

**EDUARDO GEORGE BAPTISTA DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
DE FIBROBLASTOS NA INTEGRAÇÃO TECIDUAL  
DE FÁSCIA ENXERTADA NA LÂMINA PRÓPRIA  
DA PREGA VOCAL DE COELHOS**

**CAMPINAS**

**2011**

**EDUARDO GEORGE BAPTISTA DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
DE FIBROBLASTOS NA INTEGRAÇÃO TECIDUAL  
DE FÁSCIA ENXERTADA NA LAMINA PRÓPRIA  
DA PREGA VOCAL DE COELHOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Otorrinolaringologia.

**ORIENTADOR: PROF. DR. AGRÍCIO NUBIATO CRESPO**

**CAMPINAS**

**2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

C253a	<p>Carvalho, Eduardo George Baptista de</p> <p>Avaliação do efeito do fator de crescimento de fibroblastos na integração tecidual de fásia enxertada na lamina da prega vocal de coelhos / Eduardo George Baptista de Carvalho -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.</p> <p align="center">Orientador : Agrício Nubiato Crespo Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p align="center">1. Laringe – doenças. 2. Prega vocal. 3. Fásia lata. 4. Matriz extracelular. 5. Transplante autologo. I. Crespo, Agrício Nubiato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	--

**Título em Inglês: Influence of fibroblasts growth factor in the integration of a fragment of fascia grafted in the vocal lamina propria of rabbits**

**Keywords:**

- Larynx - diseases
- Vocal fold
- Fascia lata
- Extracellular matrix
- Autologous transplantation

**Titulação: Doutor em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Otorrinolaringologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo**  
**Prof. Dr. Osiris de Oliveira Camponês do Brasil**  
**Prof. Dr. Reinaldo Jordão Gusmão**  
**Prof. Dr. Aline Epiphanyo Wolf**  
**Prof. Dr. Noemi Grigoletto de Biase**

**Data da defesa: 28 – 01 - 2011**

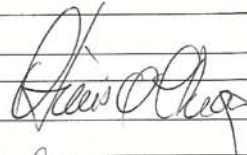
## Banca examinadora de Tese de Doutorado

Eduardo George Baptista de Carvalho

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Agricio Nubiato Crespo**

### Membros:

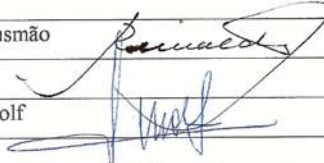
Professor (a) Doutor (a) Osiris de Oliveira Camponês do Brasil



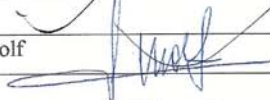
Professor (a) Doutor (a) Noemi Grigoletto De Biasi



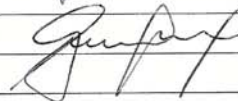
Professor (a) Doutor (a) Reinaldo Jordão Gusmão



Professor (a) Doutor (a) Aline Epiphany Wolf



Professor (a) Doutor (a) Agricio Nubiato Crespo



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 28/01/2011**

## **DEDICATÓRIA**

*A minha filha Júlia por ser a razão e alegria de minha vida.*

*A minha noiva Lisiane, pelo seu carinho, alegria, amor e por tornar minha vida feliz.*

*Aos meus pais, Dra. Maria Auxiliadora e Dr. Fernando, in memoriam, por todo seu amor e exemplo, com a certeza do orgulho de ver cumprida mais esta etapa.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo, pela oportunidade, pelo apoio e incentivo constantes e, pela confiança para a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Ester Nicola, pela amizade, pelas orientações, pelo apoio e por ceder o Laboratório de Laser do Núcleo de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas de UNICAMP, para a realização dos experimentos.

A Prof. Dra. Albina Altemani, do Departamento de Anatomia patológica do hospital de Clínicas da UNICAMP, pela disponibilidade, pela capacidade de transmitir conhecimento.

Aos Profs. Drs. Reinaldo Gusmão e Everardo Costa, pelas preciosas sugestões e orientações durante o exame de qualificação.

A colega de mestrado Dra. Icea Camargo, pela inestimável ajuda com a análise das minhas lâminas.

Ao Sr. Adilson, funcionário do departamento de Anatomia patológica, responsável pela documentação micro-fotográfica.

As Sra. Cristina, secretárias da disciplina, pela permanente ajuda no dia-a-dia.

Aos funcionários do núcleo de cirurgia experimental pela disponibilidade e ajuda.

# RESUMO

---

A correção de sulcos e cicatrizes de pregas vocais permanece como grande desafio à fonocirurgia. Substâncias que promovam a reestruturação da lâmina própria parecem ser a melhor opção. Esta pesquisa avaliou a influência do fator de crescimento de fibroblastos na integração tecidual de enxerto de fragmento de fáscia superficial na lâmina própria de prega vocal de coelhos associado à injeção de FGF, quanto às alterações histológicas induzidas como reação inflamatória aguda e crônica, fibrose desencadeada pelo procedimento e presença de neovascularização.

Doze coelhos adultos foram submetidos ao enxerto de fragmento de 0,1 X 0,1 cm de fáscia cervical superficial na lâmina própria de ambas as pregas vocais. Na prega vocal direita foi injetado fator de crescimento de fibroblastos. Após um e doze meses, os animais foram sacrificados e suas pregas vocais submetidas a estudo histológico.

O fator de crescimento de fibroblastos induziu resposta inflamatória em todos os animais após um mês do experimento inicial. Desencadeou fibrose além da causada pelo procedimento cirúrgico na prega vocal direita em todos os animais após 12 meses do experimento inicial. Fato que demonstra que o fator de crescimento de fibroblastos não representa uma boa opção terapêutica na correção das alterações da lâmina própria de pregas vocais quando associado ao enxerto de fáscia.



# **ABSTRACT**

---

The correction of sulcus and scars of vocal cords remains as a major challenge to fonosurgery. Substances which promote the restructuring the lamina propria seem to be the best option. This study evaluated the influence of fibroblasts growth factor in integration fragment of fascia grafted in the vocal fold lamina propria of rabbits associated with the injection FGF, regarding the histological alterations , acute and chronic inflammatory reaction, fibrosis, presence of neovascularization and the density of collagen.

Twelve adult rabbits were submitted to grafting of fragment of 0.1 X 0.1 cm cervical fascia in the vocal fold lamina propria. Fibroblasts growth factor was injected in the right vocal fold. After a month and 12 months, the animals were sacrificed and their vocal folds submitted to histological study.

The fibroblasts growth factor induced acute inflammatory response in all animals after one month of initial experiment. It induced fibrosis in addition to the caused by surgical procedure on the right vocal fold in all animals after 12 months of initial experiment. Fact which demonstrate that the fibroblasts growth factor with fascia grafting is not a good therapeutic option in correction of alterations of the vocal fold lamina propria.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>CILP</b>	Camada intermediária da lâmina própria
<b>CPLP</b>	Camada profunda da lâmina própria
<b>CSLP</b>	Camada superficial da lâmina própria
<b>DIHA</b>	Dextranômeros em hialuronato
<b>βTGF</b>	Fator de crescimento β transformante
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblasto
<b>FCM</b>	Faculdade de ciências médicas
<b>HGF</b>	Fator de crescimento hepatócitos
<b>H</b>	Histiocitário
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>KCL</b>	cloreto de potássio
<b>L</b>	Linfocitário
<b>LH</b>	Linfo-histiocitário
<b>P</b>	Polimorfonuclear
<b>PVD</b>	Prega vocal direita
<b>PVE</b>	Prega vocal esquerda
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Lista dos animais dos grupos A e B.....	36
<b>Tabela 2-</b> Aspectos histológicos encontrados no grupo A.....	42
<b>Tabela 3-</b> Aspectos histológicos encontrados no grupo B.....	48
<b>Tabela 4-</b> Análise comparativa da intensidade do infiltrado inflamatório entre o lado submetido à enxertia de injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem a adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).....	55
<b>Tabela 5-</b> Análise comparativa da intensidade do infiltrado inflamatório entre o lado submetido à enxertia de injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem a adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).....	55
<b>Tabela 6-</b> Análise da reação inflamatória na prega vocal esquerda nos períodos avaliados.....	55
<b>Tabela 7-</b> Análise da reação inflamatória na prega vocal direita nos períodos avaliados.....	56
<b>Tabela 8-</b> Análise comparativa do predomínio celular entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).....	57
<b>Tabela 9-</b> Análise comparativa dos animais quanto ao predomínio celular entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).....	57
<b>Tabela 10-</b> Análise do predomínio celular na prega vocal esquerda nos períodos avaliados.....	58

