

MARCELO CHARLES PEREIRA

**EFEITO DA MITOMICINA C TÓPICA SOBRE OS DEPÓSITOS DE
COLÁGENO TOTAL NA SUBMUCOSA DAS PREGAS VOCAIS
ÍNTEGRAS DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Grau Acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

**CURITIBA
2006**

Pereira, Marcelo Charles

Efeito da mitomicina-C tópica sobre os depósitos de colágenos total na submucosa das pregas vocais íntegras de suíno.

- Curitiba, 2006.

xi, 62 f.

Dissertação (Mestrado) - Departamento de Cirurgia /Universidade Federal do Paraná, 2006.

Área Interunidades: Clínica médica/Otorrinolaringologia.

Orientador: Dr Jorge Eduardo Fouto Matias.

1. Prenga vocal. 2. Cicatrização. 3. Mitomicina-C tópica. 4. Suínos.5. Picrosirius *Red*. 6. Colágeno.

*Um homem não é mais do que o outro,
apenas faz mais do que o outro.
(Miguel de Cervantes)*

À minha mãe Cirene do Rocio Nicolack Pereira e ao meu pai Nereu Carlos Pereira, vocês me ajudaram a construir castelos no ar; não pensem que desperdiçaram seu trabalho, eles estão onde deveriam estar. Agora construo os alicerces e não esqueci que a gratidão é a memória do coração.

Há grandes corações que são perfeitamente viris e cuja presença é verdadeiramente um raio de sol. O seu contato muda nossa maneira de ser e ver as coisas, você querida Patrícia, que se viu privada da minha companhia, durante a elaboração deste trabalho, sentiu que esse momento era transitório como as nuvens do outono.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pela orientação, confiança e principalmente pelos ensinamentos, sempre com muito profissionalismo, mostrando o caminho a ser seguido com clareza e objetividade.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, co-orientador, meu respeito e muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Amadeu Bona Filho, diretor do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, pela receptividade e oportunidade de me proporcionar o desenvolvimento de meus experimentos na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná.

Ao Dr. Paulo Antonio Monteiro Camargo e Dr. Daniel Zeni Rispoli do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Angelina Caron pelo incentivo, dedicação e influência na minha carreira de cirurgião.

Ao Prof. Dr. Vinícius Ribas de Carvalho Duarte Fonseca, pelo apoio e amizade que atravessa os anos.

À Prof.^a Dr.^a Guiomar pela sua ajuda nas horas terríveis e confusas.

À Prof.^a Dr.^a Lúcia de Noronha, coordenadora da disciplina de Patologia do Curso de Medicina da Pontifícia Católica do Paraná, pela orientação no planejamento, preparo, interpretação, sugestão da técnica de coloração.

Ao Prof. Dr. Rogério Moreira, pela amizade e colaboração e companheirismo na seleção, fornecimento e anestésias dos animais do experimento.

Ao Rafael Augusto Pereira, meu irmão, por ter dividido comigo seus notórios conhecimentos em editoração.

À Ana Paula Camargo Martins, bióloga, responsável pelo laboratório de Patologia Experimental, pela confecção das lâminas para a histologia.

À Fabiane Bonafini Zanata Flizikoswski, pela paciência e colaboração durante toda a jornada na utilização do programa de captação de imagem e morfometria.

Aos professores Ary Elias Sabbag Junior da UFPR e Prof.^a Márcia Olandoski Erban do Centro Federal de Tecnologia do Paraná, pela elaboração da análise estatística.

Aos animais que proporcionaram notória contribuição ao desenvolvimento das técnicas e tratamento, convergindo significativamente para o avanço da ciência e trazendo benefícios à saúde dos humanos, meu respeito e gratidão.

Cabe ainda, o sincero reconhecimento às numerosas pessoas que sugeriram, refletiram, esclareceram e, de alguma ou outra forma colaboraram na produção deste trabalho; inclusive àqueles que, porventura tenham passado despercebidos, agradeço imensamente a solidariedade e a confiança.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 ANATOMIA DA LARINGE	14
2.1.1 CARTILAGENS DA LARINGE	14
2.1.1.1 Cartilagem tireóide	14
2.1.1.2 Cartilagem cricóide	15
2.1.1.3 Epiglote	15
2.1.1.4 Cartilagens aritenóide	15
2.1.1.5 Corniculadas (de Santorini)	16
2.1.1.6 Cuneiformes (de Wrisberg)	16
2.1.2 ÁDITO E CAVIDADE DA LARINGE	16
2.1.3 PREGA VOCAL	17
2.1.4 MÚSCULOS E INERVAÇÃO	17
2.1.5 COMPARTIMENTOS LARÍNGEOS	18
2.1.5.1 Andar glótico	18
2.1.5.2 Andar supraglótico	19
2.1.5.3 Andar infraglótico	19
2.2 FONOMICROCIRURGIA	19
2.2.1 FONOCIRURGIA	19
2.2.2 FONOMICROCIRURGIA	20
2.2.3 FISIOPATOLOGIA DA CICATRIZ DA PREGA VOCAL	21
2.3 FISIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO	21
2.3.1 FASE INFLAMATÓRIA OU INICIAL	22
2.3.2 FASE DE FIBROPLASIA OU PROLIFERATIVA	22
2.4 ESTRUTURA DO COLÁGENO	23
2.5 FARMACOLOGIA	26
2.5.1 USO DA MITOMICINA C	26
2.5.2 CORANTE PICRO-SIRIUS <i>RED</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODO	31

3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO	32
3.2 AMOSTRA	32
3.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS	32
3.4 ANESTESIA	33
3.5 PROCEDIMENTO PARA A APLICAÇÃO DE MMC TÓPICA	33
3.5.1 POSICIONAMENTO	33
3.5.2 INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO	33
3.5.3 OBSERVAÇÃO DAS PREGAS VOCAIS E MATERIAL AUDIOVISUAL	34
3.5.4 UTILIZAÇÃO DE MMC TÓPICA NO GRUPO EXPERIMENTO I E II	35
3.6 COLETA DAS LARINGES	36
3.7 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
3.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	39
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA	39
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4. RESULTADOS	42
4.1 PRESENÇA DE SINÉQUIAS	43
4.2 PESAGEM DOS ANIMAIS	43
4.3 QUANTIFICAÇÃO COMPUTADORIZADA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO.	43
4.4 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO	46
4.4.1 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO CONTROLE <i>VERSUS</i> GRUPO EXPERIMENTO 1	46
4.4.2 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO CONTROLE <i>VERSUS</i> GRUPO EXPERIMENTO 2	47
4.4.3 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO EXPERIMENTAL 1 <i>VERSUS</i> GRUPO EXPERIMENTO 2	47
5. DISCUSSÃO	49
5.1 MODELO EXPERIMENTAL	50
5.1.1 ESCOLHA DO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	50
5.1.2 ESCOLHA DA TÉCNICA PARA ESTUDO DA PREGA VOCAL ÍNTEGRA COM USO DE MMC TÓPICA	51
5.2 USO DA MMC EM PREGAS VOCAIS	51
5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO	53
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS	56
8. APÊNDICE	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FIBRAS DE COLÁGENO	24
FIGURA 2 -	FIBRAS RETICULARES	25
FIGURA 3 -	MOLÉCULAS DE MITOMICINA C	27
FIGURA 4 -	PICROSIRIUS <i>RED</i> ANTES DA POLARIZAÇÃO	28
FIGURA 5 -	PICROSIRIUS <i>RED</i> APÓS A POLARIZAÇÃO	30
FIGURA 6 -	INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO	34
FIGURA 7 -	MICROSCÓPIO CIRÚRGICO.....	34
FIGURA 8 -	EQUIPAMENTO DE CAPTAÇÃO E REPRODUÇÃO DE IMAGEM	35
FIGURA 9 -	APLICAÇÃO DE MMC	36
FIGURA 10 -	LARINGE DO PORCO RETIRADA POR INTEIRO DA BASE DA LÍNGUA AO QUARTO ANEL TRAQUEAL	37
FIGURA 11 -	INCISÃO MEDIANA ANTERIOR	37
FIGURA 12 -	VISUALIZAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE	38
FIGURA 13 -	INCISÃO RENTE A CARTILAGEM TIREÓIDE	38
FIGURA 14 -	EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS	40
FIGURA 15 -	EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> ANTES DA POLARIZAÇÃO	40
FIGURA 16 -	EXEMPLO DE POLARIZAÇÃO DA LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> APÓS A POLARIZAÇÃO	41
FIGURA 17 -	EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO DA LÂMINA PRÓPRIA ANTES DA POLARIZAÇÃO.....	44
FIGURA 18 -	EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS A POLARIZAÇÃO..	45
FIGURA 19 -	EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS A POLARIZAÇÃO..	45
FIGURA 20 -	EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS <i>RED</i> DEMONSTRANDO AS FIBRAS COLÁGENAS APÓS A POLARIZAÇÃO.	46
GRÁFICO 1 -	PESO DOS ANIMAIS EM GRAMAS NO DIA 0 E DIA 30	43
GRÁFICO 2 -	DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO TOTAL DA SUBMUCOSA DAS PREGAS VOCAIS NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS EM MICRÔMETROS QUADRADOS	48
QUADRO 2 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E OS VALORES DE <i>P</i>	44
QUADRO 1 -	QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO NA SUBMUCOSA DOS GRUPOS PESQUISADOS CURITIBA PARANÁ (2004)	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura
FEPAR	Faculdade Evangélica do Paraná
g	Gramas
HUEC	Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
IM	Intramuscular
IPEM	Instituto de Pesquisas Médicas
IV	Intravenosa
m	Metros
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/ml	Miligrama por mililitros
mm	Milímetros
MMC	Mitomomicina-C
ms	Milisegundos
PUC-PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
UFPR	Universidade Federal do Paraná
®	Marca registrada
μm^2	Micrômetro quadrado

RESUMO

Terapias adjuvantes para modular o processo cicatricial de pregas vocais têm sido objeto de estudo. Dentre elas, a utilização tópica de Mitomicina-C é considerado como método válido. Entretanto, poucos dados disponíveis existem sobre o comportamento dos processos de cicatrização. Este estudo teve como **objetivo:** 1) Estudar o efeito da aplicação tópica de Mitomicina-C em diferentes concentrações sobre os depósitos de colágeno total na submucosa de pregas vocais íntegras de suínos. **Material e Método:** os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, animais submetidos à aplicação de solução fisiológica 0,9 % tópica; grupo experimento 1, animais submetidos à aplicação de Mitomicina-C tópica na concentração de 4 mg/ml e grupo experimento 2, animais submetidos à aplicação de Mitomicina-C tópica na concentração de 8 mg/ml. Após 30 dias do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia, coletado amostras das pregas vocais e coradas pela técnica do picrossirius *red* com polarização para a quantificação computadorizada da deposição do colágeno, através do programa ProImage plus 4.5[®]. Compararam-se as médias de área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais de três grupos através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. **Resultados:** No grupo controle a média da área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais foi de 3.110,44 micrômetros quadrados; nas pregas vocais submetidas à aplicação de Mitomicina-C tópica, na concentração de 4 mg/ml, foi de 3.115,98 micrômetros quadrados; e nas pregas vocais com aplicação de mitomicina-C tópica, na concentração de 8 mg/ml, a média da área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais foi de 3.105,78 micrômetros quadrados. A mitomicina-C não promoveu a diminuição de deposição de colágeno total da submucosa de prega vocal íntegra quando, comparado o grupo controle com o grupo experimento 1 ($p=0,9156$), comparado o grupo controle com o grupo experimento 2 ($p = 0,9230$) e comparado o grupo experimento 1 e 2 ($p = 0,9022$). **Conclusões:** 1) A mitomicina-C aplicada topicamente em pregas vocais íntegras não altera significativamente a deposição de colágeno na submucosa.

Palavras-chave: Cicatrização, mitomicina-C, Prega vocal, Porcos.

