaurar o tecido que sofreu determinado tipo de dano. No entanto, o organismo falha em seu objetivo final de controlar o tecido

lesado, ocorrendo então o reparo com a formação de uma cicatriz, num processo que justifica o termo cicatrização.

SCHILLING, (1976) propôs dividir o processo de cicatrização em três fases distintas independentemente do tecido lesado:

a) Fase exsudativa ou inflamatória: logo após a lesão ocorre extravasamento de sangue, preenchendo a área lesada com plasma e elementos celulares e aumento da permeabilidade capilar, com liberação de proteínas plasmáticas. O processo inflamatório, causa eritema e edema localizados. Tem duração de 24 a 72 horas.

b) Fase proliferativa ou fibroplasia: os fibroblastos e as células endoteliais são as células primárias que proliferam durante esta fase. Os fibroblastos migram para o local da ferida oriundos do tecido circundante, e as células endoteliais proliferam a partir das vênulas intactas localizadas próximo da ferida e formam capilares pelo processo de angiogênese. Componentes protéicos da matriz extracelular são sintetizados nessa fase, entre 4 a 21 dias.

c) Maturação ou remodelagem: começa após 2 a 4 semanas. Ocorre a deposição de colágeno maduro na ferida. Essa fase pode ser alterada por doenças sistêmicas ou processos locais (diabetes, desnutrição, infecção).

2.3 LASER NA CIRURGIA DA LARINGE

A palavra laser é acrônimo de “amplificação luminosa por emissão estimulada de radiação” (*light amplification of stimulated emission of radiation*). EINSTEIN postulou a teoria da emissão estimulada de radiação em 1917, discutindo a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnética. DICKE, et al, (1960) demonstraram a organização da energia em um feixe de luz intenso por processo de “feedback” óptico e amplificação. Um átomo com nível de energia alto pode perdê-la rapidamente pela interação de fótons com energia conhecida, emitidos na mesma direção, com frequência e energia iguais. Esse processo é o princípio físico do laser. TOWNES, (1965) relatou, em seus estudos, a emissão estimulada de radiação, possibilitando a criação do primeiro laser, desde então aperfeiçoado inúmeras vezes até a obtenção de um aparelho adequado às diversas necessidades médicas.

O laser é um fluxo luminoso de alta intensidade de energia com características bem definidas:

a) Único comprimento de ondas (monocromatismo);

- b) Sem divergência dos raios, mesmo por grandes distâncias (colimada);
- c) Ondas em mesma fase no tempo e espaço (coerência);
- d) Pulsos de duração curta.

Estas características permitem alta concentração de energia luminosa e, através de lentes, prismas e espelhos, podem ser projetados em áreas pequenas e precisas.

Todos os instrumentos a laser têm uma câmara ótica com dois espelhos, separados por meio ativo, o qual pode ser o dióxido de carbono (CO₂) ou outro material. Uma fonte de energia externa excita o meio ativo, ocorrendo emissão de ftons, que passam por um sistema de lentes e espelhos, direcionando a emissão BRUNETAUD, et al, (1982). O laser mais comumente utilizado em cirurgia laríngea é o de CO₂. Esse tipo de instrumento produz luz infravermelha invisível no espectro eletromagnético e apresenta comprimento de onda de 10,6 micra ou 10600 nm. A luz laser vermelha, que se vê quando do funcionamento do aparelho, é de um laser de radiação visível, de baixa intensidade de Hélio-Neon, entre 400 e 700 nm, e serve de guia para a realização de procedimentos terapêuticos. A energia produzida é intensamente absorvida por tecidos com grande quantidade de água em suas células. Porém, o efeito térmico em tecidos adjacentes é mínimo. Esse tipo de laser pode ser acoplado a um conjunto de espelhos, possibilitando seu uso em conjunto com o microscópio, aumentando sua aplicabilidade e possibilitando ao cirurgião operar com as duas mãos. As vantagens na laringologia são muitas: é absorvido pela água, principal elemento do tecido das pregas vocais; tem um efeito de corte com mínima lesão térmica; a hemostasia é excelente e ocorre mínima manipulação do tecido, diminuindo o risco de infecção.

2.4 INTERAÇÃO LASER-TECIDO

A energia do laser tem seu efeito sobre o tecido por conversão em calor da energia absorvida. A quantidade desta energia depende da potência do laser e do coeficiente de absorção do tecido. Tecidos com grande coeficiente de absorção apresentam grande penetração de energia, enquanto tecidos com baixo coeficiente de absorção apresentam depósito de energia na superfície.

A lesão térmica começa em 50° C, a coagulação ocorre entre 60 e 65° C e a desnaturação protéica entre 70 e 100° C. Em temperaturas superiores a 100° C, ocorre a carbonização do tecido. A lesão tecidual é dependente do coeficiente de absorção, densidade da potência do laser, tempo de exposição à energia e comprimento de onda da energia. Portanto quanto maior o diâmetro do feixe de laser, maior a quantidade de energia necessária para causar lesão tecidual. Já com o aumento do diâmetro do feixe e a manutenção da potência, a quantidade de tecido lesionado diminui. PASCHOAL, (1991)

2.5 IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

As moléculas do colágeno consistem em três cadeias de polipeptídeos, formando um hélice triplo. O colágeno pode ser classificado de acordo com a estrutura do hélice dominante e com o seu tamanho molecular. 1: colágeno fibrilar (tipo I, II, III, V e IX), 2: colágeno não fibrilar grandes (tipos IV, VI, VII e XII) e 3: colágeno de cadeia curta (tipos VIII, X e XIII). Os colágenos I e III são os mais importantes colágenos fibrilares produzidos pelo tecido de granulação durante a cicatrização de feridas, e sua taxa varia nos diferentes tecidos e durante as fases da formação do tecido de granulação BRASKÉN, (1991). O colágeno é o componente mais importante na reparação dos tecidos SAVASSI, et al, (1994) ; THORNTON, et al, (1997), sendo o maior componente estrutural da matriz extracelular e representa 25% da proteína corporal total.

2.6 COLORAÇÃO DE *PICROSIRIUS RED*

Investigando um material que corasse permanentemente o colágeno, introduziram na técnica histológica o corante Vermelho Sírio associado ao ácido pícrico

(solução de *Picrosirius Red*), que substituiu a fucsina ácida no método tricrômico de Van Gieson. SWEAT, et al, (1964). Quatro anos depois, CONSTANTINE, et al, (1968) observaram que o Vermelho Sírio aumentava a birrefringência das fibras colágenas quando estudadas em microscópio de polarização.

Como o colágeno é uma proteína básica, é provável que os grupos sulfônicos do corante Vermelho Sírio a 0,1%, possam interagir em um pH baixo com os grupos amino da lisina e hidroxilisina, e os grupos guanidina da arginina. O papel do ácido pícrico na coloração do colágeno é desconhecido, sendo que, quando omitido da solução corante, todos os componentes teciduais ficam vermelhos. Portanto, este parece prevenir a coloração indiscriminada de estruturas sem colágeno pelo Vermelho Sírio. Observa-se, contudo, que mesmo quando o ácido pícrico não é usado, apenas o colágeno mostra intensificação da birrefringência JUNQUEIRA, et al, (1979).

Durante a maturação das fibras, o conteúdo de proteoglicano altera-se, ocorre desidratação e o número de ligações cruzadas e grupos laterais, bem como diâmetro das fibras de colágeno, aumentam notavelmente. Todos estes fatores levam ao incremento na intensidade de birrefringência e, ao mesmo tempo, a mudança na cor de polarização. Assim, as fibras de colágeno tipo I jovens, muito finas, com birrefringência fraca, aparecem em cor verde, como as fibras maduras tipo III. Elas se tornam laranjas ou vermelhas sob polaróides cruzados apenas tardiamente, em um estágio mais maduro SZENDRŐI, et al, (1984).

O uso da solução de *Picrosirius Red* associada à microscopia polarizada apresenta grande sensibilidade e especificidade, sendo um método simples e eficiente para identificar fibras colágenas em vertebrados, além de diferenciá-las em colágeno tipo I, II e III através da birrefringência. JUNQUEIRA, et al, (1978); JUNQUEIRA, et al, (1979); SZENDRŐI, et al, (1984); RABAU, et al, (1994); HIRSHBERG, et al, (1996); HIRSHBERG, et al, (1999).

Com a microscopia polarizada, observa-se o aumento da birrefringência das fibras colágenas quando coradas pela solução de *Picrosirius Red*. Verifica-se, também, que pelos diferentes tipos de colágeno, devido à diferença no diâmetro e arranjo estrutural de suas fibras, pode-se distinguir em três padrões de cores: tipo I (fibras espessas amarelo brilhante, laranja ou vermelha), tipo II (cores variadas distintas das observadas no colágeno I), tipo III (fibras finas esverdeadas, amarelo-esverdeado) SZENDRŐI, et al, (1984); RABAU, et al, (1994); HIRSHBERG, et al, (1996); HIRSHBERG, et al, (1999).