<b>Tabela 11-</b>	Análise do predomínio celular na prega vocal direita nos períodos avaliados.....	58
<b>Tabela 12-</b>	Análise comparativa da intensidade da fibrose entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).....	59
<b>Tabela 13-</b>	Análise comparativa da intensidade da fibrose entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).....	59
<b>Tabela 14-</b>	Análise comparativa da intensidade da fibrose presente no lado controle, nos períodos avaliados.....	60
<b>Tabela 15-</b>	Análise comparativa da intensidade da fibrose presente no lado submetido a injeção de FGF, nos períodos avaliados.....	60
<b>Tabela 16-</b>	Análise comparativa da presença de reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A(12 meses).....	61
<b>Tabela 17-</b>	Análise comparativa da presença de reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).....	61
<b>Tabela 18-</b>	Análise comparativa da presença de neovascularização entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).....	62
<b>Tabela 19-</b>	Análise comparativa da presença de neovascularização entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).....	62

<b>Tabela 20-</b>	Análise da presença da neovascularização na prega vocal esquerda nos períodos avaliados.....	63
<b>Tabela 21-</b>	Análise da presença da neovascularização na prega vocal direita nos períodos avaliados.....	63
<b>Tabela 22-</b>	Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um ano, utilizando Teste t pareado.....	63
<b>Tabela 23-</b>	Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um ano, utilizando teste de Wilcoxon Signed Ranks.....	64
<b>Tabela 24-</b>	Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um mês, utilizando Teste t pareado.....	64
<b>Tabela 25-</b>	Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um mês, utilizando teste de Wilcoxon Signed Ranks.....	65

## LISTA DE FIGURAS

---

	PÁG.
<b>Figura 1-</b> Animal submetido à exposição cirúrgica da laringe.....	34
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática do procedimento cirúrgico nas pregas vocais.....	35
<b>Figura 3-</b> Corte histológico coronal da laringe. Detalhe das pregas vocais (setas).....	37
<b>Figura 4-</b> Prega vocal direita (coelho 2) com enxerto de fásia na lâmina própria, com a adição de fator de crescimento de fibroblastos, em cão sacrificado após 12 meses. HE (20X).....	43
<b>Figura 5-</b> Prega vocal direita (coelho 2), com enxerto de fásia na lâmina própria, com a adição de FGF em coelho sacrificado após 12 meses. Mesmo corte da figura 4, corado por Tricrômico de Masson. (20X).....	44
<b>Figura 6-</b> Prega vocal esquerda, com enxerto de fásia sem adição de FGF(coelho 2), sacrificado após 12 meses (20X) HE.....	45
<b>Figura 7-</b> Prega vocal esquerda, com enxerto de fásia sem adição de FGF (coelho 2), animal sacrificado após 12 meses. (20X) Tricrômico de Masson.....	46
<b>Figura 8-</b> Prega vocal direita (Coelho 3) com enxertia de fásia com a adição de FGF na lâmina própria de animal sacrificado após 12 meses. Corado por Picro sirius.. (20X).....	47
<b>Figura 9-</b> Prega vocal direita, (coelho 11), com enxerto de fásia na lâmina própria com adição de FGF em animal sacrificado após um mês, corado por HE (20X).....	49

<b>Figura 10-</b>	Prega vocal direita, (coelho 11), com enxerto de fáschia na lâmina própria com a adição de FGF em animal sacrificado após um mês, corado por Tricrômico de Masson. (20X).....	50
<b>Figura 11-</b>	Prega vocal direita, (coelho 11), com enxerto de fáschia na lâmina própria com a adição de FGF em animal sacrificado após um mês, corado por Picro sirius. (20X).....	51
<b>Figura 12-</b>	Prega vocal controle (coelho 11), em animal sacrificado após um mês, com enxerto da fáschia na lâmina própria, porém, sem adição de FGF, corado por HE. (20X).....	52
<b>Figura 13-</b>	Prega vocal direita (coelho 11), em animal sacrificado após um mês, com enxerto de fáschia na lâmina própria sem adição do FGF, corado por Tricrômico de Masson. (20X).....	53
<b>Figura 14-</b>	Prega vocal direita, (coelho 11), com enxerto de fáschia na lâmina própria sem adição do FGF, em animal sacrificado após um mês, corado por Picro sirius. (20X).....	54



	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>vi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>viii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	24
<b>4- MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1- Animais de experimentação</b> .....	33
<b>4.2- Procedimentos cirúrgicos</b> .....	33
<b>4.3- Avaliação histológica dos resultados</b> .....	35
<b>5- RESULTADOS</b> .....	41
<b>5.1- Análise histológica grupo A</b> .....	42
<b>5.2- Análise histológica grupo B</b> .....	48
<b>5.3- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na indução da reação inflamatória nos períodos estudados</b> .....	55
<b>5.4- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos no predomínio celular, nos períodos estudados</b> .....	57
<b>5.5- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na indução de fibrose, nos períodos estudados</b> .....	59
<b>5.6- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na presença da reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho, nos períodos estudados</b> .....	61

<b>5.7- Análises comparativas da influência do fator de crescimento na neovascularização, nos períodos estudados.....</b>	<b>62</b>
<b>5.8- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na indução de formação de colágeno, nos períodos estudados.....</b>	<b>63</b>
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7- CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>9- FONTES CONSULTADAS.....</b>	<b>80</b>
<b>10- ANEXO.....</b>	<b>82</b>

# **1- INTRODUÇÃO**

---

Dentre as funções da laringe, a produção vocal se mostra como uma das mais importantes, pois possibilita a interação interpessoal, única entre as espécies de animais.

Nenhum outro órgão do corpo apresenta arranjo estrutural semelhante ao das pregas vocais, que confere a ela a flexibilidade necessária para a vibração e produção sonora. Quando ocorre a ruptura desse arranjo, as propriedades biomecânicas essenciais para a ótima vibração e propagação da onda mucosa são alteradas, o que resulta em disфонia (Kishimoto et al.,2009). Cicatrizes de procedimentos cirúrgicos, inflamações, assim como transtornos congênitos, como sulcos vocais, podem promover a alteração estrutural da lâmina própria da prega vocal com aderência entre a camada superficial e profunda. Nestes casos, a lâmina própria é substituída por tecido cicatricial, e como consequência, há diminuição da capacidade de vibração da prega vocal (Hirano et al., 1990; Lindestad et al., 1994)

Hirano et al. (2001) observaram mudanças na organização e distribuição dos componentes da matriz extracelular, como deposição de colágeno do tipo I denso e desorganizado, diminuição da elastina e decorina, aumento da fibronectina e diminuição ocasional do ácido hialurônico em cicatrizes de pregas vocais.

Existem várias alternativas para o tratamento de cicatrizes e sulcos em pregas vocais, como terapia vocal, injeções de colágeno ou ácido hialurônico, incisões para liberação da mucosa ou quebra das contraturas lineares e ainda, a excisão dos tecidos cicatriciais. Outra opção consiste no enxerto de tecidos celulares, como fáscia e gordura entre o epitélio e o ligamento vocal. Essas técnicas têm como objetivo a tentativa de restaurar o mecanismo funcional corpo cobertura e proporcionar melhora da oscilação mucosa (Chan et al., 1998,1999; Woo et al., 1999; Rosen, 2000; Hallen ET AL., 2001).

Hill, et al. (1991) introduziram o uso de gordura autóloga. Após intensa pesquisa e utilização, obtiveram excelentes resultados iniciais, sem reação inflamatória aguda ou do tipo corpo estranho. A gordura pode apresentar alto índice de reabsorção, dependendo do método utilizado, de até 80% após um ano. Rihkanen (1998) referiu que “para compensar a reabsorção, a prega vocal é sobrecorrigida e isso faz da gordura material, problemático para ajuste fino da borda da prega vocal”.