ABSTRACT

Adjuvant therapies in order to handle the healing process of vocal folds have been studied, including the use of Mitomycin-C topically, is considered as valid method. **Purpose:** The aim of this study was to compare the effect of Mitomycin-C in different concentration, administered topically to the surface of pig's vocal folds, on the submucosal collagen deposit. **Methods:** Animals were divided into 3 groups: experimental groups 1 and 2 that received Mitomycin-C topically at concentrations of 4 mg/ml and 8 mg/ml respectively, and the control group which was not exposed to the Mitomycin-C. After 30 days of Mitomycin-C application all animals were sacrificed, vocal folds were collected and submitted to the picosirius *red* technique and collagen deposit was quantified by the computer program Pro Image Plus 4.5[®]. Mann-Whitney test was used to compare differences between parameters of each group. **Results:** The mean area of collagen deposit at the vocal 6folds submucosa were 3115,98 μm^2 , 3105,78 μm^2 , and 3110,44 μm^2 , of the experimental groups 1 and 2 and control group respectively. There were no statistical differences between the 3 groups. **Conclusions:** Mitomycin-C topically applied to normal pigs vocal folds did not modified the submucosal collagen deposition.

Key-words: Healing, Vocal fold, Mitomycin-C, Pig.

1 . INTRODUÇÃO

A linguagem é a principal característica que difere os homens dos outros animais, torna-o único e superior e ajuda-o a construir sua própria história e deixar marcada sua evolução (CAPRA, 1995).

A voz humana é a função que possibilita a exteriorização da linguagem, permitindo a comunicação interpessoal e favorecendo as trocas lingüísticas que ampliam os conceitos e aprimoram o pensamento universal. Interferem na sua produção: Fatores anátomo-fisiológicos; perceptivos; emocionais e fatores sócio-culturais os quais são passíveis de alterações, podendo gerar uma disfonia quando a mensagem transmitida deixa de ser eficaz, comprometendo a comunicação (RIBEIRO, BORGES, ZACCBI e GUARALDO, 2004).

A Mitomicina-C é um agente antimetabólico que inibe a proliferação do fibroblasto quando aplicado topicamente. Esta propriedade tem sido utilizada freqüentemente na oftalmologia para reduzir a formação de cicatriz (RABAU e DAYAN, 1994). Recentemente, a Mitomicina-C demonstrou ter sucesso quando utilizado experimentalmente para o tratamento da estenose subglótica e estenose glótica posterior. Nestes estudos, a cicatrização anormal e estenose foram moduladas e substituídas pelo retorno da mucosa de revestimento, pelo uso tópico de Mitomicina-C (ELIASHAR, ESCLAMADO, GRAMLICH e STROME, 1999).

Vários trabalhos na literatura demonstram a eficácia da Mitomicina C em reduzir a formação da cicatriz e descrevem o seu mecanismo de ação pela inibição e bloqueio da síntese do DNA, prevenindo a proliferação do fibroblasto em área cirúrgica (ELIASHAR et al., 1999). Esta característica faz com que haja menor formação de tecido cicatricial na área em que a substância é aplicada (IHNAT, LARIVIERE e WARREN, 1997). Sua ação está ligada diretamente à sua concentração e ao tempo em que ela é mantida em contato com o ferimento (WARD e APRIL, 1998). Esse comportamento, de certa forma, leva a expectativa de que maiores concentrações e maior tempo de exposição possam causar maior efeito biológico.

Devido ao pequeno calibre da luz da laringe o contato acidental da Mitomicina-C em superfície mucosa íntegra pode ocorrer, porém não foi encontrado na literatura trabalhos que demonstrassem efeito dessa exposição.

1.1 OBJETIVO:

Estudar o efeito da aplicação tópica de Mitomicina-C em diferentes concentrações sobre os depósitos de colágeno total na submucosa de pregas vocais íntegras de suínos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA DA LARINGE

GARDNER, GRAY e O'RAHILLY (1995) definem laringe como a parte mais superior da traquéia, possuindo tríplice função:

- age como uma válvula protetora, impedindo a passagem de partículas alimentares na via respiratória e do ar para o esôfago durante a deglutição;
- é via aerífera, conduzindo o ar à traquéia e as vias aéreas inferiores e membranas alveolares para que ocorram as trocas gasosas;
- é órgão essencial da formação dos sons (função vocalizadora).

Conceitualmente, a laringe é um arcabouço esqueletomembranoso com as funções de respiração, fonação e proteção das vias aéreas. A origem da laringe é mista, endodérmica e mesodérmica. Sua mucosa tem origem endodérmica, sendo derivada do intestino cefálico. As cartilagens e os músculos têm origem do mesênquima. Durante a puberdade no homem, a laringe cresce rapidamente em tamanho e as pregas vocais tornam-se cerca de 1 cm mais longas, fazendo com que o limite inferior do tom de voz caia uma oitava. Nas mulheres, estas alterações, inclusive no tom de voz, são mais acentuadas. A laringe é palpável anteriormente, sendo importante referencial em anatomia de superfície. Relaciona-se posteriormente com a laringo-faringe (CARDOSO e RUBINSTEIN, 2004).

2.1.1 CARTILAGENS DA LARINGE

Temos na laringe três cartilagens ímpares e três pares. As ímpares tireóide, cricóide e epiglote e as pares aritenóide, corniculada e a cuneiforme. A tireóide, cricóide e aritenóide são cartilagens hialinas e podem sofrer calcificações que se inicia após os vinte anos de idade. As restantes são cartilagens elásticas (CAMARGO, RISPOLI e PEREIRA, 2002).

2.1.1.1 Cartilagem tireóide

É a maior das cartilagens laríngeas, mediana e única; está constituída por duas lâminas divergentes, o que lhe confere a forma de escudo e justifica sua etimologia. No ponto de união das lâminas, isto é, superiormente 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 uma articulação sinovial, portanto, sujeita à artrite. As lâminas da cartilagem tireóide possuem um reparo anatômico superficial nos seus $\frac{3}{4}$ posteriores, a linha oblíqua, que corresponde a ponto de inserção de vários músculos extrínsecos da laringe: omohióideo, esternotireóideo e constritor inferior. Internamente, as lâminas são revestidas por mucopericôndrio, exceto na comissura anterior (porção interna do ângulo). Neste local, temos a inserção de duas pregas vestibulares e duas pregas vocais. Esses ligamentos penetram no pericôndrio, formando uma estrutura denominada ligamento de Broyle, que contém vasos sanguíneos e linfáticos, consistindo em um local de disseminação de tumores laríngeos.

2.1.1.2 Cartilagem cricóide

É o único anel esquelético completo da laringe. 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. 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.

2.1.1.3 Epiglote

Cartilagem única, em forma de folha. Sua porção inferior é intralaríngea, 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 3 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 aritenóide, formando as pregas ariepiglóticas. A epiglote apresenta depressões nas quais se alojam glândulas e forames, através dos quais passam nervos e vasos sanguíneos (GARDNER et al., 1988).

2.1.1.4 Cartilagens aritenóide

Têm a forma de pirâmide, com ápice superior e base inferior. A partir da base temos os processos muscular e vocal. Articula-se 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 aritenóide, 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 (PEARSON, 1994).

2.1.1.5 Cartilagens corniculadas (de Santorini)

Articulam-se com o ápice das aritenóide através de uma sindesmose, e têm forma cônica.

2.1.1.6 Cartilagens cuneiformes (de Wrisberg)

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

2.1.2 ÁDITO E CAVIDADE DA LARINGE

O ádito é a entrada da laringe e encaminha o ar da laringo-faringe para a cavidade da mesma. Seus limites são à borda da epiglote, as pregas ariepiglóticas e, posteriormente uma prega que une as cartilagens aritenóide. O fechamento do ádito protege a via respiratória contra a penetração de partículas alimentares e corpos estranhos.

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. Atualmente, a glote corresponde às pregas e aos processos vocais. O intervalo entre as pregas e os processos vocais de um lado e do outro é a rima da glote. As pregas vocais estendem-se da cartilagem tireóide ao processo vocal da cartilagem aritenóide e incluem o ligamento e o músculo vocal, revestido pela mucosa. A parte mais anterior da rima da glote, localizada entre as pregas vocais, é sua parte intermembranosa, enquanto que a porção que se situa entre os processos vocais é a parte intercartilaginosa (CARDOSO e RUBINTEIN, 2004).

2.1.3 PREGA VOCAL

De estrutura vibrátil, a prega vocal é responsável pela produção das vibrações sonoras que se repetem sucessivamente e regularmente durante a fonação. No início de cada ciclo vibratório, as pregas vocais estão aproximadas com fenda glótica praticamente inexistente. Esta situação permite que haja aumento da pressão subglótica. Tal pressão abre gradualmente a glote numa posição de inferior para superior. Em seguida, ocorre o fechamento da glote no mesmo sentido, tornando completa a onda mucosa. A seqüência é repetida, de modo que a glote produz pulsos de ar que se difundem como o som, sendo posteriormente modificados e articulados na faringe, cavidade oral e nariz. Este processo complicado exige uma perfeita coordenação entre as musculaturas laríngea e torácica.

A laringe tem na sua composição, servindo-lhe de base, músculo e mucosa. A mucosa é constituída, em geral, por epitélio cilíndrico ciliado, salvo ao nível das cordas vocais, que estão cobertas por um epitélio estratificado do tipo pavimentoso não queratinizado, que se encontra igualmente sobre a face posterior da epiglote, e sobre a parte anterior das aritenóides.

A mucosa recobre um córion abundante em fibras colágenas e elásticas. A camada mais superficial da lâmina própria forma um espaço virtual denominado espaço de Reinke, entre o epitélio e a camada mais densa da lâmina própria. O trauma das pregas vocais pode causar um edema desse espaço, resultando em edema difuso de ambas as pregas, constituindo o edema de Reinke.

As pregas vocais apresentam propriedades biomecânicas, apresentando-se como um meio viscoelástico, cuja complacência e elasticidade variam segundo a ação da musculatura extrínseca, permitindo a fonação. Porém, enquanto as pregas vocais são de importância na produção da voz, as pregas vestibulares desempenham uma função protetora, mas não participam da fonação. É possível que as pregas vestibulares entrem em contato durante a deglutição.

2.1.4 MÚSCULOS E INERVAÇÃO:

Identificam-se na laringe dois grupos musculares: extrínsecos ou levantadores da laringe e os intrínsecos que se originam da cartilagem cricóide. Todos inervados pelo ramo adutor do nervo laríngeo recorrente. O músculo cricotireóide, inervado pelo ramo externo do nervo laríngeo superior, é considerado o principal tensor da laringe. Já o músculo

cricoaritenóide posterior, innervado pelo ramo abductor do nervo laríngeo recorrente, é considerado o único músculo abductor da prega vocal.

O nervo vago tem como origem principal de suas fibras o núcleo ambíguo, localizado entre o bulbo e a medula. Deixando o crânio através do forame jugular, juntamente com os nervos glossofaríngeo e acessório. O nervo laríngeo deixa o tronco principal do nervo vago logo após a saída do forame jugular, após o gânglio nodoso. Os nervos laríngeos, após deixarem o tronco principal do nervo vago, fazem um trajeto diferente. Ao lado direito, o nervo laríngeo recorrente faz um arco ao redor da subclávia, e ao lado esquerdo faz um arco ao redor da crossa da aorta.

A mucosa da laringe é innervada por dois nervos: o ramo interno do nervo laríngeo superior e o nervo laríngeo recorrente. O primeiro inerva a mucosa da laringe 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 laríngeo superior e do laríngeo recorrente.

A laringe é irrigada pelas artérias laríngeas superior e inferior, derivadas respectivamente, das artérias tireóideas superior e inferior. Elas acompanham os nervos laríngeo interno e recorrente. As veias acompanham as artérias e drenam para a veia jugular interna.

A laringe tem uma rica rede linfática, sobretudo na supraglote; a exceção fica por conta das pregas vocais, onde praticamente não existem linfáticos. Essa rede drena para linfonodos contralaterais.