Além disso, alguns estudos sugerem que as diferentes birrefringências observadas à polarização após o uso da solução de *Picrosirius Red* podem avaliar a fase do processo cicatricial, sendo encontrado colágeno esverdeado no início da cicatrização e fibras colágenas maduras, altamente birrefringentes de cor laranja ou vermelha, em processo fibrótico inativo SZENDRŐI, et al, (1984); RABAU, et al, (1994).

2.7 INFLUÊNCIA DA MTC TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO

Vários os processos coadjuvantes à cirurgia tem sido tentados no sentido de minimizar a formação de estenoses e sinéquias, e nem sempre com resultados satisfatórios. Nestes casos, uma possibilidade promissora é o uso da MTC tópica utilizada experimentalmente em animais e no ser humano no sentido de inibir o processo de cicatrização.

2.7.1 Estudos em Humanos

Com o intuito de diminuir a fibrose pós-operatória na prega vocal e melhorar a fonação, várias substâncias foram injetadas no intra ou no pós-operatório imediato. Entre estas drogas pode-se citar os esteróides BOUCHAYER, et al, (1988); ABITBOL, (1995) GARRET, et al, (2001) e o 5-fluoracil INGRANS, et al, (2000), com resposta controversa na literatura.

A MTC tópica vem ganhando espaço na cirurgia otorrinolaringológica desde que estudos comprovaram sua eficácia na redução da fibrose pós-operatória em cirurgia, do saco endolinfático no tratamento da doença de Menière YAZAWA, et al, (1999) e para retardar a cicatrização da membrana timpânica após timpanocentese como opção terapêutica aos tubos de ventilação JASSIR, et al, (2001) como também em cirurgias endoscópicas nasossinusais CHUNG, et al, (2002).

A MTC é um antimetabólito com capacidade de inibir a proliferação de fibroblastos quando usada topicamente. A MTC inibe, de forma seletiva, a síntese de DNA e, em altas doses, a síntese de RNA, alterando a síntese protéica.

Quando usado de forma sistêmica apresenta, como principal efeito colateral, a mielossupressão CROOKE, et al, (1976). Esta substância é isolada de *Streptomyces caespitosus* e é usada por via sistêmica no tratamento quimioterápico de câncer da cavidade oral, pulmões, pâncreas, estômago, seminomas e tumores epiteliais BRADNER, (2001).A oftalmologia usa a MTC de forma tópica para o tratamento pós-

cirúrgico de pterígio e glaucoma. Nesta indicação apresenta, como principais complicações, ulceração de córnea, escleromalácia, calcificação, irite, perfuração de córnea e hipotonia ocular KHAN, et al, (1993). Não foi relatado efeito colateral sistêmico com o uso tópico da MTC em oftalmologia.

RAHBAR, et al, (2001) obtiveram sucesso na aplicação da MTC em pacientes com estenose glóticas, subglóticas e traqueais, sendo o primeiro estudo a demonstrar estes resultados. SENNES, et al, (2003) estudaram a aplicação da MTC em dois pacientes com estenose supraglótica circunferencial importante e com traqueostomia por insuficiência respiratória obstrutiva. Fizeram secção radiada com laser de CO₂ e aplicaram MTC na concentração de 0.4 mg/ml por 4 minutos. Os autores obtiveram excelentes resultados. Os pacientes evoluíram sem dispnéia, foram decanulados e não apresentaram re-estenose.

2.7.2 Estudos em Ratos

GRAY, et al, (2003) observaram que a MTC apresenta efeito maior no atraso da cicatrização quando aplicado imediatamente antes ou após o dano feito ao tecido, com melhor indução do retardo cicatricial. Entretanto este fato não foi observado quando aplicado tardiamente no pós-operatório, sugerindo que exista um espaço de tempo adequado entre a lesão e o tempo de aplicação da MTC para obtenção do efeito desejado.

RIBEIRO, et al, (2004) aplicaram a MTC em lesões a laser de CO₂ no dorso de ratos. Macroscopicamente não notaram diferença na cicatrização de feridas entre o grupo tratado e o controle após 12 semanas de tratamento, embora nas semanas iniciais existisse esta diferença, já que o grupo tratado com a MTC apresentava, em média, uma semana de atraso na cicatrização macroscópica, em relação ao grupo não tratado. Em ratos sacrificados com 4 semanas de pós-operatório houve diferença significativa entre os grupos em relação à formação de colágeno. Esta diferença deixou de existir quando compararam-se os grupos com 12 semanas de pós-operatório. Os autores sugerem que, para maior eficácia no uso da MTC em pós-operatório, talvez seja necessário reaplicação da dose entre o primeiro e o terceiro mês para se obter resultado adequado.

2.7.3 Estudos em Cães

SPECTOR, et al, (1999) demonstraram redução significativa na formação de granulomas pós-operatórios na laringe de cães, redução na formação de tecido de granulação e melhora da mobilidade cricoaritenóidea com o uso da MTC.

GARRET, et al, (2001) estudaram a aplicação da MTC na lâmina própria da prega vocal de cães e observaram que elas se apresentavam atroficas em relação aos controles, comprovado histopatologicamente por diminuição de tecido conjuntivo. Estes autores acreditam que esta atrofia pode trazer piora na vibração das pregas vocais, com tendência a agravar-se com o passar do tempo, uma vez que o tempo de estudo foi de apenas quatro semanas.

Estes estudos mostram o uso promissor da MTC em otorrinolaringologia, mas ainda com dúvidas a esclarecer. O trabalho foi desenvolvido com o intuito de contribuir ao estudo da utilização desta substância com grande potencial de melhorar a qualidade de vida de pacientes submetidos a cirurgia endolaríngeas.

2.7.4 Estudos em Suínos

GARRET, et al, (2000) compararam as pregas vocais de cães, suínos e macacos, observando a quantidade de deposição de colágeno, fibras elásticas e tecido amorfo e concluíram que a prega vocal do suíno e do cão são similares à humana quanto à quantidade de elastina e de colágeno. Neste trabalho, os autores concluíram, que o cão é o melhor modelo para o estudo da função da prega vocal pois apresenta a fase vertical da ondulação mucosa vista na videolaringo estroboscopia, o que não é observado em suínos.

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 (fotografia 1).

FOTOGRAFIA 1 – LOCALIZAÇÃO DAS POCILGAS



Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000), obedecidos os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA, (1991), e as recomendações para eutanásia de animais experimentais propostas por CLOSE, et al, (1997).

Os 12 suínos foram divididos em grupos separados aleatoriamente: os animais do grupo controle (GC), composto por 6 animais, foram submetidos à exérese de mucosa do bordo livre do terço anterior da prega vocal esquerda com laser de CO₂ sem a utilização da MTC tópica. Os suínos do grupo experimento (GE), composto por 6 animais, foram submetidos à exérese de fragmento de mucosa do bordo livre do terço anterior da prega vocal esquerda com laser de CO₂, utilizando MTC tópica aplicada por 3 minutos após exérese. (tabela 1).

TABELA 1 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

GRUPOS	PROCEDIMENTOS
GRUPO CONTROLE (n=6)	Animais submetidos à exérese de fragmento de mucosa do bordo livre de terço anterior de prega vocal esquerda com laser de CO ₂ , sem MTC tópica.
GRUPO EXPERIMENTO (n=6)	Animais submetidos à exérese de fragmento de mucosa do bordo livre de terço anterior de prega vocal esquerda utilizando laser de CO ₂ , com uso de MTC tópica.

3.2 AMOSTRA

Doze suínos da raça *Larger White* (6 machos e 6 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 variou de 27 a 31 dias.

Todos os animais foram avaliados clinicamente, por médicos veterinários e 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 cada 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, sem privação antes ou após o procedimento. 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 retirado 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 da incisão de prega vocal a laser.

3.5.1 POSICIONAMENTO

Após a anestesia os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em mesa especial para castramento, 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).

FOTOGRAFIA 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).