O colágeno bovino também revela bons resultados iniciais, sendo usualmente reabsorvido em poucos meses, assim como acontece com o colágeno autógeno. (Ford et al., 1999).

O enxerto de fásia tem sido utilizado há décadas em cirurgias otológicas e plásticas, sem complicações e com resultados reprodutíveis. Apresenta consistência tecidual similar à do colágeno e baixa taxa de atividade metabólica. Rihkanen (1998) propôs o uso de fásia triturada para cirurgia de aumento volumétrico da prega vocal. Reijonen et al. (2001), em estudo experimental em cães com injeção de fásia triturada no músculo vocal, observaram que o enxerto permaneceu identificável histologicamente após um ano de seguimento e, na maioria dos casos, sem complicações precoces ou tardias. Tsunoda et al. (1999) publicaram, com resultados promissores, a utilização de enxerto de fásia íntegra no espaço de Reinke para a correção da incompetência glótica em modelo humano, principalmente decorrente de sulcos vocais.

Contraditoriamente, Rodgers et al. (2000) descreveram rápida absorção de fásia autógena triturada injetada no músculo vocal, após três meses. Para esses autores, a fásia não representa material adequado para enxerto em prega vocal.

Carvalho (2006) em estudo experimental, demonstraram que a fásia, quando enxertada na lâmina própria de pregas vocais de cães, é bem tolerada, não desencadeando fibrose e reação inflamatória aguda ou crônica.

A partir da década de 90, várias intervenções para o restabelecimento estrutural da lâmina própria da prega vocal tem sido testadas, em caráter experimental, com o propósito de diminuir a fibrose pós-operatória e cicatriz, e melhorar a flexibilização da mucosa. Em estudos *in vitro*, os fatores de crescimento de fibroblastos e hepatócitos, associado ou não a células tronco, podem levar à diminuição do colágeno tipo I e aumentar a produção de ácido hialurônico, a partir de fibroblastos do espaço de Reinke. Essas técnicas ainda não estão disponíveis para uso clínico. (Hirano et al., 1999, 2003 a, b, c; Kanemaru et al., 2003,2005; Thibealt et al., 2004; Luo et al., 2006; Ohno et al., 2008).

A correção da distribuição dos componentes da matriz extracelular é essencial para restaurar a estrutura da lâmina própria das pregas vocais em alterações, como sulcos e cicatrizes. Sendo esses componentes primariamente sintetizados por fibroblastos, e a fáscia sendo rica nesse tipo de célula, pode se supor que, quando os fibroblastos são estimulados pela adição de fatores de crescimento, haja a indução da produção de ácido hialurônico, chave para o início e regulação de reparação tecidual. Desta forma, esta estratégia pode ser efetiva na correção das alterações da lamina própria.

Estudos prévios de Hirano et al. (2008) demonstram que o fator de crescimento é forte indutor da proliferação de fibroblastos e que estimula a produção de ácido hialurônico a partir de cultura de fibroblastos.

A partir destes dados, avaliamos a integração da fáscia superficial cervical, associada ao fator de crescimento de fibroblastos, quando enxertada no espaço de Reinke de pregas vocais de coelhos.

## **2- OBJETIVOS**

---

**Objetivo geral:** Analisar a influência do fator de crescimento de fibroblastos na integração tecidual de fáscia cervical enxertada na lâmina própria de pregas vocais de coelhos.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar a intensidade do processo inflamatório desencadeada pelo procedimento.
- Avaliar a indução de neovascularização.
- Avaliar a indução de reação inflamatória do tipo corpo estranho.
- Avaliar a intensidade da fibrogênese induzida pelo procedimento.



## **3- REVISÃO DA LITERATURA**

---

Inicialmente abordaremos a estrutura da prega vocal, sua estratificação e a composição da lâmina própria. A seguir, a estrutura e as diferenças da histologia da lâmina própria normal e da prega vocal com sulco vocal. Por fim, os métodos para a correção da lâmina própria com especial atenção para o uso da fâscia autóloga e fatores de crescimento.

### **Estrutura, estratificação e composição da lâmina própria da prega vocal.**

Hirano, 1974 demonstrou histologicamente a estrutura em camadas da prega vocal humana e propôs a teoria do complexo corpo-cobertura. A lâmina própria da prega vocal, segundo o autor, é constituída por três camadas. A camada mais superficial da lamina própria (CSLP), é caracterizada histologicamente por tecido frouxo com poucas fibras colágenas e elásticas. A camada intermediária da lâmina própria (CILP) apresenta maior número de fibras elásticas e a camada profunda da lâmina própria (CPLP) é aquela com um número aumentado de fibras colágenas. A teoria corpo-cobertura da fonação trouxe evidência histológica que o tecido superficial, permitia liberdade de movimento, enquanto os tecidos profundos mostravam-se mais rigidamente integrados. A cobertura da prega vocal, na descrição do autor, inclui o epitélio e a CSLP, enquanto o músculo vocal constitui o corpo. A CILP e a CPLP foram caracterizadas como camada de transição.

Gray et al., 1994, utilizando microscopia eletrônica, fizeram estudo descritivo da ultra-estrutura de três laringes humanas. Relataram que a zona da membrana basal de humanos se assemelha às de cães. A camada profunda da epiderme é forrada por células basais sobre a membrana basal. “As fibras de ancoragem podem ser vistas fazendo uma alça a partir da lâmina densa para dentro da camada superficial da lâmina própria e readerindo à lâmina densa”. Demonstraram ainda, que as fibras colágenas da camada superficial se interdigitam com as alças, fixam a camada basal à prega vocal, e impedem que desgarre durante a vibração.

Ishii et al., 1996 realizaram estudo tridimensional do arranjo das fibras colágenas e elásticas de pregas vocais humanas, por meio de microscopia eletrônica, após digerirem os elementos celulares e fibras colágenas com ácido fórmico e os elementos celulares e as fibras elásticas com hidróxido de sódio a 10%. Demonstraram que a camada superficial é composta de aglomerados de fibras colágenas e fibras elásticas finas que

correm retas ou espiraladas. A camada intermediária consiste de feixes espessos de fibras colágenas e elásticas dispostas longitudinalmente e fibras elásticas finas espiraladas. A camada profunda consiste de fibras elásticas espiraladas e feixes densos de colágeno. Os autores sugeriram que as fibras colágenas provavelmente estariam envolvidas na manutenção da estratificação da estrutura da lâmina própria. As fibras elásticas estão envolvidas na restauração rápida da morfologia da prega vocal após ação muscular e vibração.

Hammond et al., 1997 e 2000 descreveram, com utilização de microscopia eletrônica de pregas vocais humanas, a composição da camada intermediária da lâmina própria, destacando a presença de elastina e ácido hialurônico. Relataram a morfologia das fibras elásticas e seus tipos. As fibras oxitalânicas, elaunínicas e as fibras elásticas maduras diferem entre si pelo tamanho e pela quantidade de substância amorfa presente na sua estrutura. Observaram também, a importância do ácido hialurônico como preenchedor do espaço que, devido à sua capacidade hidrofílica, atrai sódio e água, o que proporciona viscosidade e regula o conteúdo de água da prega vocal.

Pawlak et al., 1996 avaliaram a composição normal de proteoglicanos nas pregas vocais de cadáveres humanos usando técnicas imunohistoquímicas. Mostraram a importância dos proteoglicanos glicosaminoglicanos, componentes da matriz extracelular. Correlacionaram seus resultados com eventuais estados patológicos e com a homeostase normal da lâmina própria. Referiram que a decorina e a fibromodulina retardam a formação de fibrilas de colágeno tipos I e II.

Gray et al., 1999, por meio de estudo anatômico das pregas vocais de cadáveres, demonstraram que, no envelhecimento ocorre diminuição da camada superficial da lâmina própria. Questionaram se há atrofia desta camada ou proliferação de elastina com invasão da CSLP. Mostraram que, nesta fase, há diminuição do “turnover” das fibras elásticas e do colágeno, com aumento de suas concentrações.