2.1.5 COMPARTIMENTOS LARÍNGEOS:

A cavidade laríngea é dividida em três andares:

2.1.5.1 Andar glótico

Constituído pelas cordas vocais que limitam entre si à 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 se estende da corda vocal a superfície interna da cricóide denominada cone elástico.

2.1.5.2 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 ou pregas ventriculares, que delimitam com as cordas verdadeiras um espaço, o ventrículo laríngeo ou de Morgani.

2.1.5.3 Andar infraglótico

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

2.2 FONOMICROCIRURGIA

2.2.1 FONOCIRURGIA

É uma área de expansão dentro do campo da otorrinolaringologia, embora o termo somente tenha aparecido por volta de 1963, mas os laringologistas já pregavam os seus princípios básicos muito antes.

Um estudo feito por BOUCHAYER e CORNUT (1988) relatou uma melhora no fechamento glótico e na qualidade vocal, após a realização de *microflap*, seguido da injeção de esteróides em prega vocal.

Atualmente as técnicas de fonocirurgia, estão fundamentadas nos progressos recentes da compreensão dos mecanismos fisiológicos da prega vocal. Posto isto, duas posições pode-se estabelecer: a primeira com a descrição expressiva de HIRANO (1993) sobre a teoria do corpo e cobertura, durante a vibração da prega vocal, e a segunda, tendo-se um melhor entendimento sobre fisiopatologia das lesões benignas da prega vocal. Desta forma, os laringologistas iniciaram por desenvolver e utilizar técnicas cirúrgicas mais conservadoras visando reconhecer os resultados funcionais segundo COUREY (1996).

Porém, focalizando a prática clínica COLEMAN, SMITH e REINISCH (1999), nessa mesma realidade estudada, apenas com diferença de animais, não notaram nenhuma diferença entre a função da prega vocal medida por videoestroboscopia, numa investigação em que foi usado como experimento um modelo canino, com a injeção de corticosteróide que foi aplicada antes da realização de *microflap*. No grupo que serviu de experimento não se observou nenhuma diminuição cicatricial com o uso do produto.

Os autores anteriormente citados apontam às técnicas de *microflaps* que foram desenvolvidas para permitir dissecar e realizar a excisão de cistos, pólipos e nódulos maduros na camada superficial da lâmina própria, enquanto é resguardada a mucosa normal adjacente, assim como seu ligamento vocal subjacente.

O objetivo desta técnica é minimizar a formação da cicatriz, endurecimento e aderência da cobertura da mucosa, a qual vai resultar no prejuízo da vibração da prega vocal. Estas técnicas demonstraram apresentar resultados objetivos e também subjetivos da prega vocal e da qualidade da voz. Na experiência de GARRETT (2001), o possível resultado de qualquer excisão da prega vocal ainda é a formação de cicatriz.

Para ajudar a modular o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas de prega vocal tem sido investigada terapia adjuvante. Esteróides tem sido utilizado clinicamente, tanto o sistêmico quanto o tópico, como tratamento empírico para reduzir a formação de cicatriz.

2.2.2 FONOMICROCIRURGIA

Nas últimas décadas, inovações tecnológicas levaram a ganhos substanciais na microcirurgia laríngea da prega vocal. Estas inovações resultaram em aumento do entendimento dos princípios fisiológicos da produção laríngea do som e ao uso do estroboscópio para análise das oscilações da prega vocal (HIRANO, 1991). Como variação do termo aplicado por VON LEDEN (1991) o termo fonomicrocirurgia foi introduzido em 1995 (ZEITELS, 1995). A fonomicrocirurgia é um meio de preservação máxima das camadas da microestrutura da prega vocal formada pelo epitélio e lâmina própria. A fonomicrocirurgia não inclui procedimentos transcervicais de mudanças do padrão vocal. A precisão é o pilar na execução de qualquer procedimento endolaríngeo, especialmente na fonomicrocirurgia (ZEITELS, 2000).

ZEITELS (2000) definiu os fundamentos da fonomicrocirurgia: (1) não utilização da retração bimanual de tecidos e incisões externas; (2) dissecação subepitelial e realização de técnicas de *microflaps*; (3) o uso de campo operatório imóvel e estável; (4) magnificação adequada de imagens; (5) afastamento de tecidos supraglóticos que possam obscurecer a visualização do campo operatório. Este procedimento tem ainda como vantagens, controle da avulsão, melhor cicatrização, reepitelização secundária e precisão.

2.2.3 FISIOPATOLOGIA DA CICATRIZ DA PREGA VOCAL

A cicatriz de prega vocal ocorre na lâmina própria de prega vocal, resultando perda da flexibilidade desta lâmina. A lâmina própria (predominantemente a camada superficial), funciona como um *tether* (corda elástica) entre o epitélio da prega vocal e as camadas mais profundas das pregas vocais - o músculo tiroaritenóide (HIRANO, 1993).

Na explicação de BENNINGER (1996), a cicatriz da prega vocal é uma das mais desafiantes em razão da alteração ocasionada pela patologia instalada em mucosa e submucosa e dificuldade na reabilitação da disfonia. O pesquisador comparou as técnicas “frias” com a técnica a laser de CO₂, na ressecção de nódulos, pólipos e cistos nos bordos livres das cordas vocais, e concluiu que não há diferença clínica nos pós-operatórios obtidos, utilizando-se uma ou outra técnica. Deste modo, quando ocorre regeneração tecidual, forma-se cicatriz pela proliferação do tecido conjuntivo, pois quando ocorre a exeresse de certas lesões, normalmente não se preserva a camada superficial da lâmina própria ocasionando uma hipercicatrização.

ROSEN (2000) afirma que com a perda do *tether* (corda elástica), a vibração da prega vocal é rigidamente prejudicada e resulta na incompetência do fechamento glótico que se torna incompleto. E esse processo conseqüentemente ocasionaria a perda de ar durante a fonação.

2.3 FISIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO

Cada vez que ocorre lesão tecidual no organismo, não importando qual o agente causal, a perda é reparada por um conjunto de fenômenos que leva, invariavelmente, à tentativa de reparação que ocorre em fases distintas, complexas, dinâmicas e sobrepostas. A liberação de mediadores ocorre como uma cascata atraindo estruturas à periferia da região traumatizada, PEARSON (1994) relata que a ferida constitui uma solução de continuidade, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a que o organismo recorre para restaurar sua integridade, quer do ponto de vista funcional, quer do estético. A cicatrização é um evento biológico complexo, envolvendo inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação.

JUNQUEIRA (1995) identifica três fases consecutivas no processo de cicatrização:

- fase inflamatória ou inicial;
- fase fibroplasia ou proliferativa;
- fase de maturação ou remodelação.

2.3.1 FASE INFLAMATÓRIA OU INICIAL

Inicia logo após o trauma, caracterizado por vasodilatação e diminuição do fluxo sanguíneo; independe do tecido agredido e sua intensidade correlaciona-se com o tipo e grau de agressão. A ferida é inicialmente hipóxica, hiperglicêmica, acidótica, hipercalêmica e hiperlática. A derme não é muito envolvida nos estágios iniciais da cicatrização. Sua duração é de aproximadamente 48 a 72 horas. Mediadores químicos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos leucócitos - neutrófilos combatem os agentes invasores e macrófagos realizam a fagocitose.

Duas populações celulares são importantes na fase inflamatória: os polimorfonucleares neutrófilos e os monócitos. A cicatrização reflete os efeitos integrados de um grande número de fatores de crescimento e mediadores da inflamação, presentes num ambiente tipicamente hipotóxico e acidótico.

2.3.2 FASE DE FIBROPLASIA OU PROLIFERATIVA

Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do chamado tecido de granulação e sua principal característica é a presença de fibroblasto por volta do segundo ou terceiro dia após o trauma. Produzem matriz extracelular, colágeno e glicosaminoglicanos, participando na remodelação do tecido normal e no processo de reparação e, também, estão relacionados com o mecanismo de reabsorção do colágeno.

Um dos primeiros eventos da cicatrização é a produção de fibroconectinas, que são glicoproteínas de dois tipos: as plasmáticas, produzidas e secretadas pelo hepatócitos e celulares, sintetizadas por fibroblastos, células endoteliais, ceratinócitos e macrófagos. Parecem ser essenciais para a cicatrização; aparecem precocemente na lesão, aderem simultaneamente na fibrina, colágeno, glicosaminoglicanos e outras moléculas de fibronectina, formando a cicatriz que serve para adesão e imigração celular, sendo essencial para o depósito de colágeno, facilitando o crescimento dos fibroblastos.

Considerados estes fatos, a fibroplasia ocorre de forma ímpar e, portanto fundamental. Assim, o fibrogênio presente no exsudato inflamatório converte-se em fibrina, que forma uma rede em cujas malhas depositam-se os fibroblastos. Como a fibroplasia é sempre acompanhada de proliferação vascular, naquela situação, as células endoteliais produzem um fator ativante do plasminogênio que reduz a quantidade de fibrina, permitindo assim, a deposição dos fibroblastos, que se multiplicam e passam a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial.

A neoformação vascular é necessária para a oxigenação e nutrição da ferida. Desta maneira, formam-se brotos endoteliais, cujas células se multiplicam com grande velocidade, constituindo cordões que se entremeiam com os fibroblastos e seus produtos. Estes cordões canalizam-se permitindo o fluxo sangüíneo, formando assim, um substrato tecidual de aspecto peculiar, granuloso e avermelhado: *tecido de granulação*.

No tecido de granulação, diferencia-se uma célula denominada miofibroblasto, que confere capacidade contrátil ao tecido de granulação, facilitando a epitelização. Estão envolvidos na contração da ferida, na adesão celular e podem participar da reabsorção da matriz extracelular.

A atividade do fibroblasto no tecido de granulação começa a declinar e desaparece por volta do décimo quinto dia. Uma vez cessada a hiperplasia, os fibroblastos passam a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação, ou seja, os componentes da substância fundamental e o colágeno. A presença deste começa a ser notada após o sexto dia, quando os níveis elevados da substância fundamental começam a declinar.

2.4 ESTRUTURA DO COLÁGENO

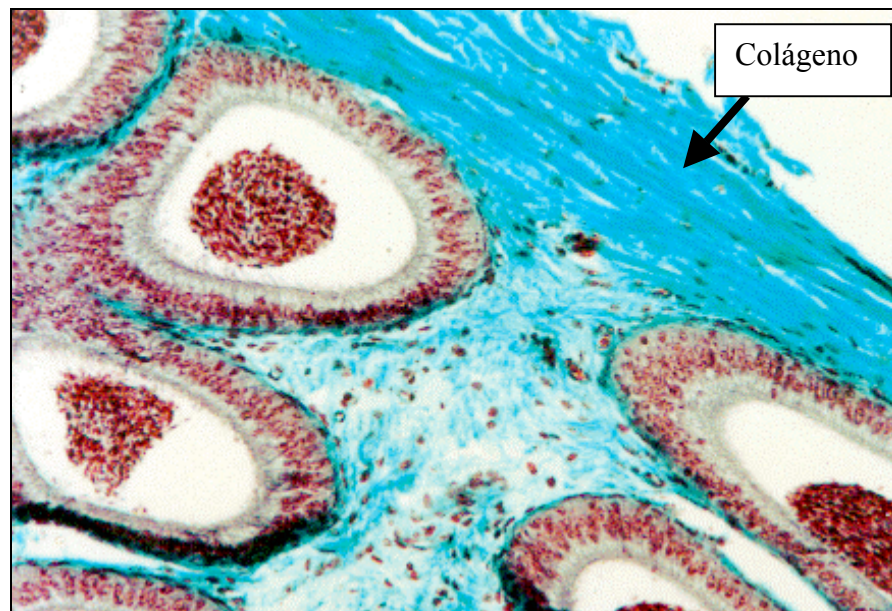
O tecido conjuntivo se caracteriza por apresentar células separadas por abundante matriz extracelular, células próprias e outras migratórias, provenientes do tecido sangüíneo. As células próprias do tecido conjuntivo são os fibroblastos, os macrófagos, os mastócitos e os plasmócitos. Vários tipos de leucócitos, células do sangue, penetram no conjuntivo para exercerem funções específicas.