FOTOGRAFIA 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 câmara 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 e 6)

FIGURA 5 – MICROSCÓPIO CIRÚRGICO



NOTA: Observa-se a posição do cirurgião visibilizando as pregas vocais com microscópio cirúrgico acoplado ao laser de CO₂

FIGURA 6 – EQUIPAMENTO DE CAPTAÇÃO E REPRODUÇÃO DE IMAGEM



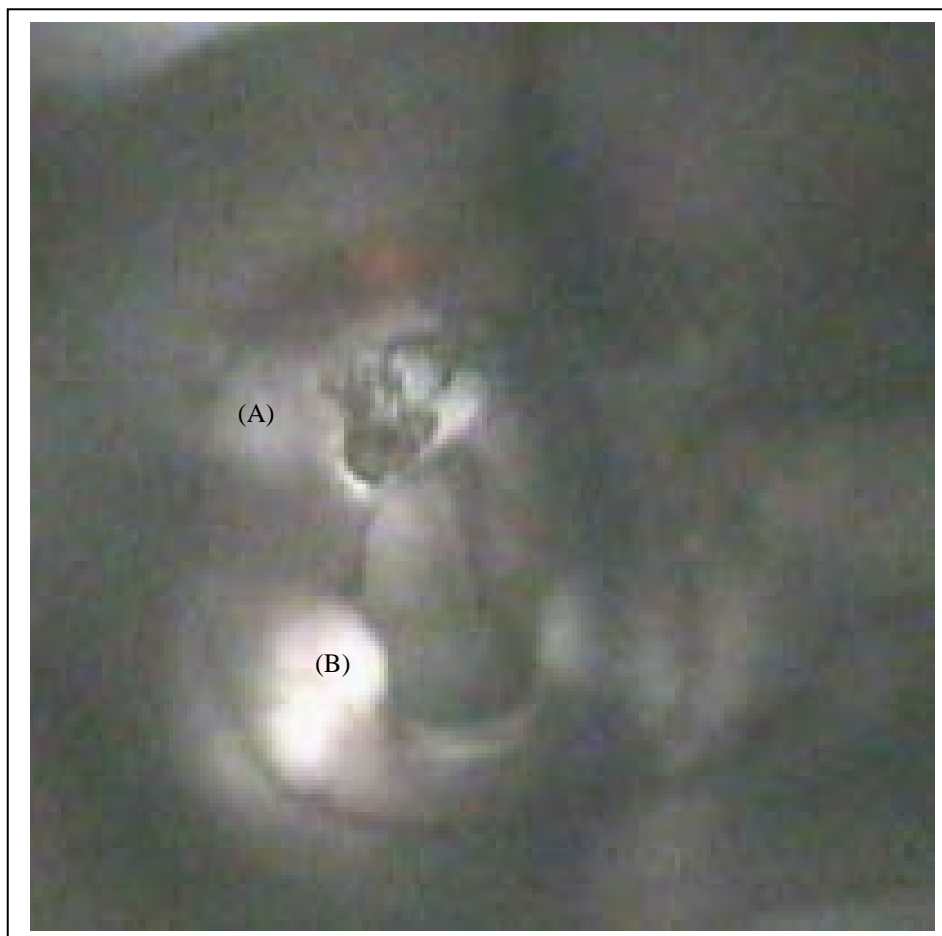
3.5.4 EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA DO BORDO LIVRE DA PREGA VOCAL ESQUERDA REALIZADA POR LASER DE CO₂

O procedimento iniciou-se na apreensão do bordo livre de terço anterior de prega vocal esquerda com pinça de Bouchayer Microfrance[®] (Microfrance, Paris, França). Procedeu-se ao uso do laser de 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 7, 8 e 9).

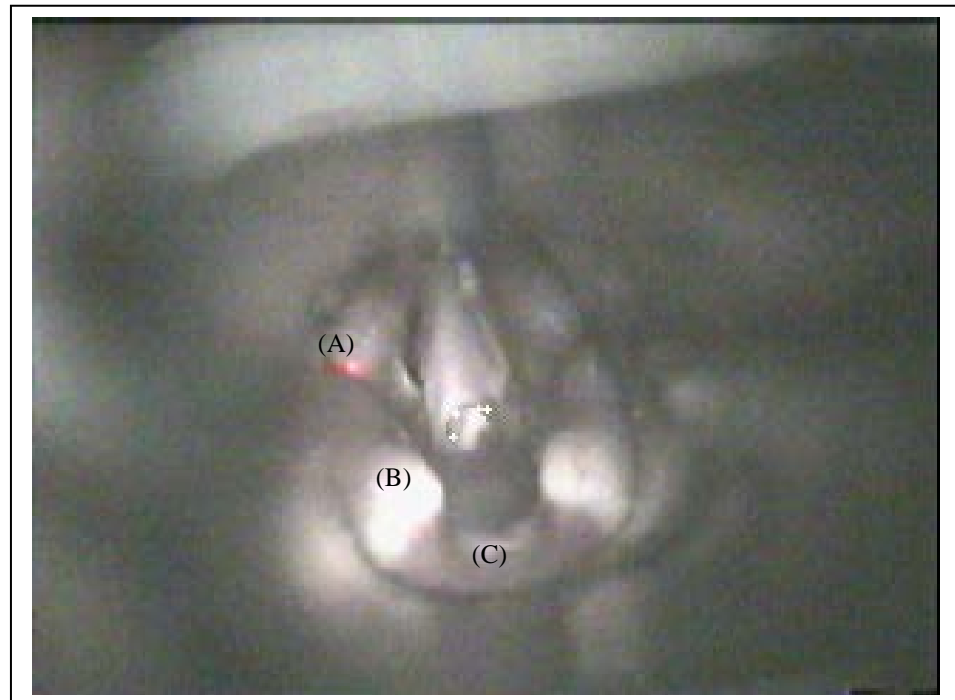
FIGURA 7 – PREENSÃO DO BORDO LIVRE DE PREGA VOCAL ESQUERDA



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

FIGURA 8 - INÍCIO DA EXÉRESE A LASER DE CO₂

NOTA: Laser de 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), Aritnoide esquerda (B).

FIGURA 9 – ASPECTO PÓS EXÉRESE A LASER DE CO₂

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

3.5.5 UTILIZAÇÃO DE MTC TÓPICA NO GRUPO EXPERIMENTO

Após a exérese do fragmento de mucosa do bordo livre do terço anterior da prega vocal esquerda realizada com laser de CO₂, colocou-se algodão com MTC na concentração de 0,4 mg/ml em contato com a ferida cirúrgica durante 3 minutos. Após, foi retirado o algodão e removido o excesso da MTC com soro fisiológico 0,09% (figura 10)

FIGURA 10 – APLICAÇÃO DE MTC TÓPICA



MTC tópica na concentração de 0,4 mg/ml.

Observa-se a área da exérese de fragmento de mucosa em 1/3 anterior de prega vocal esquerda (→)

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 CLÍNICA NO PÓS-OPERATÓRIO

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

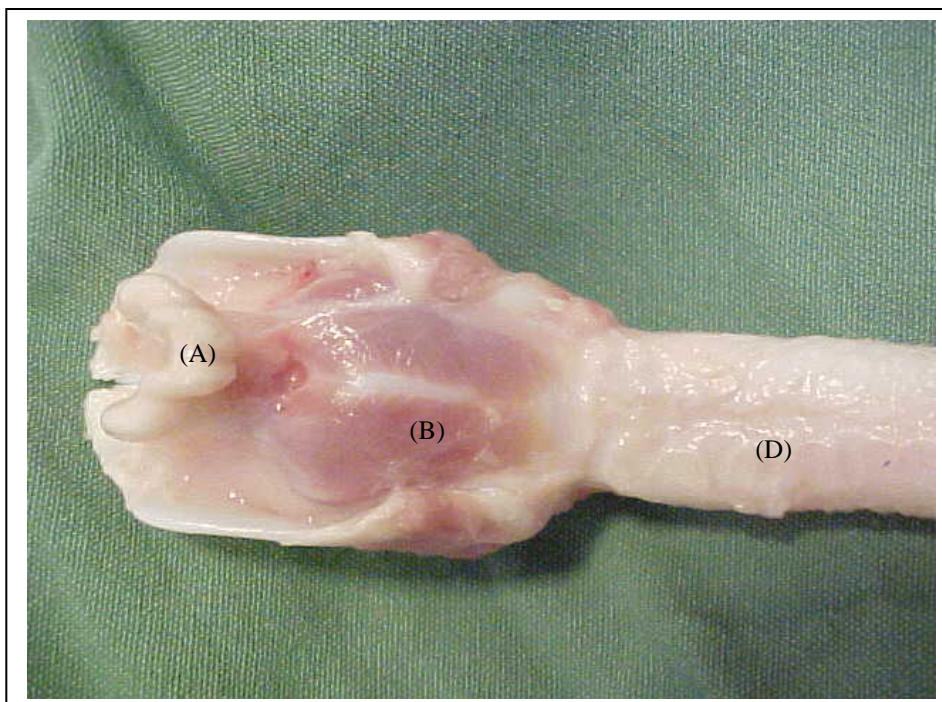
3.8. EUTANÁSIA E COLETA DA LARINGE

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 cardiorrespiratória e reflexo midriático, foram avaliadas macroscopicamente as pregas vocais de todos os espécimes, não apresentando sinéquias após a retirada quando, então, foram procedidas as coletas das amostras das pregas vocais e, imediatamente, após acondicionadas em formol (10%) e enviadas para processamento histológico CLOSE, et al, (1997).