Gray et al., 2000 estudaram a composição molecular da prega vocal de humanos e a relação entre as moléculas fibrosas na performance biomecânica e fisiológica do tecido. Concluíram que os proteoglicanos, especialmente o ácido hialurônico, é o mais

presente na lâmina própria e determina a vibração tecidual por conferir viscosidade tecidual. A decorina e fibromodulina estão presentes em menor quantidade e são importantes no metabolismo das proteínas fibrosas.

Madruga de Melo et al., 2003 estudaram a distribuição do colágeno na lâmina própria de cadáveres, por meio do método de polarização pelo picro – sirius. Descreveram o arranjo das fibras colágenas como não paralelos ao bordo livre da prega vocal, mas dispostos em forma de malha, constituídos por colágeno tipo III na camada superficial e colágeno tipo I na camada profunda. O espaço entre as fibras é preenchido por fibras elásticas imaturas e glicosaminoglicanos.

Hirano et al., 2003 fizeram estudo imunohistoquímico sobre a fibronectina e outras moléculas de adesão da lâmina própria de pregas vocais de cachorros. Observaram que a fibronectina atua na reparação da lâmina própria após lesão, formando um arcabouço para deposição de colágeno.

### **Histopatologia do sulco vocal**

Hirano et al., 1999 realizaram, utilizando microscopia convencional e eletrônica, a avaliação da histologia de pregas vocais humanas com sulcos vocais. Observaram que o sulco ocorre em áreas de epitélio escamoso e está situado na camada superficial da lâmina própria, em profundidade de 0,4 a 0,6 mm. As fibras colágenas desta camada na área do sulco eram frequentemente densas fragmentadas no fundo do sulco. Na camada superficial ocorreu ainda a diminuição das fibras elásticas, que se encontram na forma de microfibrilas e substância amorfa. A espessura da membrana basal é marcadamente aumentada principalmente pela presença de fibras colágenas, que espessaram a camada reticular.

### **Métodos terapêuticos**

Em 1994, em artigo de revisão sobre o uso de enxertos de fáschia, gordura e músculo em cirurgia de cabeça e pescoço, Boyce et al. relataram que a fáschia é constituída basicamente por fibroblastos em matriz extracelular composta por colágeno. Este fato,

combinado à sua baixa taxa de metabolismo, explica porque a fáschia pode ser transplantada sem alterar sua forma ou função.

Rihkanen, 1998 analisou a melhoria da qualidade vocal de nove indivíduos com paralisia de prega vocal, após serem submetidos à injeção de fáschia lata triturada no músculo vocal. Em todos os casos houve melhora do tempo máximo de fonação e na avaliação da qualidade vocal realizada por quatro foniatras avaliadores. Em cinco dos nove pacientes, a voz foi considerada normal após o procedimento.

Tsunoda et al., 1999, 2000, 2001 publicaram uma série de ensaios clínicos onde realizaram o enxerto de fáschia temporal autóloga íntegra na lâmina própria de pregas vocais de nove pacientes com insuficiência glótica por sulcos vocais, atrofia ou cicatriz de pregas vocais. Após um ano de acompanhamento, os pacientes, portadores de sulcos e atrofia da prega vocal, apresentaram melhora na qualidade da voz e do padrão vibratório à estroboscopia, com desaparecimento da fenda glótica e melhora do tempo máximo de fonação. Relataram que após o implante, o volume da prega vocal continuou a aumentar, e que a melhora dos parâmetros ocorria após seis meses do procedimento. Especularam sobre a possibilidade do enxerto de fáschia temporal levar à regeneração do tecido da prega vocal, por mecanismo similar ao transplante de células tronco em outros órgãos.

Rodgers et al., 2000, em estudo histológico, analisaram as pregas vocais de seis cães com paralisia por secção do nervo laríngeo recorrente, submetidos ao enxerto de fáschia lata triturada, injetada no interior do músculo vocal. Após três meses do experimento não identificaram a presença da fáschia injetada. Concluíram que a fáschia não possui a mesma persistência no músculo que os adipócitos, e que não representa um bom material para aumento volumétrico de prega vocal.

Duke et al., 2001 realizaram dois estudos, o primeiro histológico e experimental, comparativo entre o implante de gordura e fáschia triturada injetadas no músculo tireo-aritenóideo das pregas vocais de um mesmo cão. O segundo, um ensaio clínico, em que avaliaram a melhora dos sintomas em um grupo de 40 pacientes portadores de insuficiência glótica de etiologia variada, submetidos à injeção de fáschia lata no músculo vocal. Para o estudo experimental, padronizaram o volume a ser injetado dos dois tecidos,

cada um em uma prega vocal. Após 12 semanas, mediram o grau da reabsorção de cada um deles. Com a análise dos cortes histológicos de pregas vocais, concluíram que houve taxa de absorção similar entre os dois grupos: 32% da fáschia e 46,6% da gordura. No estudo clínico, com aumento volumétrico de prega vocal com fáschia, os parâmetros acústicos permaneceram mais estáveis que nos pacientes que utilizaram gordura por até dois anos de seguimento, sem necessidade de sobrecorreção para manter os resultados.

Reijonen et al., 2001 analisaram a histologia e a histo-morfometria de pregas vocais de cães submetidas à injeção de fáschia autóloga triturada no músculo vocal. O estudo demonstrou que a fáschia se mantém após um ano de seguimento. O que os fez supor que a pequena diminuição volumétrica do enxerto se deva à compactação e reorganização das fibras colágenas rotas e não à reabsorção do enxerto. Observaram que houve remodelação das fibras colágenas. Elas se encontravam rotas aos dez dias de acompanhamento e aos seis meses se organizavam em arranjos lineares. Encontraram ainda, resposta inflamatória aguda leve somente nos primeiros dias após o procedimento.

Nishiyama et al., 2002 propuseram o uso de enxerto de fáschia temporal autóloga, íntegra e enrolada, na lâmina própria de prega vocal por meio de laringoscopia direta. Para esta técnica confeccionaram bolsa submucosa no espaço de Reinke e introduziram o enxerto de fáschia. Na avaliação pós-operatória, comparou-se o volume da prega vocal, o tamanho da fenda glótica e a qualidade vocal, nos períodos pré e pós-operatórios, com a escala GRBAS. Referiram que em todos os pacientes houve melhora dos parâmetros analisados, que se mantiveram durante seguimento de seis meses.

Carvalho, 2006 realizaram estudo experimental onde fáschia lata foi enxertada no espaço de Reinke de pregas vocais de cães, e avaliada a integração tecidual. Observaram que após seis meses, a fáschia não desencadeou resposta inflamatória, não induziu a formação de fibrose na área operada e que houve aumento na neovascularização quando comparados com o lado controle.

Em estudo histoquímico em pregas vocais de cães submetidos à injúria tecidual, Thibeault et al., 2004 observaram que o nível de ácido hialurônico sobe imediatamente após a lesão, o que é necessário para a reparação e prevenção da cicatriz.

Chan et al., 1998 e 1999 com utilização de um reômetro rotacional, mediram a viscoelasticidade do ácido hialurônico associado ou não a fibronectina e as comparou com a viscoelasticidade da prega vocal. A viscosidade do ácido hialurônico foi diretamente proporcional à sua concentração. A fibronectina não influenciou, *in vitro*, nas propriedades viscoelásticas do ácido Hialurônico.

Hallen et al., 2001 realizaram estudo clínico com uso de injeção de ácido hialurônico, na forma de DIHA, no músculo vocal de pacientes com insuficiência glótica. Em acompanhamento por nove e doze meses o experimento apontou melhora da qualidade vocal e da coaptação glótica. Porém, os autores deixaram de avaliar a reabsorção da substancia injetada. Em vinte e cinco por cento dos pacientes houve necessidade de reintervenção cirúrgica.

Hirano et al., 2003 em estudo *in vitro*, realizaram cultura de fibroblastos de pregas vocais de cães, com e sem adição de Fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento  $\beta 1$  transformante (FC  $\beta 1$ ). Demonstraram que a adição de HGF à cultura de fibroblastos induziu ao aumento da produção de ácido hialurônico e reduziu a produção de colágeno do tipo I. No entanto, a adição de GF  $\beta 1$  além de estimular o aumento da produção de ácido hialurônico, aumenta também a produção do colágeno do tipo I e fibronectina. Sugerem que o HGF apresente potencial para a prevenção e tratamento da fibrose de pregas vocais.