O fibroblasto é a célula principal do tecido conjuntivo. No estado ativo, o fibroblasto apresenta núcleo grande e citoplasma rico em retículo endoplasmático granular de Golgi desenvolvido. São responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular, que por sua vez separa as células do conjuntivo, é formada por fibras e substância intercelular amorfa. Existem três tipos principais de fibras no conjuntivo: **fibras colágenas, fibras reticulares e fibras elásticas**. A proteína do colágeno é uma das mais abundantes do corpo, e faz parte da constituição das fibras colágenas e reticulares.

As fibras colágenas são formadas por fibrilas de colágeno com um padrão de estriações típico. Os colágenos constituem uma família de proteínas separadas em tipos diferentes (JUNQUEIRA, 1995), dentre os quais os tipos:

- I - Que forma fibras e feixes resistentes, encontrados nos tendões, ligamentos, cápsulas e derme; constitui o colágeno mais importante do ponto de vista estrutural.
- II - Encontrado nas cartilagens hialinas e elásticas; são fibras muito finas, as quais se vêem com dificuldade ao microscópio óptico, porém se vêem com facilidade no microscópio eletrônico.
- III - Colágeno que forma as fibras reticulares aparece com muita frequência vinculado ao músculo liso, é fundamentalmente o colágeno das vísceras, também esta presente na pele, envolta dos nervos e vasos sanguíneos.
- IV - Encontrado nas lâminas basais, ou seja, aquelas estruturas que separam geralmente os epitélios dos tecidos conjuntivos.
- V - Faz parte especificamente da membrana basal da placenta, órgão especial e transitório, sua citação é somente para dar um exemplo de como a proteína se adapta a distintas funções biológicas que vão aparecendo com a evolução das espécies.

FIGURA 1 - FIBRAS DE COLÁGENO

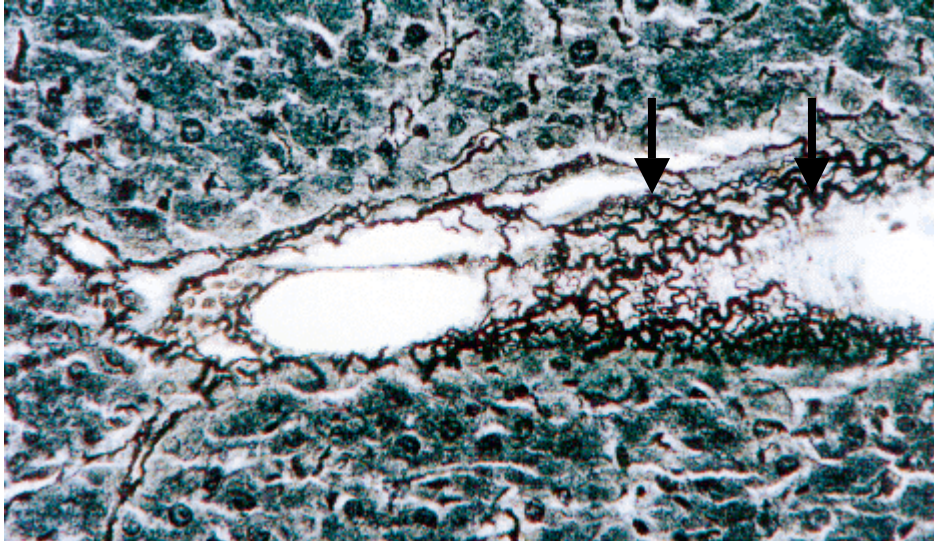


FONTE: FONSECA (2003)

Neste corte histológico (fig. 1) fibras colágenas apresentam-se coradas com róseo pela eosina, em azul pelo tricrômico de Mallory, (seta) em verde pelo tricrômico de Gomori e em vermelho pelo Van Gienson. Deve-se observar neste corte longitudinal as fibras de

colágeno (em verde) na cápsula e no tecido conjuntivo entre os ductos epididimários, tricrômico de Gomori.

FIGURA - 2 FIBRAS RETICULARES (SETAS)



FONTE: FONSECA (2003)

As fibras reticulares são, em comparação com as fibras do colágeno, mais finas e delicadas. Estas fibras só são observadas em cortes corados pela impregnação argêntea ou pela técnica de PAS. Estas fibras são observadas em contato íntimo com as células, formando o arcabouço dos órgãos hematopoéticos, glândulas, fibras musculares, entre outros. São conhecidas como fibras argirófilas do tecido conjuntivo (fig. 2 setas).

A origem do quelóide não é só celular, porque o colágeno que atua no processo é uma matéria que não está contida celularmente, pois funciona como uma espécie de “cimento” e provoca a cicatrização exacerbada.

Os fibroblastos produzem o colágeno; eles sofrem com o tempo a maturação de jovem e adulto. Nessa passagem, a célula dá condições para que se eleve em quantidade exagerada o tecido. Essas lesões fibroblásticas podem apresentar mínimas diferenças nos aspectos clínicos e histopatológicos, mas representam tipos distintos de crescimento de tecido e exigem terapêutica de certa forma diversa (ORGILL e DEMLING, 1988).

2.5 FARMACOLOGIA

2.5.1 USO DA MITOMICINA-C

A Mitomicina-C é um antibiótico que demonstrou inibir a proliferação de fibroblastos quando utilizada topicamente. Esta substância é produzida pelo *Streptomyces caespitosus* isolada por WAKAKI, MIYAMURA, SHIGENO, MATSUI e UZU (1958). PUCHTER, MELOAN e WALDROP, (1998) relatam ação da Mitomicina-C na matriz dos genes de expressão extracelular pró-oncogenese.

Sendo uma substância quimioterápica, é usada no tratamento de adenocarcinomas de estômago, colón e pâncreas, assim como no tratamento de câncer de mama e de bexiga. Segundo FRUCHT e ROZENMAN (1994), ela passou a ser usada como quimioterápico tópico para tumores malignos da conjuntiva e da córnea. Após vários estudos, ela passou a ser usada em cirurgias oftalmológicas com risco de falha secundária à cicatrização (trabeculectomia e cirurgia para pterígio) com ótimos resultados.

VIEIRA NETO (2004) obteve bons resultados com seu uso em oftalmologia para controle das recidivas nas cirurgias do pterígio e do glaucoma, MANDIA (1997), em sua tese de doutorado, encontrou resultados semelhantes. Suas propriedades farmacológicas têm levado a utilização em procedimentos oftalmológicos, onde é necessária a redução da formação cicatricial.

A Mitomicina-C chamou a atenção para uso otorrinoalngológico em situações que requerem tratamento de cicatrizes em tubos estruturais como laringe, traquéia e estenose nasal. KAO, LIAO, TSENG, CHEN e HOU, (1997) relataram o uso da Mitomicina-C para a redução da formação cicatricial, nos casos de dacriocistorinotomia aberta.

INGRANS, VOLK, BIESMAN, PANKRATOV e SHAPSHAY, (1998) usaram diferentes concentrações de Mitomicina-C, após realizar antrostomias em coelhos, notaram que quanto maior a concentração de Mitomicina-C, maior o tempo para fechar as antrostomias, não observando alterações permanentes no funcionamento das células ciliadas da mucosa nasal.

ELIASHAR et al. (1999), CORREA, REINISCH, SANDERS (1999), SPECTOR e WERKHAVEN (1999) realizaram estudos semelhantes com uso de Mitomicina-C tópica para o tratamento de estenose subglótica e glótica posterior, observaram que a cicatrização anormal e a estenose foram moduladas em torno da mucosa laríngea, com significativa redução do

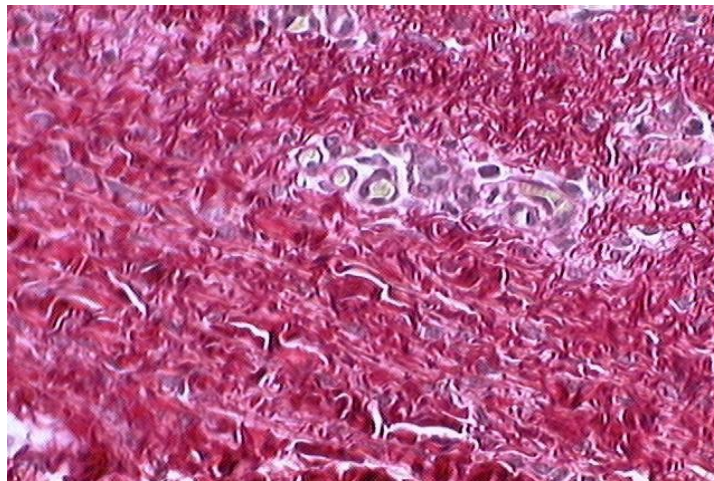
Há uma expectativa por parte dos profissionais, pois vários estudos estão em andamento na América e na Europa para mostrar os benefícios da Mitomicina-C e averiguar os possíveis efeitos sistêmicos ou indesejados que ela possa causar quando usada topicamente.

TSAI, KAU, HSU e LIU (2002) afirmam que o procedimento tópico deve ser através da aplicação de algodão embebido com a solução na concentração de 0,4 a 2 mg/ml por 3 a 10 minutos, e sua ação ocorre, somente se for utilizada em área cirúrgica; recomendam após a aplicação e espera dois minutos, irrigar essa área para remover o excesso da substância.

2.5.2 CORANTE PICROSIRIUS *RED*

SWEAT, PUCHTLER e ROSENTHAL (1964) com o objetivo de buscar uma substância que corasse definitivamente o colágeno, utilizaram corante Vermelho Sírio (*Sirius Red*), associado ao ácido pícrico, denominando-a de solução de Picrosirius *Red*.

FIGURA 4 - PICROSIRIUS *RED* ANTES DA POLARIZAÇÃO



O colágeno, por ser uma proteína básica, provavelmente interage com os grupos sulfônicos do corante Vermelho Sírio a 0,1%, e em *pH* baixo, com os grupos amino da lisina e da hidroxilisina e os grupos guanidina da arginina (fig. 4).

O método descrito foi estudado por CONSTANTINE e MOWRY (1968) levantando dúvidas quanto a sua especificidade ao colágeno, pois algumas estruturas coradas não eram colágeno. Observaram que a solução de Picrosirius *Red*, aumentava a birrefringência normal

das fibras do colágeno em secções de tecido. JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI (1978) notaram que o corante Picrosirius *Red* aumentava a birrefringência das fibras colágenas, quando estudadas em microscópio de polarização. O método veio, de certa forma, substituir a fucsina ácida no método tricrômico de Van Gieson, citado por JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI (1979).

O papel atribuído ao ácido pícrico na coloração do colágeno é desconhecido, no entanto, quando omitido da solução corante, todos os seus componentes teciduais ficam numa coloração vermelha, parecendo desta forma, prevenir a coloração indiscriminada das estruturas não colagenosas pelo *Sirius Red*.

JUNQUEIRA et al. (1979) afirmam que quando o ácido pícrico não é usado, constata-se que todas as estruturas mostram intensificação da birrefringência.

É importante assinalar que o uso da solução de Picrosirius *Red*, associado à microscopia polarizada apresenta importante sensibilidade e especificidade como método simples para localizar as fibras colágenas. RABAU e DAYAN (1994) sugerem que as diferentes birrefringências observadas à polarização após o uso do Picrosirius *Red*, permitem avaliar a fase do processo cicatricial, onde o colágeno encontra-se esverdeado ou amarelo esverdeado, em fase de cicatrização e altamente birrefringentes de cor laranja ou vermelha em processo fibrótico inativo.

Pode-se distinguir em padrões de cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras do colágeno, diferentes tipos de colágenos (HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1996 e HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1999).

- Tipo I - Fibras espessas amarelas brilhantes, laranja ou vermelha;
- Tipo II - Fibras finas com cores variadas distintas das observadas no colágeno I;
- Tipo III - Fibras finérrimas esverdeada e amarela esverdeada.