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 outra incisão da cartilagem tireóide (figura 14) 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 Cricotireoidiana (C) Traqueia (D)

FIGURA 12 – INCISÃO LONGITUDINAL ANTERIOR

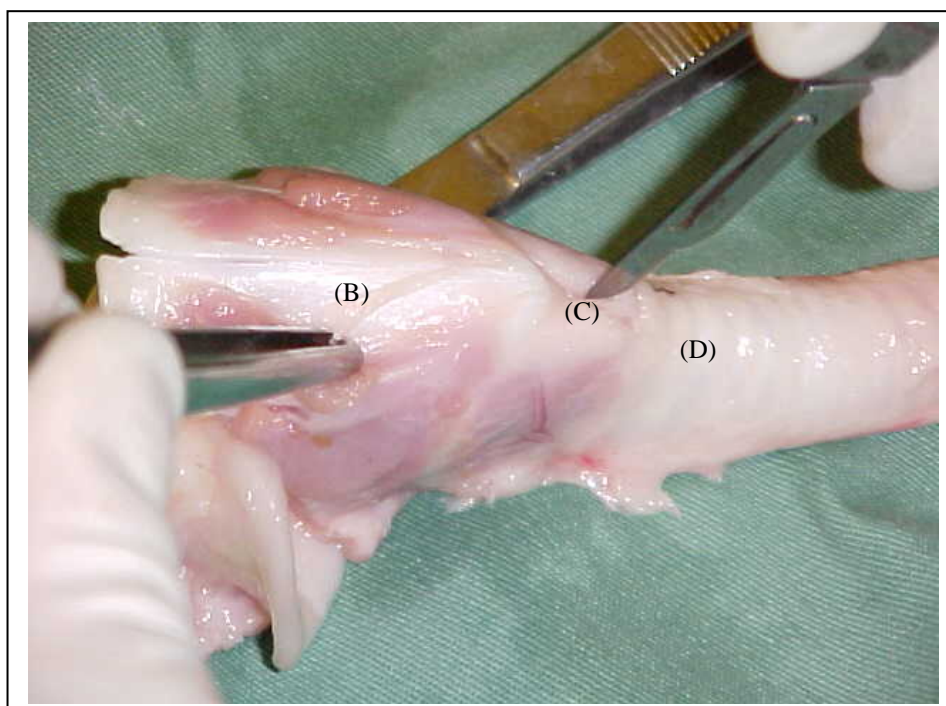
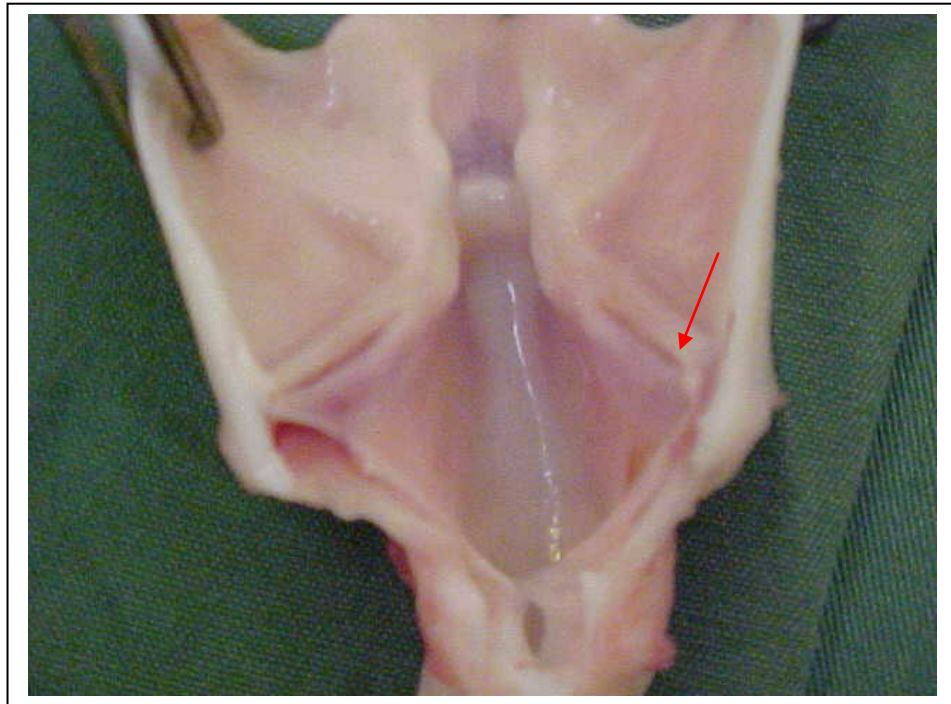
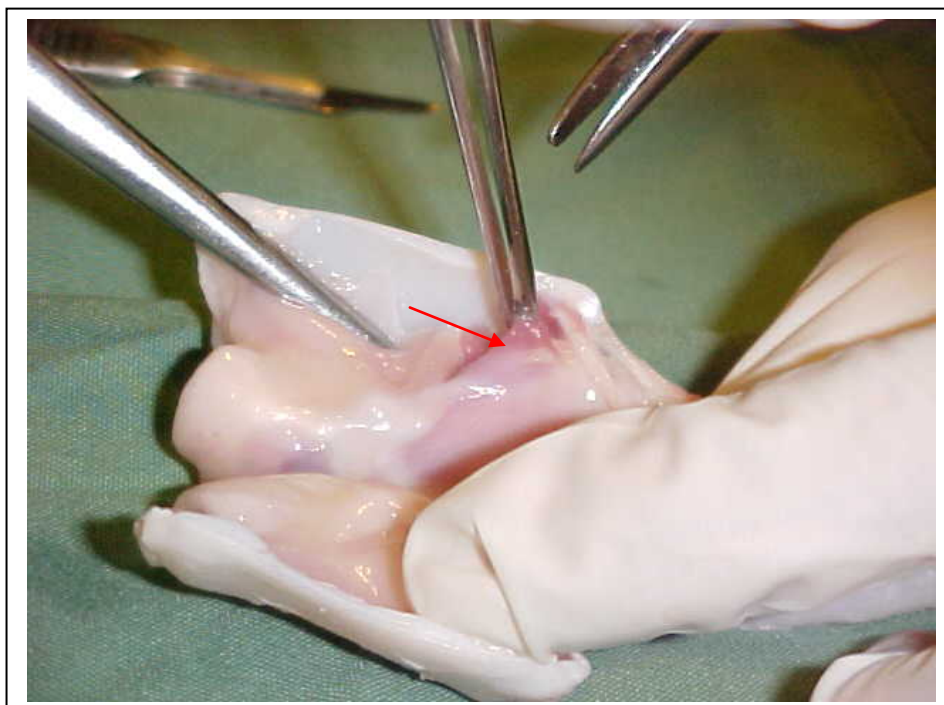


FIGURA 13 – OBSERVAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE



NOTA: A seta aponta para a área submetida a exérese do fragmento de mucosa em 1/3 anterior de prega vocal esquerda.

FIGURA 14 – 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 sequencialmente concentradas de parafina durante 12 h. Em seguida, incluídas em parafina quente Leica® modelo EG 1160, (Leica, Hanover, Alemanha). Os blocos de parafina foram em cortes de 5µm e dispostos em lâmina de vidro de 75x25mm, tendo sido executados dois níveis de corte para cada área de estudo no bloco de parafina. As lâminas foram coradas em solução de *Picrosirius Red*.

3.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA MORFOMÉTRICA

A leitura das lâminas foi realizada através do programa Pro Image Plus, versão 4,5® para Windows®, (Mídia Cibernética, São Paulo, SP), em computador Pentium IV® acoplado ao microscópio Olympus® BX50, (Olympus, Tokyo, Japão) e câmera de vídeo Sony®, (Sony, Tokyo, Japão) (figura 15), calibrado previamente em micrômetros com objetiva de 20 vezes. As medidas foram, então, transferidas para o programa Excel Windows®.