Hirano et al., 2003 em estudo com cultura de fibroblastos de pregas vocais de cães avaliaram o efeito de HGF, Fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento  $\beta 1$  transformante na produção de ácido hialurônico. Concluíram que todos os fatores de crescimento levaram ao aumento da produção de ácido hialurônico por pelo menos uma semana quando adicionados à cultura de fibroblastos.

Hirano et al., 2003 em estudo *in vitro*, analisaram através de microscopia eletrônica e o exame ELISA, as mudanças morfológicas e funcionais dos fibroblastos humanos quando estimulados pelo HGF. Descreveram que este fator de crescimento promove a mudança dos fibroblastos do espaço de Reinke da forma ovalar para as formas fusiforme e estrelada. Além disso, estes fibroblastos passam a apresentar aparelho de Golgi

e retículo endoplasmático mais desenvolvido. Associado a estas mudanças estruturais perceberam maior concentração de ácido hialurônico no sobrenadante da cultura dos fibroblastos. Estes achados diferem dos encontrados quando o HGF é adicionado à cultura de fibroblastos da mácula flava, que parecem não ser influenciados pela presença deste fator de crescimento quanto à produção de ácido hialurônico e mudanças de forma.

Luo et al., 2006 avaliaram o efeito de fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento beta 1 transformante e fator de crescimento básico de fibroblastos em culturas de fibroblastos humanos, simulando a lamina própria de pregas vocais. Dos fatores testados, o HGF se mostrou o único com propriedade de restauração da maleabilidade da lâmina própria pela indução da formação de maior quantidade de ácido hialurônico e elastina associada à menor acúmulo de colágeno.

Ohno et al., 2008 estudaram o efeito do fator de crescimento de hepatócitos na expressão gênica de pregas vocais submetidos a lesão aguda. Utilizaram PCR (polymerase chain reaction) para quantificar a expressão de RNA mensageiro de TGF- beta 1 , procolágeno tipos I e III, e hialuronato sintetase. Demonstraram evidências de que o tratamento com HGF auxilia nas vias de expressão de procolágeno tipo III e hialuronato sintetase HAS-2.

Branski et al., 2009 estudaram o efeito do fator de crescimento  $\beta$ 1 transformante (FCT- $\beta$ 1) em fibroblastos de pregas vocais humanas cultivadas. Avaliaram a produção de colágeno, migração e proliferação celular, após a adição de diferentes concentrações do fator de crescimento. Concluíram que a adição deste fator de crescimento em concentrações de 10 a 50 ng/ml induziu à produção total de colágeno, aumento da migração e proliferação de fibroblastos.

Kishimoto et al., 2009 estudaram o efeito do fator de crescimento de hepatócitos sobre a expressão gênica dos fibroblastos da matriz extracelular da prega vocal humana. Avaliaram a expressão de HGF endógeno, seu receptor c-Met, FCT- $\beta$ 1, procolágeno tipos I e III, ácido hialurônico sintetase (AHS-1 e AHS-2 , RNA mensageiro com PCR (polymerase chain reaction). Concluíram que FCH atinge a regulação do HGF endógeno, FCT- $\beta$ 1, RNA m AHS 1 e 2 da prega vocal humana.



## **4- MÉTODOS**

---

#### **4.1- Animais de experimentação**

Foram utilizados 20 coelhos, da raça New Zeland, pesando entre dois e três quilogramas, de ambos os gêneros. Os dois primeiros foram utilizados como piloto para sistematização do procedimento cirúrgico e análise histológica.

Foram excluídos da casuística os animais com quaisquer alterações laríngeas observadas durante o procedimento, os que morrerem fora do prazo definido para o abate e as fêmeas prenhes.

Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) UNICAMP, em gaiolas com água e "ração libitum", desde o pós-operatório imediato até o momento do sacrifício, de acordo com as normas do Comitê de Ética Animal da UNICAMP.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal IB UNICAMP, sob o numero 1033-1.

#### **4.2- Procedimentos cirúrgicos**

Após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à anestesia intramuscular, utilizando-se quetamina na dose de 25 mg/kg/dose e xilazina na dose de 3 mg/kg, mantidos em respiração espontânea. Os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal em um suporte em forma de canaleta, sobre a mesa cirúrgica. Foi realizada tricotomia da face anterior do pescoço do animal, medindo aproximadamente 8 x 8 cm. A anti-sepsia foi feita com polivinilpovidona a 10% e o animal coberto por campos cirúrgicos esterilizados, com exposição exclusiva do pescoço.

Foi realizada incisão longitudinal cervical ao nível da cartilagem tireóide de aproximadamente 4 cm de extensão utilizando bisturi de lâmina nº 15. O tecido subcutâneo foi incisado com bisturi elétrico até o plano da fáscia superficial, que foi exposta com a utilização de tesoura para dissecação romba. Foi excisado fragmento da fáscia de

aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. A fásia foi estendida sobre superfície metálica e deixada desidratar-se espontaneamente. (Figura 1)

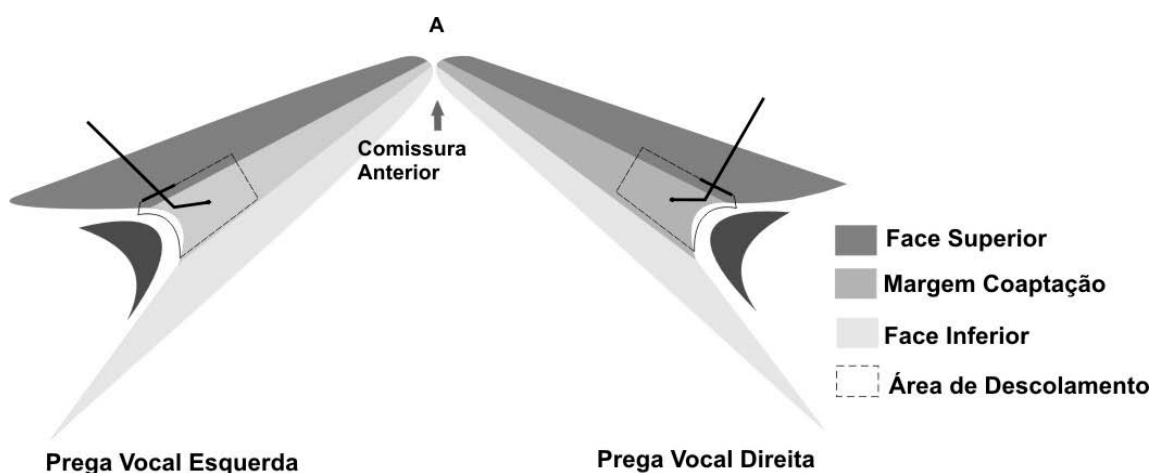
A seguir foi realizada dissecação do pescoço na linha média utilizando tesoura Metzembraum até o plano da laringe, com sua individualização. Realizada então, laringofissura, com extensão ao ligamento cricotireóideo, com ampla exposição das pregas vocais.



**Figura 1-** Animal submetido à exposição cirúrgica da laringe

A seguir, com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 10X, foi realizada incisão longitudinal de aproximadamente 2 mm de extensão, com bisturi, à frente do processo vocal, na face vestibular das pregas vocais, direita e esquerda (PVD e PVE), próximo à margem de coaptação. Subseqüentemente foi procedida à introdução do descolador na incisão efetuada, e confecção de túnel por dissecação romba, no sentido pósterio-anterior, paralelo à margem de coaptação da prega vocal, no nível da lâmina própria, separando-se cobertura e o ligamento vocal. Para tanto, foi utilizado micro bisturi para incisão mucosa e micro dissector rombo em forma de “L” com angulação de 30 °. Com utilização de régua graduada foi confeccionado fragmento de fásia cervical

superficial de 0,1 x 0,1 cm, que foi introduzido no túnel submucoso criado na CSLP (espaço de Reinke) de ambas as pregas vocais. Na prega vocal direita foi realizada injeção de 5µl de Fator de Crescimento de Fibroblastos (100 ng em 100microlitros) imediatamente após o enxerto de fásia, em ponto estabelecido à frente do processo vocal da aritenóide. (Figura 2)



**Figura 2-** Representação esquemática do procedimento cirúrgico nas pregas vocais

Na prega vocal esquerda foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem injeção de FGF. Este lado serviu como controle histológico das alterações causadas pela enxertia de fásia isolada.