FIGURA: 5 PICROSIRIUS *RED* APÓS A POLARIZAÇÃO

FONTE: FONSECA (2003)

A quantificação computadorizada, através da soma da área corada pelo Picrosirius *Red*, após polarização, para RIBEIRO e BORGES (2004), (fig. 5) é um método bem estabelecido pela literatura para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam à avaliação da cicatrização.

FONSECA (2003) em sua dissertação de Mestrado, afirma que é útil a descrição da história natural de um processo fibroso, visto que as fibras birrefringentes finas e grossas podem ser facilmente diferenciadas com o uso do método Picrosirius *Red* polarizado.

3 . MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Documentos Científicos, da Universidade Federal do Paraná (2000), e obedeceram-se os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e as recomendações para eutanásia de animais experimentais, propostas por CLOSE, BATTLEBOOROUGH e KNOLL (1997) e RAYMUNDO e GOLDIM (2002).

Neste experimento foram utilizados nove porcos da raça *larger white* (*Suideo Sus*). Os animais foram divididos em três grupos, compostos por três animais constituídos aleatoriamente. No grupo controle (GC) realizou-se aplicação de algodão embebido em solução fisiológica 0,9%, o grupo experimento I (GE I) sofreu a aplicação de algodão embebido em Mitomicina-C em concentrações de 0,04% (4 mg/ml), e o grupo experimento II (GE II) aplicação de algodão embebido em Mitomicina-C na concentração de 0,08% (8 mg/ml). Os algodões foram colocados na mucosa de borda livre do terço anterior da prega vocal direita e esquerda durante três minutos. Os grupos foram comparados entre si quanto à deposição de colágeno em submucosa, utilizou-se o corante Picrosirius *red*, avaliado com microscópio de birrefringência para quantificação do colágeno.

3.2 AMOSTRA

Nove suínos da raça *larger white* (4 machos e 5 fêmeas) foram adquiridos na fazenda da UFPR e utilizados neste experimento.

Os animais pesaram entre 8.700g e 11.562g, com média de 10.131g, e idade entre 27 a 31 dias.

Os animais foram avaliados clinicamente e considerados sadios dentro de uma distribuição normal de peso para a idade seguindo-se os padrões da EMBRAPA.

Os animais estavam numerados conforme o padrão adotado na Fazenda Experimental, utilizando marcas nas orelhas e alojados cada grupo de três animais em uma pocilga.

3.3 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas pocilgas de 1,2 m x 1,8 m 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 ao lado do comedouro e fornecia água a vontade.

3.4 ANESTESIA

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

Todos os animais receberam antes da indução anestésica Midazolam (Dormonid[®] 1 mg/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, 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 nas veias superficiais da orelha, abdome ou membros através de agulha Abocath[®] 22.

Após a indução, a anestesia foi feita com Propofol[®] na dose de 6 mg/kg por via IV e a anestesia de manutenção com a mesma medicação na dose de 0,4 mg/kg por via IV.

Os animais foram monitorizados por ECG através de cardioscópio (Funbep[®]). Para eventuais depressões respiratórias ou apnéias estava disponível oxigênio em recipiente portátil.

3.5 PROCEDIMENTO PARA A APLICAÇÃO DE MITOMICINA-C TÓPICA

3.5.1 POSICIONAMENTO

Após a anestesia os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em proclive em mesa especial para castramento coberta por campo cirúrgico estéril. Para a retificação da laringe foi colocado coxim de campo cirúrgico na região dorsal superior do animal.

3.5.2 INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO

Foi utilizado laringoscópio infantil (Microfrance[®]) com angulação para comissura anterior (figura 6).

O laringoscópio foi suspenso por um auxiliar para melhor observação da região do terço anterior da glote suína.

FIGURA 6 – INTRODUÇÃO DO LARINGOSCÓPIO



3.5.3 OBSERVAÇÃO DAS PREGAS VOCAIS E MATERIAL AUDIOVISUAL

Utilizou-se microscópio cirúrgico D. F. Vasconcelos 6700 com sistema de câmera acoplada para observação da glote e colocação de algodão embebido em solução fisiológica 0,9% no GC e Mitomicina-C tópica em GE I e GE II, os procedimentos foram gravados em fita de vídeo (Aparelho de TV vídeo TVV 567 Panasonic[®]) (figuras 7 e 8).

FIGURA 7 – MICROSCÓPIO CIRÚRGICO



FIGURA 8 – EQUIPAMENTO DE CAPTAÇÃO E REPRODUÇÃO DE IMAGEM



3.5.4 UTILIZAÇÃO DE MITOMICINA-C TÓPICA NO GRUPO EXPERIMENTO 1 E 2

Após exposição e visualização da mucosa da borda livre do terço anterior da prega vocal direita e esquerda, colocou-se uma bola de algodão de aproximadamente 3 mm de diâmetro no seu maior eixo, embebida com a solução de Mitomicina-C a 0,04% (4 mg/ml), no grupo experimento 1 e 0,08% (8 mg/ml) no grupo experimento 2, envolvendo ambas as pregas vocais (figura 9) durante 3 minutos cronometrados em relógio digital (Citizen Skydiver®). Após os 3 minutos, retirava-se o algodão e limpava-se a região com soro fisiológico 0,9%.

No grupo controle repete-se o mesmo processo descrito anteriormente com algodão embebido em soro fisiológico.

FIGURA 9 - APLICAÇÃO DE MITOMICINA-C TÓPICA



3.6 COLETA DAS LARINGES

A eutanásia dos animais realizou-se 30 dias após o procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos ao mesmo pré-anestésico e anestésico utilizado no procedimento seguido de eletrocussão. Posteriormente foi retirado a laringe de cada animal, identificada as pregas vocais (grupo a que pertencia) e enviada para análise histológica.

3.7 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram coletadas logo após a eutanásia no abatedouro da Fazenda Experimental. Toda a laringe do animal foi retirada para a melhor coleta da prega vocal (figura 10). Realizou-se uma incisão longitudinal anterior na laringe (figura 11), exposta a região das pregas vocais (figura 12) e realizada incisão rente à cartilagem tireóide (figura 13) para a retirada da prega vocal e preservação da cobertura mucosa. A peça foi fixada com alfinetes sobre um retângulo de papel cartão a fim de mantê-la bem esticada. No papel cartão

de fixação foi realizada a identificação do animal, o lado (direito ou esquerdo) da prega vocal, bem como indicada a região anterior da prega vocal. Neste momento, a prega vocal recebeu uma nova numeração para análise microscópica de forma randomizada e duplo-cega. Posteriormente, este retalho foi fixado em formol a 10% durante 24 horas.

FIGURA 10 - LARINGE DO SUÍNO RETIRADA POR INTEIRO DA BASE DA LÍNGUA AO QUARTO ANEL TRAQUEAL



FIGURA 11 – INCISÃO MEDIANA ANTERIOR

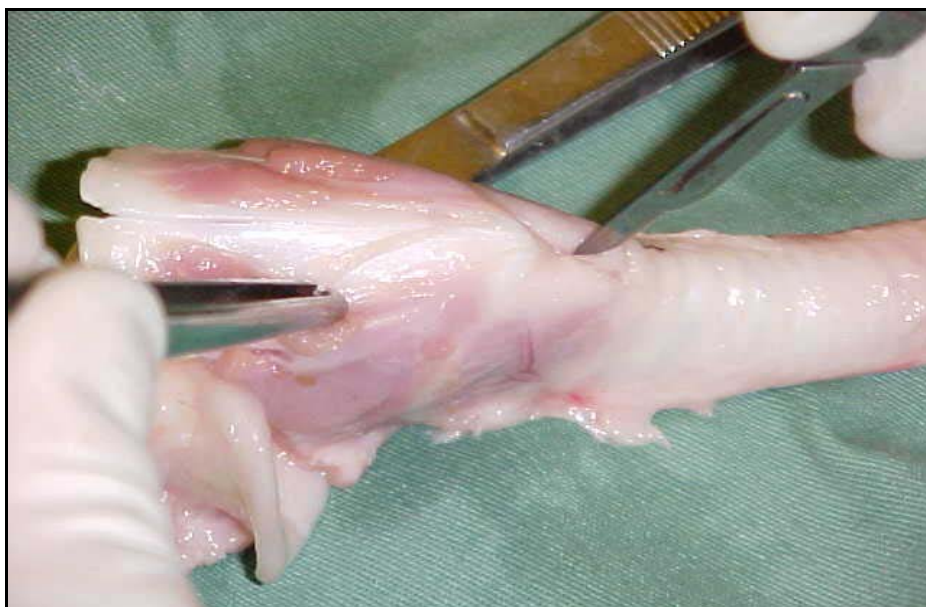
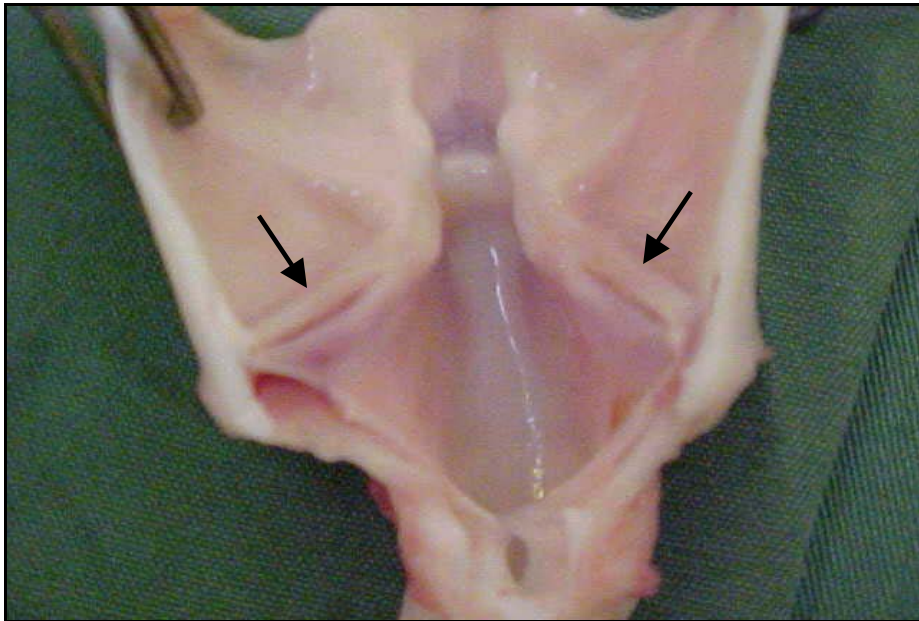


FIGURA 12 – VISUALIZAÇÃO DA GLOTE SUÍNA APÓS A ABERTURA ANTERIOR DA LARINGE



NOTA: As setas indicam as pregas vocais.

FIGURA 13 – INCISÃO RENTE A CARTILAGEM TIREÓIDE



3.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após período de fixação de 24 horas, 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) para processamento “*overnight*”, sendo desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, foram diafanizadas em xilol contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Realizada inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG 1160), os blocos foram microtomizados (Leica® modelo RM 2145) em cortes de 5µm e dispostos em lâmina de vidro de 75x25 mm, realizando-se dois níveis de corte para cada área de estudo e a seguir as lâminas foram coradas em Picrosirius *red*.

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA

A leitura das lâminas foi realizada através do programa *Pro-image-plus 4.5*® para Windows® em um computador Pentium IV® acoplado ao microscópio Olympus® BX50 e câmera de vídeo Sony® (figura 14), calibrado previamente em micrômetros com objetiva de 20 vezes. As medidas foram transferidas para o programa Excel Windows®. Foram realizadas 2 medidas em cada campo, como se segue:

Após a observação do campo na área da lâmina corada pelo Picrosirius *red* (figura 15) foi realizada a polarização (figura 16). Toda a substância não-colágeno foi corada em preto, e o colágeno foi corado em amarelo, vermelho-alaranjado e vermelho. Estas cores foram selecionadas através do programa para quantificação e somatória da área selecionada em micrômetros quadrados. Foram realizadas duas medidas por área, que somadas, resultou em uma média simples. Após desfeita a randomização os dados foram transportados para o programa Excel Windows® e colocados em tabela para análise estatística.