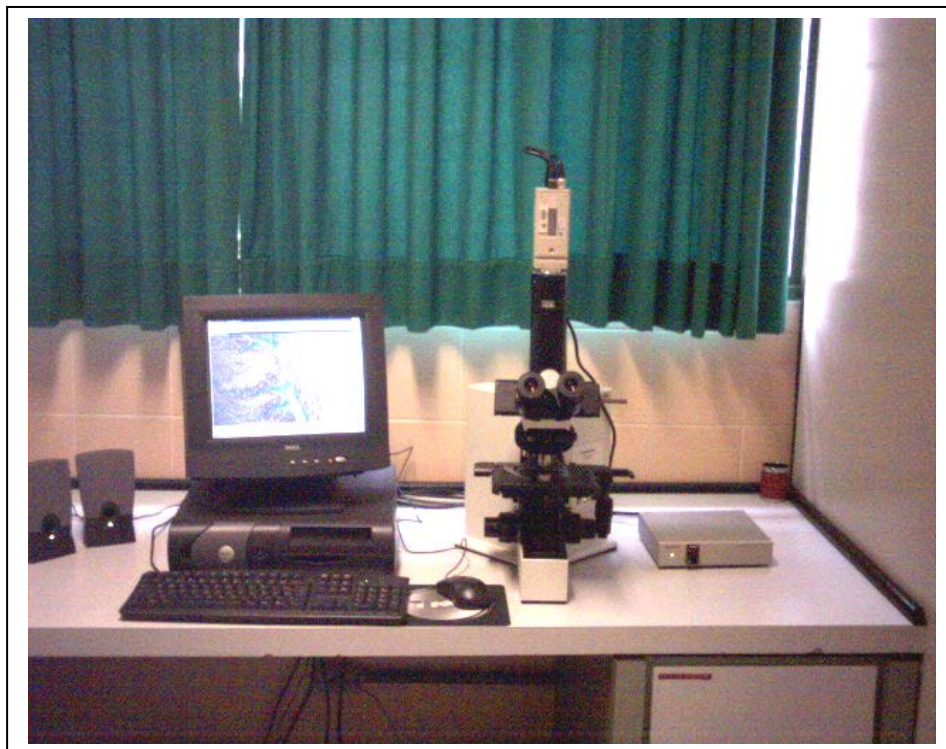
Foi medida a fibroplasia, que é a deposição do colágeno que ocorre no processo de cicatrização após o procedimento cirúrgico na superfície da mucosa da prega vocal.

Foram efetuados 2 medidas em cada campo, como segue:

Após a observação do campo na área operatória, na lâmina corada pela solução de *Picrosirius Red* (figura 16) foi realizada a polarização (figura 17). A substância não-colágeno na área escolhida era corada em preto e o colágeno maduro era corado em amarelo, vermelho alaranjado e vermelho. Estas cores foram selecionadas através do programa para quantificação e somatória da área selecionada em micrômetros quadrados. Estes dados foram transportados para o programa Excel Windows® e colocados em tabela para análise estatística após desfeita a randomização e

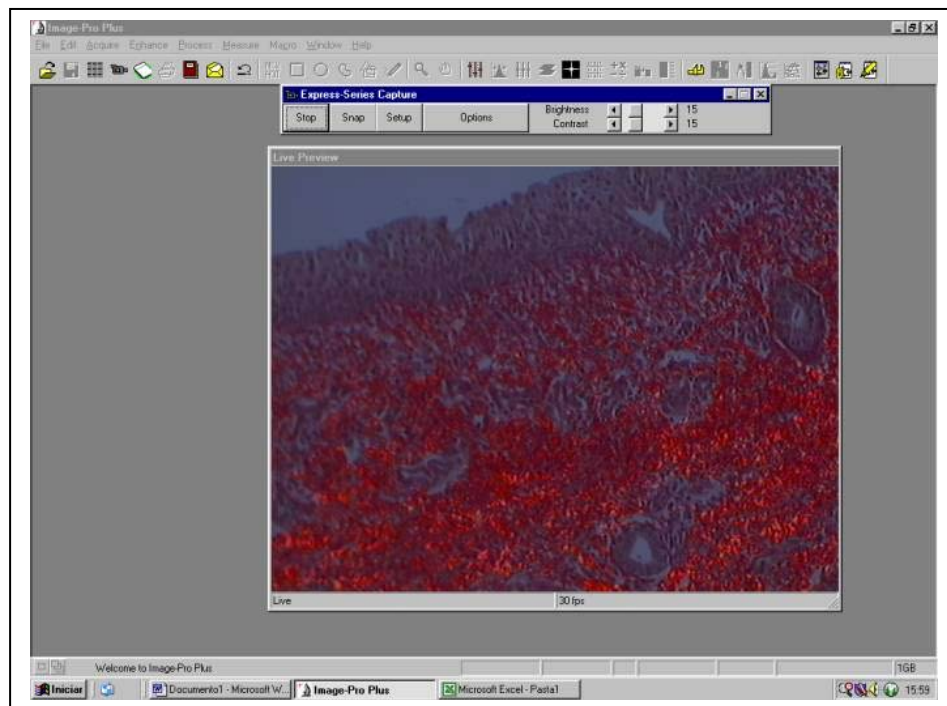
reorganização dos dados (figura 18). Foram realizadas duas medidas das áreas coradas, as quais foram somadas e verificada média simples.

FIGURA 15 – EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM



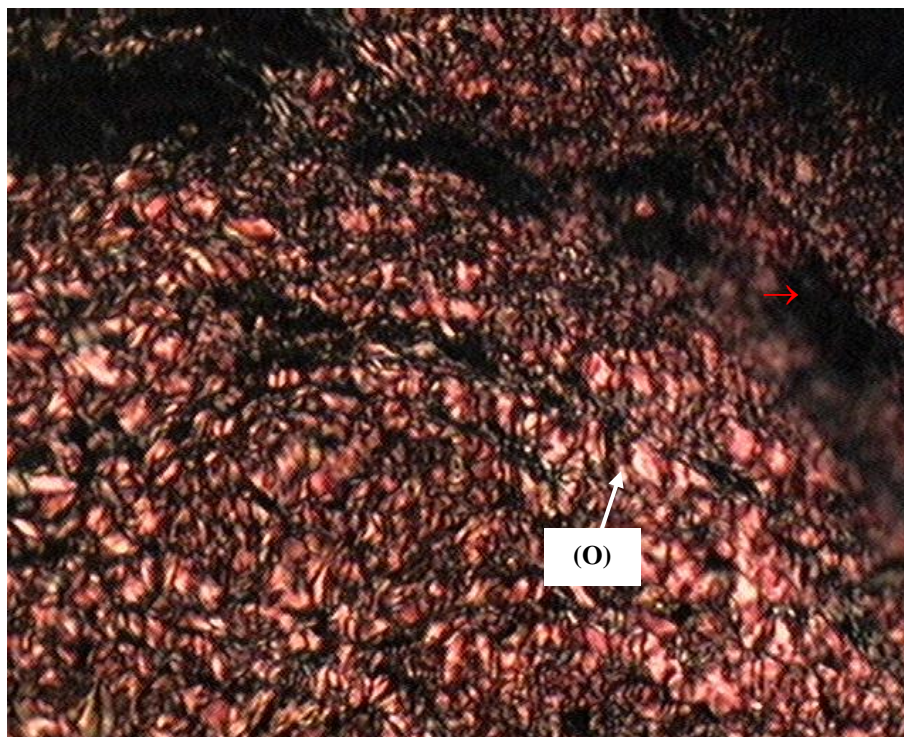
NOTA: Computador Pentium IV[®] acoplado ao microscópio Olympus[®] BX50.