Após a revisão da hemostasia por diatermocoagulação, foi realizada síntese da ferida em pontos separados com fio de náilon 3.0.

#### **4.3- Avaliação histológica dos resultados**

Os animais foram sacrificados utilizando-se 3 ml de Thiopental sódico a 1% seguidos por quatro ml de KCl a 19,1% intravenoso em “bolus” e suas laringes excisadas para exame histológico.

Os coelhos foram divididos em dois grupos de doze animais. O grupo A foi sacrificado doze meses após o procedimento cirúrgico e o grupo B após um mês do procedimento. Os coelhos foram sequencialmente numerados de 1 a 12. Os coelhos sacrificados fora do prazo foram excluídos da casuística.

Quatro coelhos do grupo A e quatro coelhos do grupo B adoeceram, foram sacrificados e excluídos da pesquisa.

**Tabela 1-** Lista dos animais dos grupos A e B

<b>GRUPOS</b>	<b>Numero dos coelhos</b>					
<b>A</b>	1	2	3	4	5	6
<b>B</b>	7	8	9	10	11	12

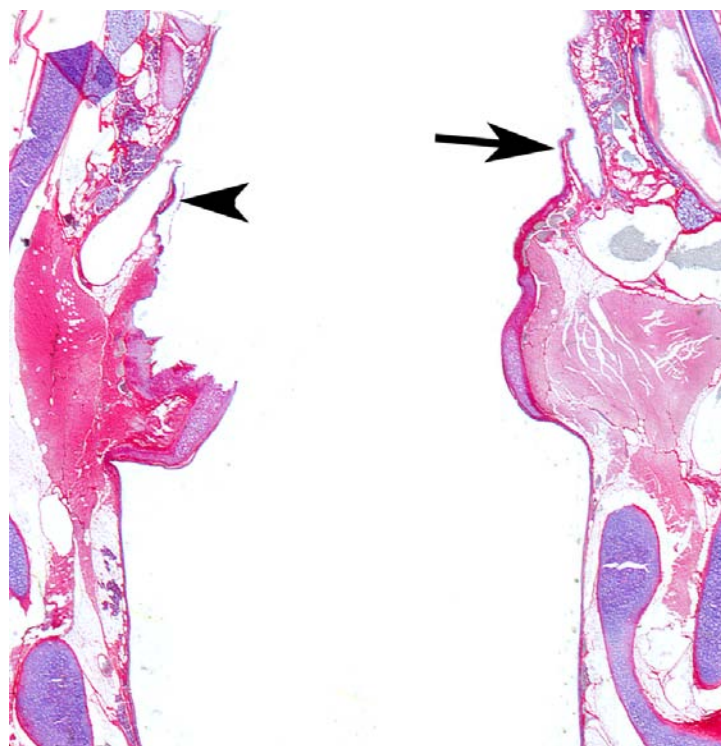
O estudo histológico com as colorações hematoxilina eosina (HE) e com tricrômico de Masson foi realizado por dois patologistas do departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP em momentos distintos. O análise da densidade do colágeno utilizando a coloração com ácido pícrico e sirius red (picro-sirius) foi realizada pelo prof. Dr. Luiz Fernando Silva do Departamento de Anatomia Patológica da faculdade de Medicina da USP São Paulo.

As laringes, após avaliação macroscópica, foram fixadas por imersão em formol a 10% durante 48 horas. As peças foram abertas posteriormente, por secção mediana da lâmina da cartilagem cricóidea. As pregas vocais foram ressecadas em monobloco por secção axial da cartilagem tireóidea foram colocadas em cápsulas plásticas identificadas com o número do animal e, posteriormente, encaminhadas para processamento histológico. A cartilagem tireóidea do lado direito foi pintada com azul de metileno, para que posteriormente, na análise histológica, fossem identificados os lados corretamente.

O processamento consistiu em sete banhos seqüenciais de uma hora cada, em álcool absoluto, para desidratação. Após, por três banhos em xilol ap, também durante uma hora, para diafanização. Por fim, três banhos em parafina líquida a 60°C. Os fragmentos de

prega vocal foram colocados em moldes metálicos, cobertos por parafina a 66°C e submetidos a resfriamento em placa de gelo até o endurecimento da parafina. Após a solidificação resultou um bloco de parafina contendo ambas as pregas vocais, identificadas com o número do animal ao qual pertença.

A seguir, a laringe foi submetida à secção coronal obtendo-se no mesmo lâmina, fragmentos de ambas as pregas vocais, aproximadamente no mesmo nível de corte. (Figura 3)



**Figura 3-** Corte histológico coronal da laringe. Detalhe das pregas vocais (setas)

Os blocos foram submetidos a cortes coronais por micrótomo, com profundidade de três micrometros. Em cada lâmina foram montados dois cortes contendo ambas as pregas vocais. Para a confecção das lâminas, os cortes histológicos foram colocados sobre as lâminas de vidro, aquecidas em estufa durante cinco minutos para derreter a parafina. A seguir, foram banhadas em xilol ap para desparafinizar. Foram rehidratadas em banho rápido em álcool absoluto e lavadas em água corrente por cinco minutos. Foram encaminhadas para coloração com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e picro-sirius.

Para a coloração com hematoxilina e eosina, as lâminas permaneceram por cinco minutos em hematoxilina, foram lavadas em água corrente, rapidamente, e permaneceram mais cinco minutos em banho de eosina. Para finalizar, as lâminas foram acrescidas de resina e lamínula e postas para secar por 24 horas.

Para a coloração com Tricrômico de Masson, as laminas foram colocadas em banho com solução de Bouin e aquecidas a 60<sup>0</sup> em estufa por uma hora. A seguir, foram lavadas em água corrente, passadas por água destilada, e permaneceram em banho de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos. Lavadas novamente em água corrente por 10 minutos e passadas em água destilada. A seguir foram coradas pela solução escarlate de Biebrich por cinco minutos, e novamente passadas por água destilada. Passaram por banho na solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomólfbdico durante 15 minutos e, foram passadas em água destilada. A seguir, novamente coradas com solução de azul de anilina durante cinco a dez minutos e lavadas com água destilada. Finalmente, as laminas passaram por solução de ácido acético glacial 1% por três minutos e após uma última passagem por água destilada, acrescidas a resina e lamínula e postas para secar por 24 horas.

Para a coloração com picro sirius, as lâminas foram coradas com a hematoxilina férrica de Weigert por oito minutos, e então, lavadas em água corrente por dez minutos. A seguir novamente coradas, desta vez por solução contendo 0,5 g de Sirius red em 500 ml de ácido pícrico por uma hora. Lavadas então por duas vezes em água acidificada. Foram secadas por agitação vigorosa e desidratadas e colocadas para desidratação em etanol 100%. A seguir, acrescidas de resina e lamínula e postas para secar por 24 horas.

Os cortes histológicos tratados pela técnica de coloração picro sirius (*Picrosirius-red F3BA*). Este método permite calcular a densidade de colágeno nas pregas vocais a partir da intensidade do tom de vermelho em que as fibras de colágeno são coradas. As imagens foram capturadas pelo sistema Sony<sup>®</sup> CCD 101/Trinitron<sup>®</sup>, digitalizadas por placa digitalizadora Oculus TCX<sup>®</sup> e analisadas pelo aplicativo Image Plus 4.5 para Windows. Para cada lâmina, foi realizada a leitura de campos sucessivos em toda a extensão da prega vocal, acompanhando o epitélio, com ampliação de 20 X. Foram obtidas as médias das leituras.