FIGURA 14 – EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS



FIGURA 15 – EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS RED ANTES DA POLARIZAÇÃO

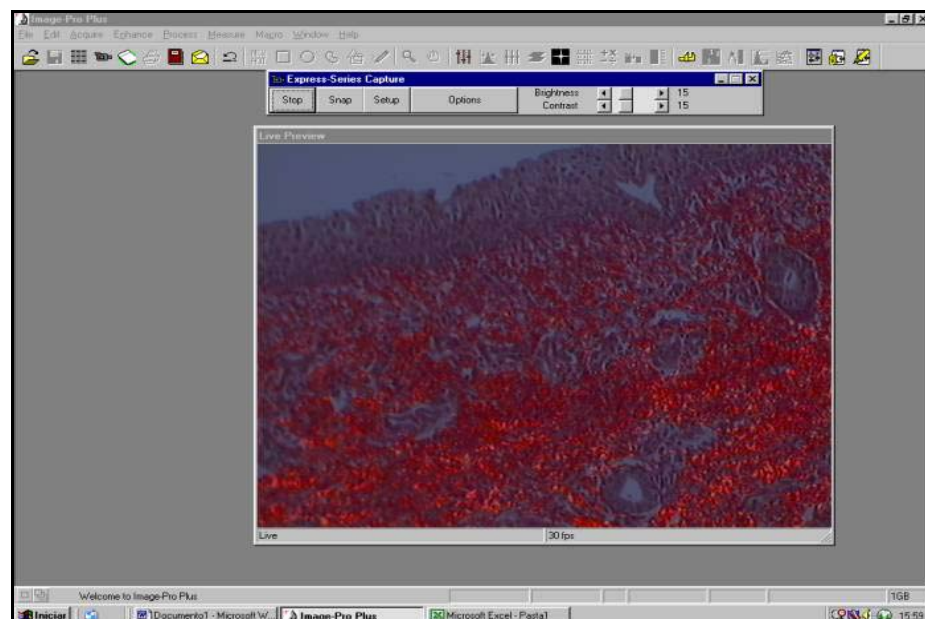
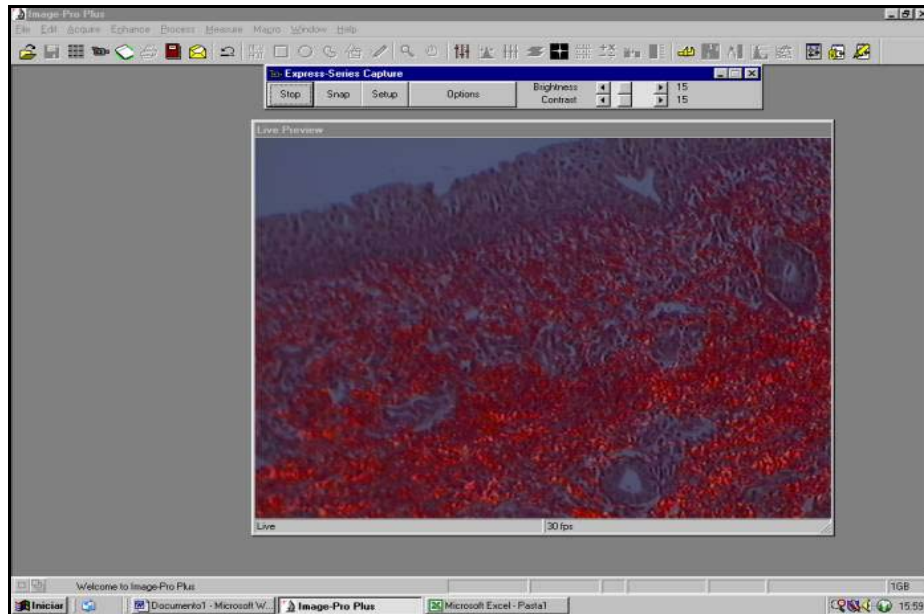


FIGURA 16 – EXEMPLO DE POLARIZAÇÃO DA LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS RED APÓS A POLARIZAÇÃO



3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesta pesquisa foram estimados três grupos, compostos de três animais cada grupo e de 6 pregas vocais por grupo. O primeiro grupo foi o grupo controle que utilizou solução fisiológica 0,9% em algodão sobre a superfície mucosa da prega vocal íntegra durante três minutos; após trinta dias realizou-se a eutanásia dos animais, quantificando-se o colágeno da prega vocal direita e esquerda.

O segundo grupo, experimento 1, utilizou à mesma metodologia que o grupo controle, porém com utilização de Mitomicina-C na concentração de 4mg/ml, após procedeu-se a remoção da Mitomicina-C com solução fisiológica em algodão.

O terceiro grupo, experimento 2, utilizou a Mitomicina-C na concentração de 8mg/ml, removendo-se a Mitomicina-C da mesma maneira que o grupo experimento 2.

O resultado avaliado neste estudo quantificou em μm^2 o colágeno total em submucosa das pregas vocais.

Quando realizadas comparações de resultados em grupos diferentes relativas às diferenças de quantidade de colágeno, considerou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Em todas as comparações efetuadas pelos grupos, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos de comparação e a hipótese alternativa, a resultados diferentes. Em todos os testes, um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo (SIEGEL, 1956).

4 . RESULTADOS

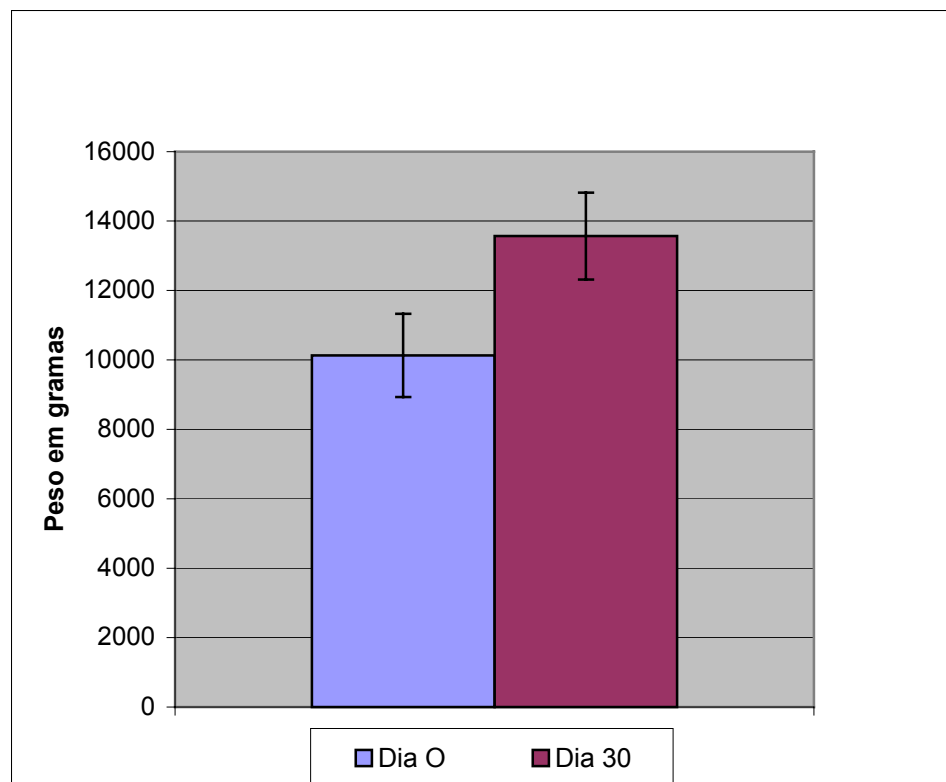
4.1 PRESENÇA DE SINÉQUIAS

Não foram observadas sinéquias em nenhuma das laringes examinadas após a eutanásia.

4.2 PESAGEM DOS ANIMAIS

Após trinta dias do início do experimento, a média do peso dos animais aumentou de 10.131 g para 13.565 g.

GRÁFICO 1 – PESO DOS ANIMAIS EM GRAMAS NO DIA 0 E DIA 30



NOTA: O número nas linhas corresponde aos valores das médias.

4.3 QUANTIFICAÇÃO COMPUTADORIZADA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO

No grupo controle (animais submetidos à aplicação de solução fisiológica 0,9% tópica) a média da área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais foi de 3.110,44 micrômetros quadrados (quadro 1).

No grupo experimento 1 (animais submetidos à aplicação de Mitomicina-C tópica na concentração de 4mg/ml) a média da área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais foi de 3.115,98 micrômetros quadrados (quadro 1).

No grupo experimento 2 (animais submetidos à aplicação de Mitomicina-C tópica na concentração de 8mg/ml) a média da área do colágeno depositado na submucosa das pregas vocais foi de 3.105,78 micrômetros quadrados (quadro 1).

QUADRO 1 - QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO NA SUBMUCOSA DOS GRUPOS PESQUISADOS CURITIBA - PARANÁ (2004)

GRUPOS	PREGAS VOCAIS E PROCEDIMENTOS	ÁREA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TOTAL POR MICRÔMETROS QUADRADOS	
		Média	Desvio Padrão
Controle (n=3)	Pregas vocais com o uso de solução fisiológica 0,9%	3.110,44	340,66
Experimento 1 (n=3)	Pregas vocais com o uso de MMC tópica na concentração de 4mg/ml	3.115,98	279,91
Experimento 2 (n=3)	Pregas vocais com o uso de MMC tópica na concentração de 8mg/ml	3.105,78	308,28

QUADRO 2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E OS VALORES DE P

GRUPOS	VALORES DE p
Controle (com aplicação de SF 0,9%) X Experimento 1 (MMC na concentração de 0,04%)	0,9156
Controle (com aplicação de SF 0,9%) X Experimento 2 (MMC na concentração de 0,08%)	0,9230
Experimento 1 (MMC na concentração de 4mg/ml) X Experimento 2 (MMC na concentração de 8mg/ml)	0,9022

FIGURA 17 – EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS RED DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO DA LÂMINA PRÓPRIA ANTES DA POLARIZAÇÃO

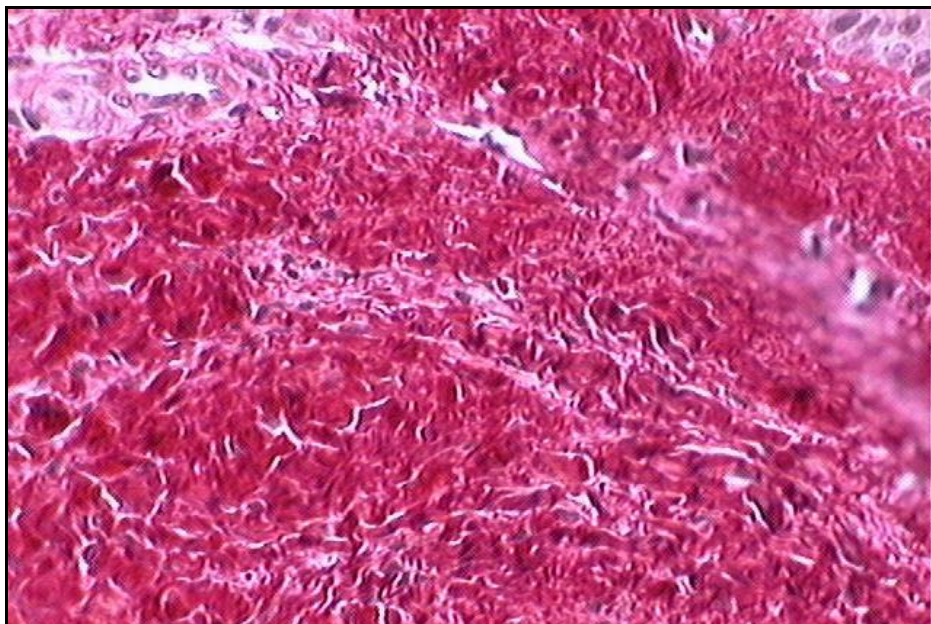


FIGURA 18 – EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS RED DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS A POLARIZAÇÃO



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

FIGURA 19 - EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS RED DEMONSTRANDO O TECIDO CONJUNTIVO APÓS POLARIZAÇÃO



NOTA: Observa-se o caráter birrefringente das fibras de colágeno após a polarização, coradas em amarelo e amarelo-esverdeado e a substância não-colágeno em preto. A coloração amarelada demonstra a presença de fibras de colágeno mais finas (mais jovens).