FIGURA 16 –DIGITALIZAÇÃO DE LÂMINA CORADA PELA SOLUÇÃO DE *PICROSIRIUS RED* ANTES DA POLARIZAÇÃO



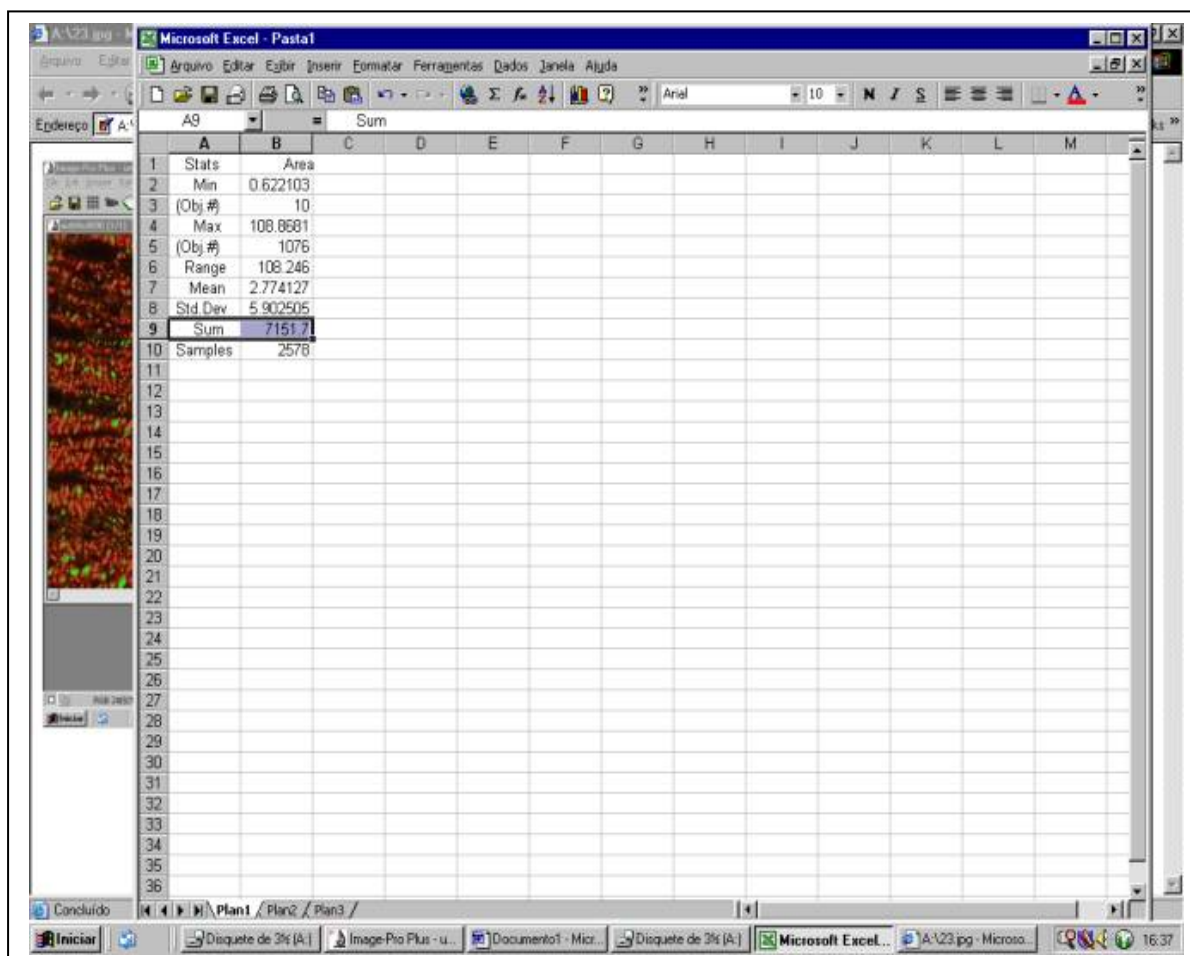
NOTA: Esta lâmina demonstra a região da submucosa da prega vocal antes da polarização, não havendo distinção entre os elementos celulares e o tecido conjuntivo

FIGURA 17 – LÂMINA CORADA PELA SOLUÇÃO DE *PICROSIRIUS RED*
APÓS POLARIZAÇÃO



NOTA: Aspecto birrefringente do colágeno maduro coloração laranja avermelhado(O), Substancia não colágena de coloração enegrecida (→)

FIGURA 18 – TRANSPORTE DOS DADOS DA SOMATÓRIA DA ÁREA POLARIZADA PARA A PLANILHA DO EXCEL



3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foram considerados 2 grupos, sendo cada um deles composto por 6 suínos. No grupo controle foi realizada cirurgia a laser de CO₂ na prega vocal esquerda sem o uso de MTC tópica. O grupo experimento foi submetido à cirurgia a laser de CO₂ com o uso de MTC tópica, as variáveis avaliadas neste estudo foram: a presença de sinéquias entre as pregas vocais e a deposição do colágeno total.

As comparações não pareadas foram realizadas através do teste não-paramétrico de Wilcoxon. 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 PRESENÇA DE SINÉQUIAS

Macroscopicamente, as pregas vocais encontravam-se íntegras, com coloração fisiológica e não apresentavam sinéquias após a retirada em nenhum dos grupos estudados.

4.2 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO

TABELA 2: Prega vocal submetida à cirurgia a laser com e sem o uso da MTC tópica

Colágeno total (μm^2)	Média	\pm	DP	P
sem MTC	2648,93		187,28	0,0043
com MTC	2200,30		96,86	

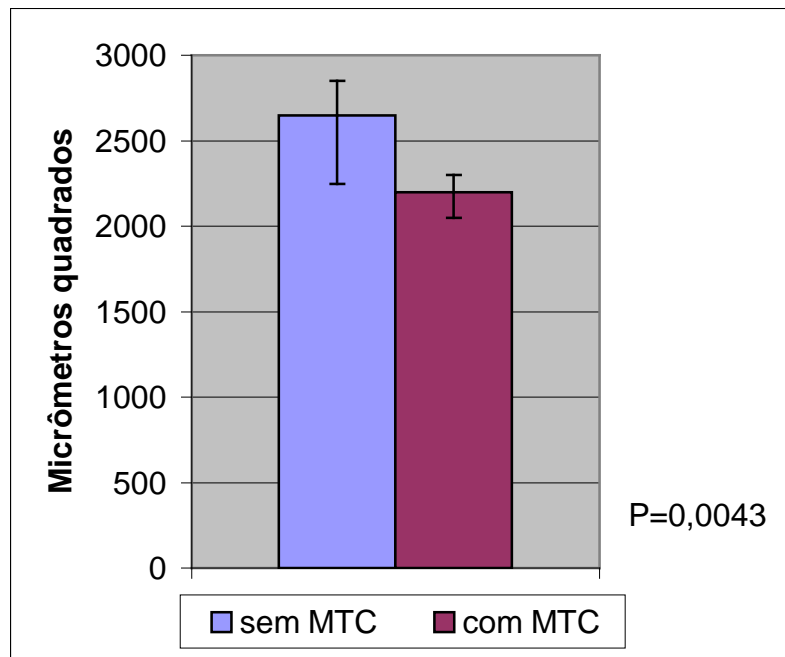
MTC - Mitomicina-C, DP: desvio-padrão, P- nível de significância estatística, μm^2 - micrômetros quadrado

4.3 COMPARAÇÃO DO COLÁGENO TOTAL ENTRE OS GRUPOS SUBMETIDOS A EXÉRESE DE FRAGMENTO DE MUCOSA A LASER DE CO_2 COM E SEM MTC TÓPICA

A média da área do colágeno total das pregas vocais do grupo com exérese de fragmento de mucosa de prega vocal a laser sem MTC foi de 2648,93 micrômetros quadrados, enquanto a média da área do colágeno total do grupo com exérese de fragmento de mucosa a laser e com MTC foi de 2200,30 micrômetros quadrados.

Na comparação efetuada, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos sob comparação e a hipótese alternativa a resultados diferentes. O valor de p foi de 0,0043 o que evidenciou diferença significativa entre a quantidade de colágeno entre o grupo submetido à exérese de fragmento de mucosa de prega vocal a laser tratado e não tratado com MTC .

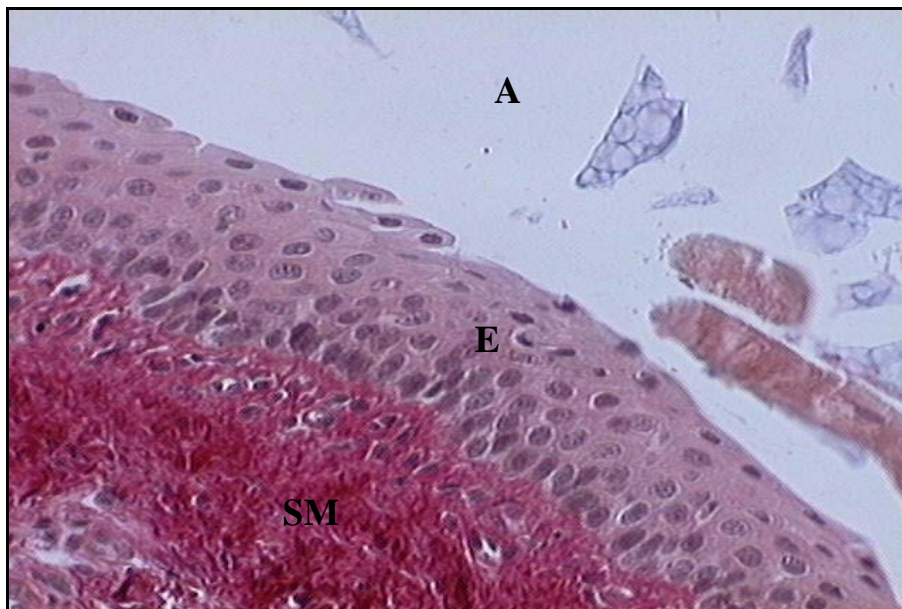
GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO COLÁGENO TOTAL NA EXERÉSE PARCIAL A LASER DE CO₂ COM E SEM MTC