Ao exame, se o tecido da prega vocal não estivesse bem visível, mais quatro cortes eram realizados, até que o corte mais representativo fosse encontrado. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica convencional, nas objetivas de 4, 10 e 40 vezes, com análise dos seguintes parâmetros: número de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), presença de fibrose, neoformação vascular e reação tipo corpo estranho. Nos cortes histológicos corados pelo método picrossirius, o parâmetro analisado foi somente a densidade das fibras colágenas.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada semiquantitativamente. Comparou-se a faixa de tecido da lâmina própria da prega vocal com o tecido além desta área, numa extensão de 3 campos de maior aumento (X 40). A reação inflamatória foi classificada com os seguintes critérios:

- Ausente (Ø): Não foram observadas células inflamatórias;
- Leve (I): Quando se observaram 1 a 10 células mononucleares maduras;
- Moderada (II): Quando se observaram 11 a 20 células mononucleares maduras;
- Intensa (III): Quando se observaram mais que 20 células mononucleares maduras;

A reação inflamatória foi, ainda, classificada como aguda quando havia predomínio de polimorfonucleares, e reação crônica do tipo corpo estranho, quando havia predomínio de macrófagos ativos.

A celularidade foi classificada de acordo com o tipo celular predominante na lâmina própria da prega vocal. Comparou-se a faixa de tecido da lâmina própria da prega vocal com o tecido além desta área, numa extensão de 3 campos de maior aumento (X 40).

A intensidade da fibrose foi avaliada semiquantitativamente. Comparou-se a faixa de tecido da lâmina própria da prega vocal com o tecido além desta área, numa extensão de 3 campos de maior aumento (X 40). Foi classificada de acordo com os seguintes critérios:



Ausente (Ø):	Não foram observadas fibras colágenas;
Leve (I):	Presença de focos esparsos de fibras colágenas;
Moderada (II):	Traves contínuas de fibras colágenas circunjacentes ao enxerto;
Intensas (III):	Longas faixas de fibras colágenas em torno do enxerto, constituindo cápsula fibrosa.

A neoformação vascular foi analisada na lâmina própria da prega vocal, quanto à ausência ou presença de vasos com paredes finas ou em processo de formação.

Esses parâmetros foram analisados na prega vocal fora da região submetida ao enxerto de fáscia e injeção de fator de crescimento de fibroblastos. Igualmente, na prega vocal contralateral, que também foi submetida ao enxerto, porém sem a adição do FGF que serviu como controle do estudo.

A análise estatística dos resultados obtidos quanto à intensidade do infiltrado, tipo de reação inflamatória e presença de neovascularização com as lâminas coradas por HE, e a intensidade da fibrogênese com Tricrômico de Masson, foram realizadas com o teste exato de Fisher, por testar hipótese univariada, em dois grupos de indivíduos diferentes e com mensuração nominal.

A análise estatística dos resultados obtidos como o cálculo da densidade de fibras colágenas, coradas por picrossírius, foi realizada utilizando-se testes pareados não paramétricos (Teste T pareado, teste de Wilcoxon) entre o lado direito e esquerdo dos animais, nos períodos de tempo avaliados.

O  $p$ -valor $<0.05$  indica diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos comparados, com intervalo de confiança e 95%, enquanto que o  $p$ -valor $>0.05$  indica que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

## **5- RESULTADOS**

---

## 5.1- Análise histológica grupo A

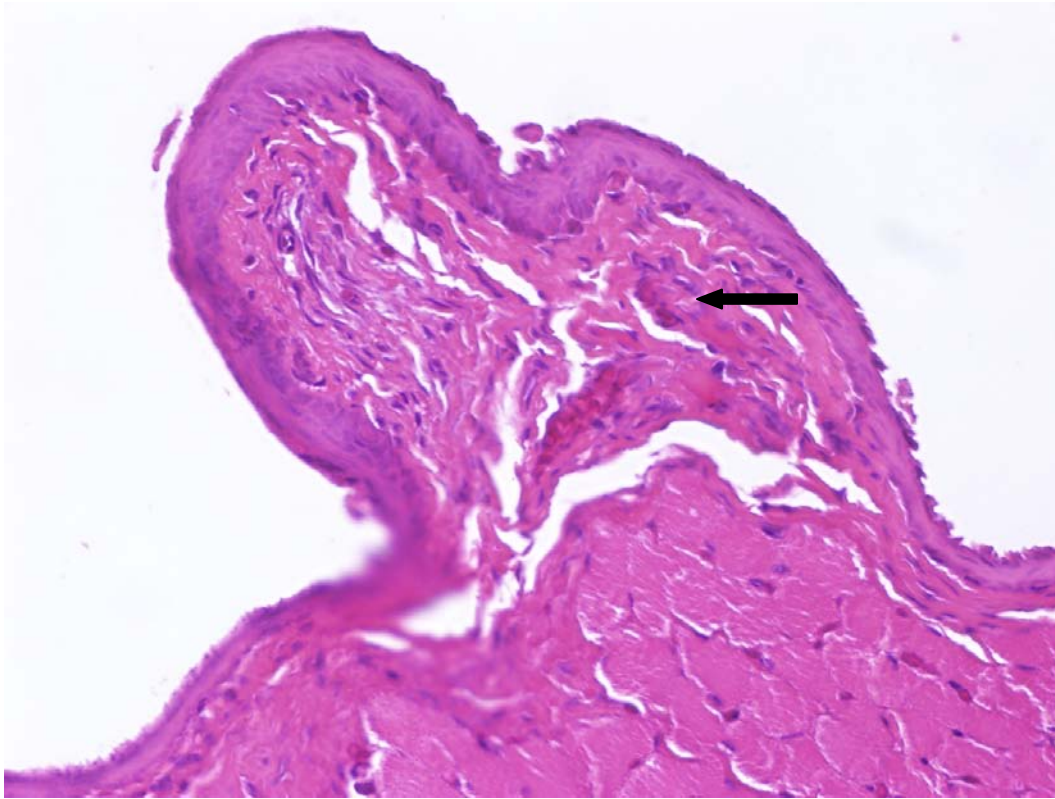
Os aspectos histológicos encontrados em ambas as pregas vocais do grupo A estão expostos na tabela 2 e do grupo B estão expostos na tabela 3.

**Tabela 2-** Aspectos histológicos encontrados no grupo A

Numero do coelho	Intensidade do infiltrado		Predomínio celular		Intensidade da fibrose		Reação crônica		Neo vascularização	
	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE
1	I	I	LH	Ø	II	Ø	Ø	Ø	I	Ø
2	I	I	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
3	II	I	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
4	I	I	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
5	I	I	L	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
6	I	I	L	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø

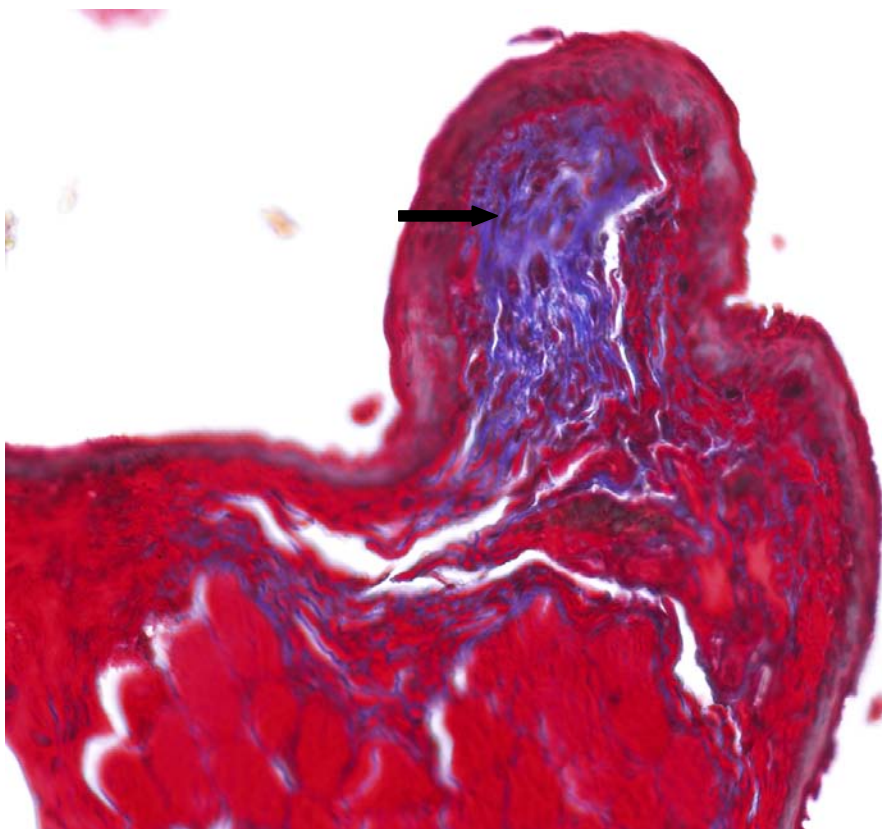
Intensidade do processo inflamatório: ausente (Ø), leve (I), moderado (II), intenso (III); Predomínio de celularidade: Polimorfonucleares (P), Linfocitário (L), Linfocitário (LH), Histiocitário (H); Intensidade da fibrose: ausente (Ø), leve (I), moderado (II), intenso (III); Reação gigante celular: ausente (Ø), presente (I); Presença de neovascularização: ausente (Ø), presente (I)