FIGURA 20 – EXEMPLO DE LÂMINA CORADA PELO PICROSIRIUS *RED* DEMONSTRANDO AS FIBRAS COLÁGENAS APÓS A POLARIZAÇÃO



4.4 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO

4.4.1 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO CONTROLE *VERSUS* GRUPO EXPERIMENTO 1

A média da área de deposição do colágeno total das pregas vocais do grupo controle foi de 3.110,44 micrômetros quadrados enquanto a média da área de deposição do colágeno total do grupo experimento 1 foi de 3.115,98 micrômetros quadrados.

Na comparação efetuada, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos sob comparação e a hipótese alternativa a resultados diferentes. O resultado do teste indicou a hipótese nula com $p=0,9156$, o que não evidenciou diferença entre a quantidade de colágeno total entre os grupos comparados.

4.4.2 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO CONTROLE *VERSUS* GRUPO EXPERIMENTO 2

A média da área de deposição do colágeno total das pregas vocais do grupo controle foi de 3.110,44 micrômetros quadrados enquanto a média da área de deposição do colágeno total do grupo experimental 2 foi de 3.105,78 micrômetros quadrados.

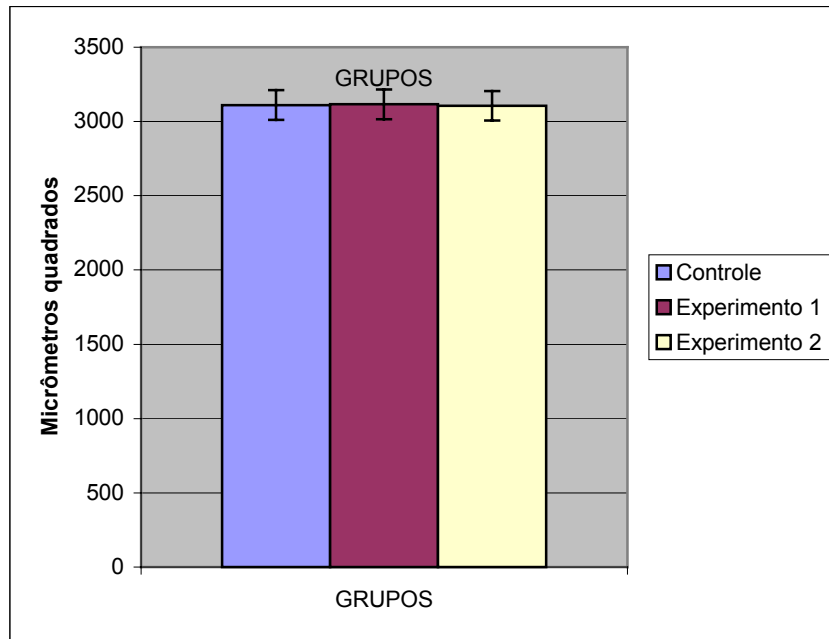
Na comparação efetuada, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos sob comparação e a hipótese alternativa a resultados diferentes. O resultado do teste indicou a hipótese nula com $p=0,9230$ não evidenciou diferença entre a quantidade de colágeno total entre os grupos comparados.

4.4.3 COMPARAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DO GRUPO EXPERIMENTO 1 *VERSUS* GRUPO EXPERIMENTO 2

A média da área de deposição do colágeno total das pregas vocais do grupo experimento 1 foi de 3.115,98 micrômetros quadrados enquanto a média da área de deposição do colágeno total do grupo experimento 2 foi de 3.105,78 micrômetros quadrados.

Na comparação efetuada, a hipótese nula correspondeu a resultados iguais nos grupos sob comparação e a hipótese alternativa a resultados diferentes. O resultado do teste indicou a hipótese nula com $p=0,9022$, o que não evidenciou diferença entre a quantidade de colágeno total entre os grupos comparados.

GRÁFICO 2 - DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO TOTAL DA SUBMUCOSA DAS PREGAS VOCAIS NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS EM MICRÔMETROS QUADRADOS



NOTA: Os números correspondentes às linhas correspondem às médias das áreas do colágeno.

5 . DISCUSSÃO

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

5.1.1 ESCOLHA DO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Encontrou-se apenas um trabalho na literatura que compara modelos de experimentação animal para cirurgia endolaríngea, realizado por GARRETT, COLEMAN e REINISCH (2000), onde foram comparadas as pregas vocais de cão, porco e macaco, observando a quantidade da deposição do colágeno, fibras de elastina e tecido amorfo. Concluíram que a prega vocal do porco e do cão são similares a do homem quanto à quantidade de elastina e de colágeno. As pregas vocais destes animais apresentam um plano de dissecção do *microflap* similar ao do homem. No macaco, o plano de dissecção do *microflap*, está localizado mais profundamente na lâmina própria, próximo ao ligamento vocal.

GARRETT et al. (2000) concluíram que o cão é o melhor modelo de estudo da função da prega vocal, pois apresenta a fase vertical da onda mucosa vista na videolaringoestroboscopia, o que não é visualizado no porco.

No presente estudo, o modelo experimental exigia um animal de médio porte com pregas vocais semelhantes ao do homem, sem a necessidade da observação da função por videolaringoestroboscopia, em razão disso, foi escolhido o porco da raça *larger white*. A padronização da amostra, facilidade de obtenção do animal, padronização de peso e idade, condições de alojamento e de ração, foram ainda, outros motivos que levaram a escolha do porco. Os animais faziam parte da criação da fazenda experimental da Universidade Federal do Paraná e foram adquiridos com recursos próprios do pesquisador.

Embora tenham sido encontrados vários aspectos favoráveis ao estudo, durante o experimento, o porco demonstrou ser um animal de difícil manejo, pouco dócil e de difícil manutenção devido ao custo da ração e alojamento. Além disso, as drogas para indução anestésica e anestesia são caras e de difícil aquisição, pois a compra é rigorosamente controlada.

Após a indução da anestesia, as vias de acesso venosas foram conseguidas facilmente na orelha ou na pele do ventre do animal. A anestesia precisava manter respiração espontânea, com pouca salivacão para a realização do procedimento cirúrgico, e por este motivo foram utilizadas midazolam, acepromazina, ketamina e atropina, sendo que a manutenção da anestesia foi realizada com Propofol[®]. Quando o animal apresentava depressão respiratória (observada pela diminuição dos movimentos respiratórios ou através da alteração da

coloração da mucosa) um cateter era introduzido no focinho do animal oferecendo oxigênio a 5 litros por minuto até a regularização da respiração. Não houve perda de nenhum animal durante o trabalho.

5.1.2 ESCOLHA DA TÉCNICA PARA ESTUDO DA PREGA VOCAL ÍNTEGRA COM USO DE MITOMICINA-C TÓPICA

A escolha da aplicação da Mitomicina-C tópica sobre a prega vocal íntegra, ocorreu por ser praticamente impossível o controle do uso seletivo da medicação em uma cavidade tão pequena como a laringe, mesmo com o maior esmero cirúrgico, sempre ocorre o contato do agente quimioterápico Mitomicina-C com a prega vocal contralateral. Com isso, aventou-se a possibilidade de ocorrerem modificações em estruturas internas normais de prega vocal que provocariam diminuição ou degeneração do colágeno em submucosa.

Não se encontrou na literatura estudos em que se comparam a aplicação de Mitomicina-C, em diferentes concentrações, na prega vocal íntegra. Porém, encontrou-se alguns estudos utilizando-se diversas concentrações de Mitomicina-C, para a diminuição da formação de cicatriz, em vários locais da árvore respiratória (WARD e APRIL, 1998).

Utilizou-se no presente estudo diferentes concentrações de Mitomicina-C, dosagens de 0,04% à 0,08%, consideradas concentrações elevadas do quimioterápico, com o intuito de provar a necessidade da área cruenta para a diminuição do colágeno, tal fato também foi sugerido por CORREA et al. (1999).

Buscou-se na literatura a possibilidade de uma atrofia gerada em tecidos íntegros ou manipulados cirurgicamente que recebem a Mitomicina-C, todavia, tal fato não foi relatado em nenhum estudo pesquisado.

Do mesmo modo, não há relatos na literatura sobre complicações quanto ao uso de Mitomicina-C sobre prega vocal íntegra.

5.2 USO DA MITOMICINA-C EM PREGAS VOCAIS

Como já referido, na literatura não foram encontrados estudos que relatassem a utilização da Mitomicina-C em pregas vocais íntegras de porcos.

Nos estudos realizados na árvore respiratória, a maioria dos Autores considerou alta a concentração de 0,04% ou 4 mg/ml, sendo que, no presente trabalho, buscamos o dobro desta dosagem, e da mesma maneira, não ocorreu influência sobre o colágeno total em prega

vocal íntegra no período pesquisado, o que nos leva a acreditar que esta droga mesmo sendo testada com grande dosagem, no procedimento cirúrgico, é segura para a prega vocal contralateral.

Concordam com a segurança da droga os estudos de CHEUNG, SIU e YONG (1997), nos quais não foram observados processos atróficos em conjuntiva humana em áreas de injúria tecidual.

No presente estudo, não se observou uma diminuição estatisticamente significativa do colágeno total no grupo que utilizou Mitomicina-C quando comparado ao grupo controle, que não a utilizou.

Relatos na literatura indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos operados com ou sem Mitomicina-C e os grupos não operados, com menor quantidade de deposição de colágeno total nos grupos que sofreram cirurgia. O que nos leva a acreditar que a Mitomicina-C somente apresenta ação em tecido com injúria, e em fase de cicatrização.

BRADNER(2001), em seu estudo sobre atualização em Mitomicina-C, também sugere que deve haver injúria tecidual para que ocorra ação sobre o colágeno de submucosa.

A diminuição do colágeno total no grupo operado com uso de Mitomicina-C pode favorecer a não formação de cicatriz nas pregas vocais operadas por patologias, que normalmente possam resultar em cicatriz como granulomas, sulcos vocais, papilomas, e patologias de comissura anterior como “*webs*” e aderências iatrogênicas, segundo GRAY, TRITLE e LI (2004).

INGRANS et al. (1998) usaram diferentes concentrações de Mitomicina-C em coelhos, sendo que, após realizar antrostomias, notaram que quanto maior a concentração de Mitomicina-C maior o tempo para fechá-las. Não houve alteração permanente no funcionamento das células ciliadas da mucosa nasal.

GARRETT et al. (2001) foram os primeiros a utilizar a Mitomicina-C tópica em um modelo canino, comparando os resultados da quantificação do colágeno de *microflaps*, realizados em ambas as pregas vocais de seis cães, aplicando-se Mitomicina-C somente em um dos lados. Neste grupo não houve comparação com o grupo controle. GARRETT et al. (2001) constataram a diminuição da deposição do colágeno total no grupo experimento, comparando a prega vocal operada com o uso da Mitomicina-C à prega contralateral sem intervenção cirúrgica, porém neste estudo, observou-se que, devido à diminuta dimensão da glote, torna-se praticamente impossível impedir a contaminação da prega vocal contralateral, prejudicando desta maneira a avaliação sem interferência do grupo controle.