MTC- Mitomicina-C, DP- Desvio Padrão, P- Nível de significância estatística

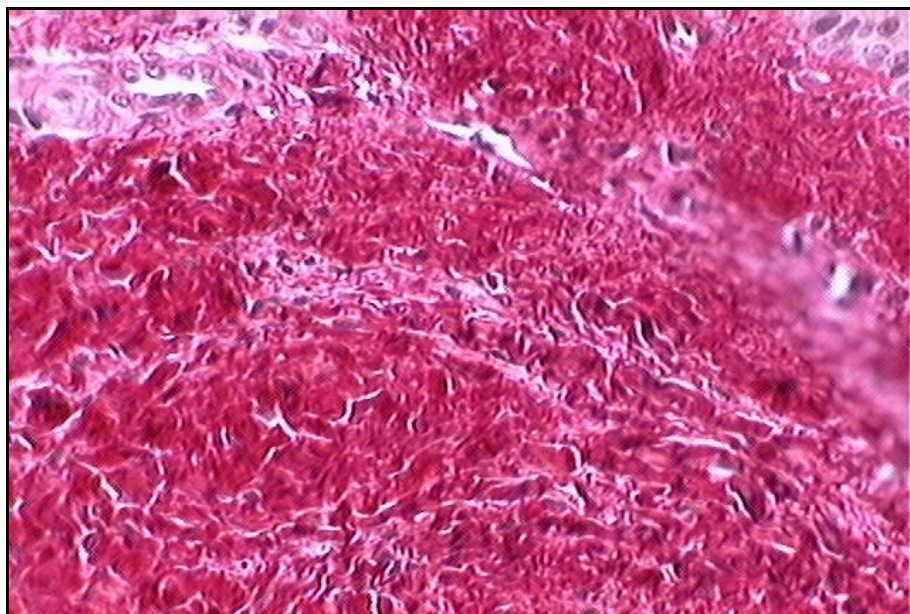
4.4 ASPECTO HISTOLÓGICO

FIGURA 19 – LÂMINA CORADA PELO *PICROSIRIUS RED* ANTES DA POLARIZAÇÃO DO COLÁGENO NO GRUPO CONTROLE



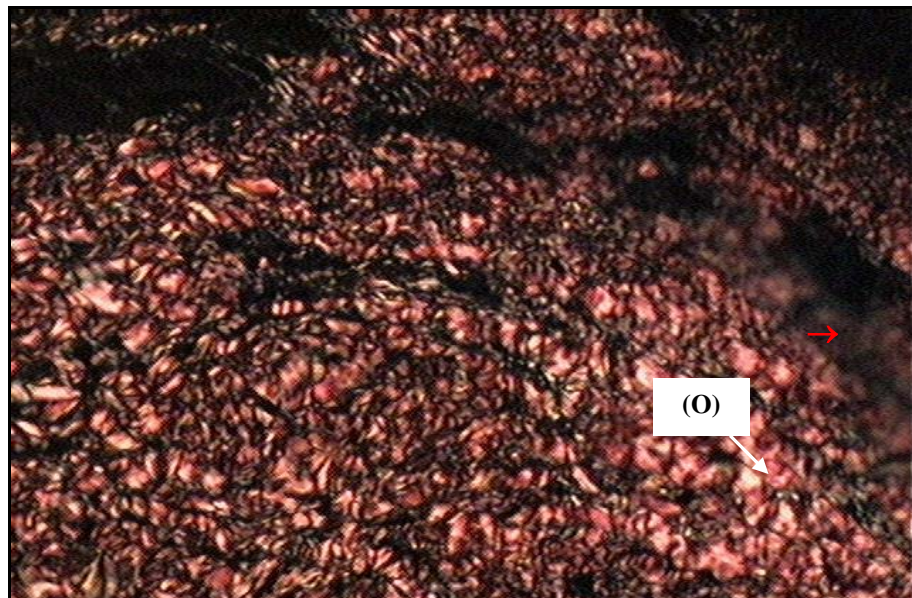
NOTA: Observa-se a substância amorfa (A) (corante de nanquim azul) que demarcava a região da lesão da prega vocal, epitélio de revestimento do tipo respiratório (E), Submucosa (SM)

FIGURA 20 – LÂMINA CORADA PELO *PICROSIRIUS RED* DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO DA LÂMINA PRÓPRIA ANTES DA POLARIZAÇÃO



NOTA: Esta lâmina demonstra a região da submucosa da prega vocal antes da polarização, não havendo distinção entre os elementos celulares e o tecido conjuntivo.

FIGURA 21 - LÂMINA CORADA PELO *PICROSIRIUS RED* DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS A POLARIZAÇÃO



NOTA: Observa-se o caráter birrefringente do colágeno, coloração laranja e vermelho(O)em comparação com a substância não-colágeno enegrecida (→)

5 DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

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 concluíram que além das quantidades dessas substâncias serem semelhante na raça humana, apresentam plano de dissecção similar. Em estudo laringo estroboscópico, concluíram que o cão é o melhor animal para o estudo funcional da laringe. SANTOS, et al, (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 exigia 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 eram 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.

5.2 USO DA MTC TÓPICA NAS PREGAS VOCAIS

Mesmo com as técnicas atuais de preservação da mucosa e do ligamento vocal, a formação de cicatriz, fibrose e, conseqüentemente, rigidez continuam sendo um desafio para o fonocirurgião GARRET, et al, (2001). A MTC vem ganhando espaço desde que estudos comprovaram sua eficácia na redução da fibrose pós-operatória em estenoses laríngeas supra-glóticas SENNES, et al, (2003). GRAY, et al, (2003), observaram que a MTC apresentava efeito maior no atraso da cicatrização, quando aplicada imediatamente antes e após o dano ao tecido, sugerindo que existiria um intervalo de tempo adequado entre a lesão e o tempo de aplicação para a obtenção de efeito adequado. SPECTOR, et al, (1999), demonstraram redução significativa na formação de granulomas e melhora da mobilidade cricoaritnoidéia quando utilizado o laser de CO₂ com MTC tópica. No trabalho de GARRET, et al, (2001) os autores constataram

diminuição do colágeno total com o uso de MTC no grupo experimento, comparando-se com o grupo controle, no qual não foi usada a MTC tópica. Os resultados do presente estudo comprovaram os dados de GARRET, et al, (2001) pois houve diminuição estatisticamente significativa do colágeno total com o uso da MTC. Esses resultados estão em concordância com o trabalho de GRAY, et al, (2003), no qual a MTC modula o processo de cicatrização, retardando o processo cicatricial. No quadro comparativo histológico, evidenciou redução significativa do colágeno total encontrado nas lesões de pregas vocais de suínos submetidos a lesão a laser de CO₂ no grupo tratado com MTC tópica.

Tais resultados sugerem que o uso tópico da MTC quando aplicada em área cruenta, age de maneira expressiva no retardo do processo de fibroplasia, concordando amplamente com os resultados de CORREA, et al, (1999).

5.3 MICROCIURURGIA LARÍNGEA A LASER DE CO₂

A escolha da técnica cirúrgica com o laser de CO₂ foi baseada nos estudos de JAKO, et al, (1972), que o empregou no tratamento de papilomatose laríngea e nas lesões malignas em estágios iniciais. Atualmente suas indicações têm aumentado significativamente com a evolução tecnológica desenvolvida nos últimos anos, como a diminuição do *microspot* e o uso do superpulso, minimizando, conseqüentemente, o dano termal sobre os tecidos vizinhos.

SANTOS, et al, (2003), compararam incisões em pregas vocais caninas realizadas com instrumento a frio e com laser de CO₂ avaliando, através de cortes histológicos, a quantidade de fibroplasia. Os resultados mostraram que a quantidade de colágeno das pregas vocais foi maior no grupo de animais submetidos a lesão com instrumental a frio do que com laser de CO₂. Portanto, o laser de CO₂, quando usado em baixa potência com *microspot* e com superpulso, é um método seguro em relação à deposição de colágeno quando comparado com instrumentos com lâmina a frio, evidentemente obedecendo-se os princípios fundamentais da fonomicrocirurgia.

5.4 MÉTODO DE COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

SWEAT, et al, (1964) introduziram na técnica histológica o corante vermelho sírio associado ao ácido pícrico (solução de *Picrosirius Red*). CONSTANTINI, et al, (1968), observaram que o vermelho sírio aumentava a birrefringência das fibras colágenas quando estudada em microscópio de polarização. No presente trabalho foi utilizada a solução de *Picrosirius Red*, associada à microscopia polarizada pela sua grande sensibilidade e especificidade. Trata-se de método simples, eficiente pois além de identificar as fibras colágenas é capaz de diferenciá-las em colágeno tipo I, II e III através da birrefringência, conforme demonstrado anteriormente por JUNQUEIRA, et al, (1978); JUNQUEIRA, et al, (1979); SZENDRŐI, et al, (1984); RABAU, et al, (1994); HIRSHBERG, et al, (1996); HIRSHBERG, et al, (1999).