Embora tenha havido um avanço nesse campo, que contribuiu para o entusiasmo dos pesquisadores quanto ao uso da Mitomicina-C em estados patológicos de vias aéreas, ainda faltam estudos controlados e randomizados. No único ensaio randomizado, utilizando a Mitomicina-C em doença subglótica, HARTNICK et al. (2001) relatam que a Mitomicina-C não foi melhor do que o placebo, quando analisado o tecido de granulação e o local de reparo. Após um ano de seguimento, ocorreu a renovação da estenose, sendo que, em alguns casos, ocorreu a necessidade de colocação de tubo endotraqueal para manutenção de vias aéreas púeruas.

5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO

GARRETT et al. (2001) utilizaram à coloração tricrômica de Mansson para a quantificação computadorizada da área de deposição de colágeno.

RIBEIRO et al. (2004) utilizaram o picrosírius *red* como coloração padrão para o estudo e quantificação da deposição do colágeno.

No presente estudo, preferiu-se a utilização da coloração de picrosírius *red* para a identificação e quantificação da deposição do colágeno, esta coloração, além de ser específica, pode diferenciar as fases de maturação das fibras de colágeno após a polarização, corando em verde e amarelo-esverdeado as fibras mais jovens (mais finas), e em laranja e vermelho as fibras mais antigas (mais espessas). O picrosírius *red* foi citado por JUNQUEIRA et al. 1979, SZENDRŐI, SCHAFF e LAPIS, 1984, RABAU e DAYAN, 1994, HIRSHBERG et al., 1996, HIRSHBERG et al. 1999, como a coloração mais específica para colágeno.

Esta característica da coloração de picrosírius *red* pode proporcionar estudos futuros quanto à maturação da deposição do colágeno nas feridas de pregas vocais de porcos com aplicação de Mitomicina-C tópica.

No presente estudo, a coloração de picrosírius *red* foi efetiva na diferenciação e quantificação do colágeno, o que concorda com JUNQUEIRA et al. (1979), SZENDRŐI et al. (1984), RABAU e DAYAN, (1994), HIRSHBERG et al. (1996), HIRSHBERG et al. (1999).

A quantificação computadorizada, através da soma da área corada pelo picrosírius *red* após polarização, é um método bem estabelecido pela literatura para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam à avaliação da cicatrização (RIBEIRO et al. 2004).

Em função dos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir:

1. A Mitomicina-C tópica aplicada em pregas vocais íntegras durante três minutos na concentração de 4 mg/ml e 8 mg/ml não promoveu a diminuição da deposição de colágeno da submucosa de borda livre de prega vocal.

7. REFERÊNCIAS

BENNINGER, M.S.; ALESSI, D.; ARCHER, S. Vocal fold scarring: current concepts and management. **Otolaryng Head Neck Surg.**, v. 115, p. 474-82, 1996.

BOUCHAYER, M.; CORNUT, G. Microsurgery for benign lesions of the vocal folds. **Ear, Nose Throat J.**, v. 67, p. 446-466, 1988.

BRADNER, W.T. Mitomycin- C a clinical up date. **Cancer treat rev.**, v. 27, n 2, p. 35-50, 2001.

CAMARGO, P.A.M. **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 Paraná, p. 45-46, 2004. Dissertação (mestrado) – UFPR.

CAMARGO, P.A.M.; RISPOLI, D.Z.; PEREIRA, M.C. Cirurgia para elevar o “Pitch” vocal. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA. **Tratado de otorrinolaringologia.** São Paulo: Rocca, tomo 5, cap. 43, p. 427-433, 2002.

CAPRA, F. **O Tao da Física.** São Paulo: Cultrix, p. 227-29, 1995.

CARDOSO, M.; RUBINTEIN, E. **Laringe.** Disponível em: <www.icb.ufmg.br>. Acesso em: 12 dez. 2004.

CHEUNG, J.C.; SIU, A.W.; YONG, V.M. Intermediate-term outcome of variable dose mitomycin-C filtering surgery. **Ophthalmology**, v. 104, p. 143-149, 1997.

CLOSE, B.; BATTLEBOOROUGH, C.; KNOLL, B. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2. **Laboratory Animals**, v. 31, p. 1-32, 1997.

COLEMAN, J.R.; SMITH, S.; REINISCH, L. Histomorphometric and laryngeal videostroboscopic analysis of the effects of corticosteroids on microflap healing in the dog larynx. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 108, p. 119-27, 1999.

CONSTANTINE, V.S.; MOWRY, R.W. Selective staining of human dermal collagen II: the use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. **J. Invest. Dermatol.**, v. 50, p. 414-419, 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. 1053-1060, Nov. 1999.

COUREY, M.S. et al. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. **Ann. Otol. Rhino Laryngol.**, v. 105, p. 525-58, 1996.

ELIASHAR, R.; ELIASHAR, I.; ESCLAMADO, R.; GRAMLICH, T.; STROME, M. Can topical mitomycin prevent laryngotracheal stenosis? **Laryngoscope**, v. 109, p. 1594-600, 1999.

ESTREM, A.S.; BATRA, T.J. Preventing myringotomy closure with topical mitomycin C in rats. **Otolaryngology Head Neck Surg.**, v. 120, n. 6, p. 94-98, 1999.

FONSECA, V.R.C.D. **Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exérese de fragmento de mucosa a frio e uso de Mitomicina-C tópica.** Curitiba Paraná, p. 78-80, 2003. Dissertação (mestrado) – IPREM.

FRUCHT, P.J.; ROZENMANN, Y. Mitomycin C therapy for corneal intraepithelial neoplasia. **Am. J. Ophthalmologic**, v. 117, p. 164-168, Feb. 1994.

GARDNER, E.; GRAY, D.J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**: estudo regional do corpo humano. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 738-749, 1988.

GARRETT, C.G.; REINISCH, L. Effect of mitomycin-C on vocal fold healing in canine model. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 110, n. 1, p. 25-30, 2001.

GARRETT, C.G.; COLEMAN, J.R.; REINISCH, L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in micro laryngeal surgery. **Laryngoscope**, v. 110, p. 814-24, 2000.

GRAY, S.D.; TRITLE, N.; LI, W. The effect of mitomycin C on extra-cellular matrix proteins in a rat wound model. **Laryngoscope**, v. 113, p. 237-242, 2004.

HARTNICK, C.J.; HARTLEY, B.E.; LACY, P.D. Topical mitomycin application after laryngotracheal reconstruction: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 127, n. 10, p. 1260-1264, Oct. 2001.

HIRANO, M. Phonosurgical Anatomy of the larynx. In: FORD, C.N.; BLESS, D.M. **Phonosurgery**: assessment surgical management of voice disorders. New York: Raven Press, 1991. p. 325-341.

HIRANO, M. Surgical anatomy and physiology of the vocal fold. In: GOULD, W.J.; SALATOFF, R.T.; SPIEGEL, J.R. (Eds.). **Voice surgery**. Chicago (Ill): Mosby - Year Book, 1993. p. 125-158.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibbers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 410-412, 1999.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picosirius red and polarization microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 25, n. 3, p. 125-27, 1996.

IHNAT, M.A.; LARIVIERE, J.P.; WARREN, A.J. Suppression of P-glycoprotein expression and multidrug resistance by DNA cross-linking agents. **Clin. Cancer**, v. 3, p. 1339-1346, 1997.

INGRAMS, D.R.; VOLK, M. C.; BIESMAN, B. S.; PANKRATOV, M. M.; SHAPSHAY, S.M. Sinus surgery: does mitomycin C reduce stenosis? **Laryngoscope**, v. 108, p. 883-86, 1998.

JUNQUEIRA, L.C. Carneiro. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.69-93.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Pricosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R.R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Arch. Histol. Jap.**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

KAO, S.C.; LIAO, C.L.; TSENG, J.H.; CHEN, M.S.; HOU, P.K. Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin-C. **Ophthalmology**, v. 104, p. 86-91, 1997.

MANDIA, C.J. **Trabeculectomia com mitomicina C no tratamento de glaucomas refratários**. Ribeirão Preto, p. 45-47, 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. **Criect. Care Med.**, v. 16, p. 899-907, 1988.

PEARSON, B.W. Anatomofisiologia. In. **O tratado de otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 1994. p. 974-994.

PUCHTER, H.; MELOAN, S.N.; WALDROP, F.S. Are picro-day reactions for collagens quantitative? chemical and histochemical considerations. **Histochem. Journal**, v. 88, p. 243-256, 1988.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picrosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. **Histol. Histopathol.**, v. 9, n. 3, p. 525-28, 1994.

RAYMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista de Bioética e Ética Médica: Conselho Federal de Medicina, Brasília**, v. 10, n. 1, p. 31-42, 2002.

RIBEIRO, F.A.Q; BORGES, J.P;ZACCBI, F.F.S; GUARALDO, L. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. **Laryngoscope**, v. 114, p. 148-152, Jan. 2004.

ROSEN, C.A. Vocal folds scar: evaluation and treatment. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 33, n. 5, p. 238-246, 2000.

SIEGEL, Sidney. **Nonparametric statistic**. New York: McGraw-Hill, 1956. p. 67-87.

SPECTOR, J.E.; WERKHAVEN, J.A.; SPECTOR, N.C. Preservation of function and histologic appearance in the injured glottis with topical mitomycin-C. **Laryngoscope**, v. 109, p. 1125-1129, 1999.

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

SZENDRŐI, G.; SCHAFF, Z.; LAPIS, K. Polarization colours of collagen fiber: a sign of collagen production activity in fibrotic processes. **Act Morphologic Hungarian**, v. 32, n. 1, p. 47-55, 1984.

TSAI, C.C.; KAU, H.C.; KAU, S.C.; HSU, W.M.; LIU, J.H. Efficacy of probing the nasolacrimal duct with adjuvant mitomycin-C for epiphora in adults. **Ophthalmology**, v. 109, p. 172-74, 2002.

VIEIRA NETO, Marcelo et al. PRK com mitomicina: É seguro? Eficaz? Quando indicar? Universo Visual. **Revista de Oftalmologia**, abr, p. 43-48, 2004 Disponível em: <www.universovisual.com.br>. Acesso em: 03 jan, 2005.

VON LEDEN, H: The history of phonosurgery. In: FORD, C.N.; BLESS, D.M. (Eds). **Phonosurgery.**, New York: Raven Press, 1991. p. 3-24.

WAKAKI, S.; MIYAMURA, S.; SHIGENO, N.; MATSUI, M.; UZU, K. The biological studies on mitomicin I. Antibacterial activities of mitomycin derivatives. **J. Antibiot (Tóquio)** v. 20, p. 72-6, 1967.

WARD, R.F.; APRIL, M.M.; Mitomycin-C in the treatment of tracheal cicatrix after tracheal reconstruction. **J. Pediatric Otorhinolaryngol.**, v. 44, p. 221-226, Aug. 1998.

YEATS R.P.; NEVES R.B. Use of mitomycin-C in repeat dacryocystorhinostomy. **Ophthalmology Plast. Reconstr. Surg.**, v. 15, p. 19-22, 1999.

ZEITELS, S.M. Phonomicrosurgery I: principles and equipment **Otolaryngologic Clinics of North America**. v. 3, n. 5, p. 325-55, 2000,

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

**ÁREA DE DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO, EM MICRÔMETROS QUADRADOS
SEGUNDO OS GRUPOS**

GRUPOS	PREGAS VOCAIS.	ÁREA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TOTAL POR MICRÔMETRO QUADRADO POR LÂMINA	
		Lâminas	Média da área de deposição do colágeno por lâmina
CONTROLE		28	3234,49
		37	3299,87
	Pregas vocais sem aplicação de MMC Tópica	19	3325,76
		29	2984,43
		30	3348,15
		25	2469,94
		49	2720,51
		50	2986,60
		51	3085,40
	Pregas vocais com o uso de MMC Tópica, na concentração de 4 mg/ml.	52	3049,08
		53	3526,05
		54	3328,24
	EXPERIMENTOS		11
Pregas vocais com o uso de MMC Tópica, na concentração de 8 mg/ml.		21	3654,99
		31	2994,29
		32	3238,43
		14	3025,71
		15	2952,67