SANTOS, et al, (2003) avaliaram, através de cortes histológicos corados pelo solução de *Picrosirius Red* a quantidade de colágeno depositada sobre as pregas vocais caninas e concluíram que a solução de *Picrosirius red* juntamente com a microscopia de polarização, demonstra com mais nitidez as fibras colágenas

Alguns estudos sugerem que as diferentes birrefringências observadas à polarização após o uso de solução de *Picrosirius Red* podem avaliar a fase do processo cicatricial, sendo encontrado colágeno esverdeado imaturo no início da cicatrização e fibras colágenas maduras altamente birrefringentes e de cor laranja ou vermelha em processos fibróticos inativos tardios.

5.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo foi demonstrado que o uso da MTC tópica, quando aplicada em área cruenta da prega vocal associa-se à redução significativa da deposição do colágeno. A aplicabilidade prática deste estudo poderia relacionar-se a hipotética extensão destes resultados na clínica diária. Assim, podemos exemplificar diferentes grupos de situações em que pacientes de diversas especialidades poderiam se beneficiar do conhecimento médico deste tema.

Otorrinolaringologia

A) Estenose laríngeas de diversas etiologias, pós entubação, trauma, granulomatoses de Wegener, congênita e idiopática, cirurgias laríngeas pós

microflaps.

B) Pós cirurgias nasais como septoplastias associadas ou não a turbinectomias, cirurgias endoscópicas nasossinusais, dacriocistorinostomias.

C) Pós timpanocentese, cirurgias de descompressão do saco endolinfático.

Oftalmologia

No tratamento de pterígeo, e nas prevenções de re-estenoses em cirurgias de glaucoma.

Clinica cirúrgica

Em todos os procedimentos nos quais o processo cicatricial poderia de alguma forma interferir no resultado final.

Estudos futuros com amostras maiores e com maior tempo de seguimento serão necessários para confirmar estes resultados e para definir a concentração e tempo ideal da aplicação da MTC tópica.

Por outro lado, estabelecer a menor dose efetiva, com o menor risco de efeitos colaterais é importante para aumentar a eficiência e segurança do tratamento.

6 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos neste modelo experimental pode-se concluir que a aplicação da MTC tópica após 30 dias da exérese de fragmento de mucosa nas pregas vocais utilizando laser de CO₂ resulta em:

1: Diminuição da área total de colágeno com MTC tópica quando comparadas com as pregas vocais submetidas a exérese de fragmento de mucosa a laser de CO₂ sem MTC tópica

2: O uso da MTC tópica não se associa à formação de sinéquias pós operatórias.

7 REFERÊNCIAS

- ABITBOL, J. Atlas of Laser Voice Surgery. Singular. San Diego, p.1-21, 1995.
- BOUCHAYER, M.; CORNUT, G. Microsurgery for benign lesions of the vocal folds. Ear Nose Throat J, v. 67 p.446-66, 1988.
- BRADNER, W.T. Mitomycin-C: a clinical update. Cancer Treat Rev, V.27 P.35/50, 2001
- BRASKÉN, P.; SAGE, H. Structurally distinct collagen types. Annu. Rev. Biochem, v.49 p.957-1003, 1980.
- BRUNETAUD, J.M.; DECOMPS, B. – Les laser en médecine. La Recherche, v.13 p.1122-1129, 1982.
- CHUNG, J.H.; COSENZA, M.J.; RAHBAR, R.; METSON, R.B. Mitomycin for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: randomized, controlled study. Otolaryngol Head Neck Surg, v.126 p.468-474, 2002.
- CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals : part 2. Laboratory animals, v.31 p.1-32, 1997.
- CONSTANTINE, V.S., MOWRY, R.W. The selective staining of human dermal collagen II. The use of Picrosirius red F3Ba with polarization microscopy. *J. Invest. Dermatol*, v.50 p.419-23, 1968.
- CORREA, A.J.; REINISCH, L.; SANDERS, D.L. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin-C in the canine model. Ann Otol Laryngol, v.108 p.1053-60, 1999.
- CROOKE, S.T.; BRADNER, W.T. Mitomycin-C: a review. Cancer Treat Rev, v.3 p.121-139, 1976.
- DICKE, R.H.; WITTKKE, J.P. Introduction to Quantum Mechanics. Londres, Addison–Wesley. p. 1453-60, 1960.
- ELIASHAR, R.; ELIASHAR, I.; ESCLAMADO, R.; GRAMLICH, T.; STROME, M. Can topical mitomycin C prevent laryngotracheal stenosis? Laryngoscope, v.109 p.1594-600, 1999.

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.

GRAY, S.D.; TRITLE, N.; L.I, W. The effect of mitomycin C on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope*, v.113 p.237–242, 2003.

GREEN, H. *Morbid Growths Within the Larynx*. New York, GP Putnam, 1852.

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, M. Morphological structure of the vocal cord as vibrator and its variations. *Folia Phoniatica*, v.26 p.89-94, 1974.

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. *Journal of Oral Pathology Med*, v.28 p.410-412, 1999.

INGRAMS, D.R.; ASHTON, P.; DHINGRA, J.; SHAH, R.; SHAPSHAY, S.M. Slow-release 5 – fluorouracil and triancinolone reduces subglottic stenosis in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.109 p.422-4, 2000.

JAKO, G. J.; STRONG, M. S. Laser surgery in the larynx: early clinical experience with continuous CO₂ laser. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 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.368-373, 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.267-274, 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.447-455, 1979.

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.

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

PASCHOAL, J.R. – Efeitos da radiação laser de baixa potência sobre tecido vivo. Campinas, 1991. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP.

Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/COBEA. www.cobea.org.br/ética.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picrosirius red stained sections: A useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Hist Histopath*, v.9 p.525-528, 1994.

RAHBAR, R.; SHAPSHAY, S.M.; HEALY, G.B. Mitomycin C: effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.110 p.1-6, 2001.

REMACLE, M.; LAWSON, G.; WATELET, J.B. Carbon dioxide laser microsurgery of benign vocal fold lesions: indications, techniques and result in 251 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v.113 p.140-4, 1999.

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.148–152, 2004.

SANTOS, F.C.C.; GRELLET, M.; JUNIOR, A.R.; JAMUR, M.C.; PINTO, J.A.;

- FOMIM, D.S. Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO₂ em modelo animal. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v.69 p.753-9, 2003.
- SAVASSI-ROCHA, P.R.; LOPES, R.L.C. Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos. In: *Tópicos em Gastroenterologia*, J, Castro, L.P.; Savassi-Rocha, P.R.; Cunha-Mello, J.R., Rio de Janeiro, p.493-521, 1994.
- SCHILLING, J.A. - Wound Healing. *Surg Clin North Am*, v.56 p.859-874, 1976.
- SENNES, L.U.; TSHJI, R.K.; IMAMURA, R.; TSUJI, D.H. Mitomycin-C in the endoscopic treatment of laryngeal stenosis, *Arq Otorrinolaringol*, v.7 p.22-27, 2003.
- SPECTOR, J.E.; WERKHAVEN, J.A.; SPECTOR, N.C. Preservation of function and histological appearance of the injured glottis with topical Mitomycin-C. *Laryngoscope*, v.109 p.1125-9, 1999.
- SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S.I. Sirius Red F3BA as stain for connective tissue. *Arch Pathology*, v.78 p.69-72, 1964.
- SZENDRŐI, G.; VAJTA, L.; KOVÁCS, L.; SCHAFF, Z.; LAPIS, K. Polarization colours of collagen fibres: a sign of collagen production activity in fibrotic process. *Acta Morphologica Hungarica*, v.32 p.47-55, 1984.
- TOWNES, CH. Production of coherent radiation by atoms and molecules. Noble Lecture. 1964: I EEE Spectrum. p. 567-73, 1965.
- THORNTON, F.J.; BARBUL, H. Healing in the gastrointestinal tract, In: *Wound healing*, Barbul, A.,: *Surg. Clin. North Am; Philadelphia*, v.77 p.234-239, 1997.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. Normas para apresentação de documentos científicos. Curitiba: Editora da UFPR, v.10,2000.
- YAZAWA, Y.; SUZUKI, M.; KITANO, H.; KITAGIMA, K. Intraoperative Mitomycin C in endolymphatic sac surgery for Ménière disease : a pilot study. *Orl J Otorhinolaryngol Relat Spec*, v.61 p.188-194, 1999.