A figura 4 mostra, em aumento de 20X, a prega vocal direita com enxerto de fásia associada à injeção de FGF do coelho 2, corado por HE. Identifica-se discreta fibrose subepitelial, com infiltrado inflamatório leve. Os núcleos celulares presentes neste corte representam fibroblastos e miofibroblastos.



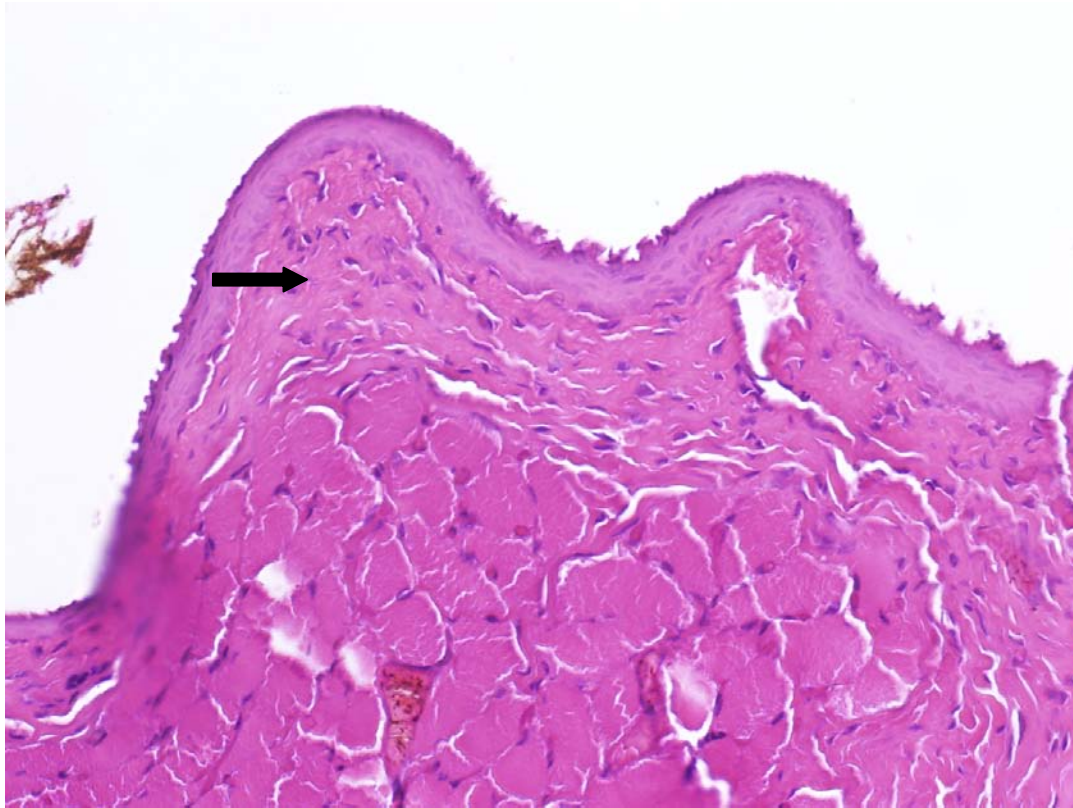
**Figura 4-** Prega vocal direita (coelho 2) com enxerto de fásia na lâmina própria, com a adição de fator de crescimento de fibroblastos, em animal sacrificado após 12 meses. Corte corado com HE. Observar discreto infiltrado inflamatório (seta). (20X)

Na figura 5, aumento de 20 X, a prega vocal direita com enxerto de fásia associada à injeção de FGF do coelho 2, corado por Tri crômico de Masson. Nessa coloração própria para identificação de fibras colágenas, percebe-se melhor a fibrose de grau leve, com deposição irregular de fibras colágenas.



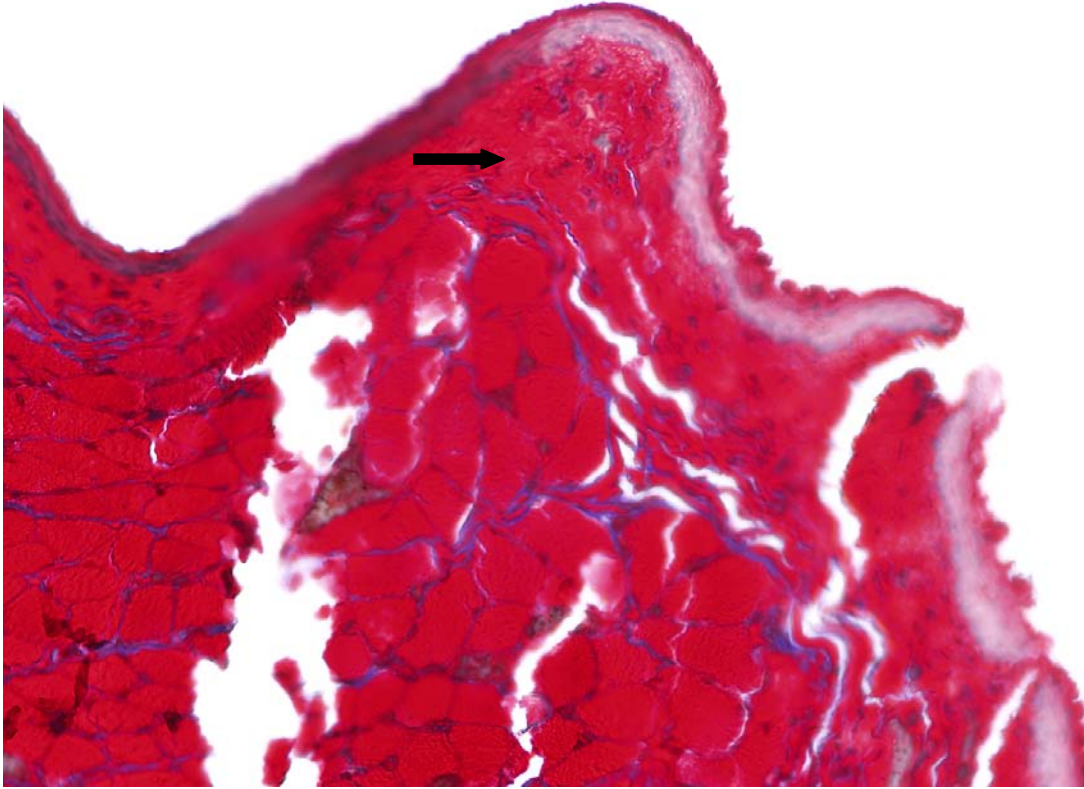
**Figura 5-** Prega vocal direita (coelho 2), com enxerto de fásia na lâmina própria e a adição de FGF em animal sacrificado após 12 meses. Mesmo corte da figura 4, corado por Tricrômico de Masson. Evidencia-se fibrose leve com deposição irregular de fibras colágenas em localização subepitelial, corado em azul (seta).(20X)

A figura 6 mostra a prega vocal esquerda, controle das figuras anteriores, referentes ao coelho 2, salientando o discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria.



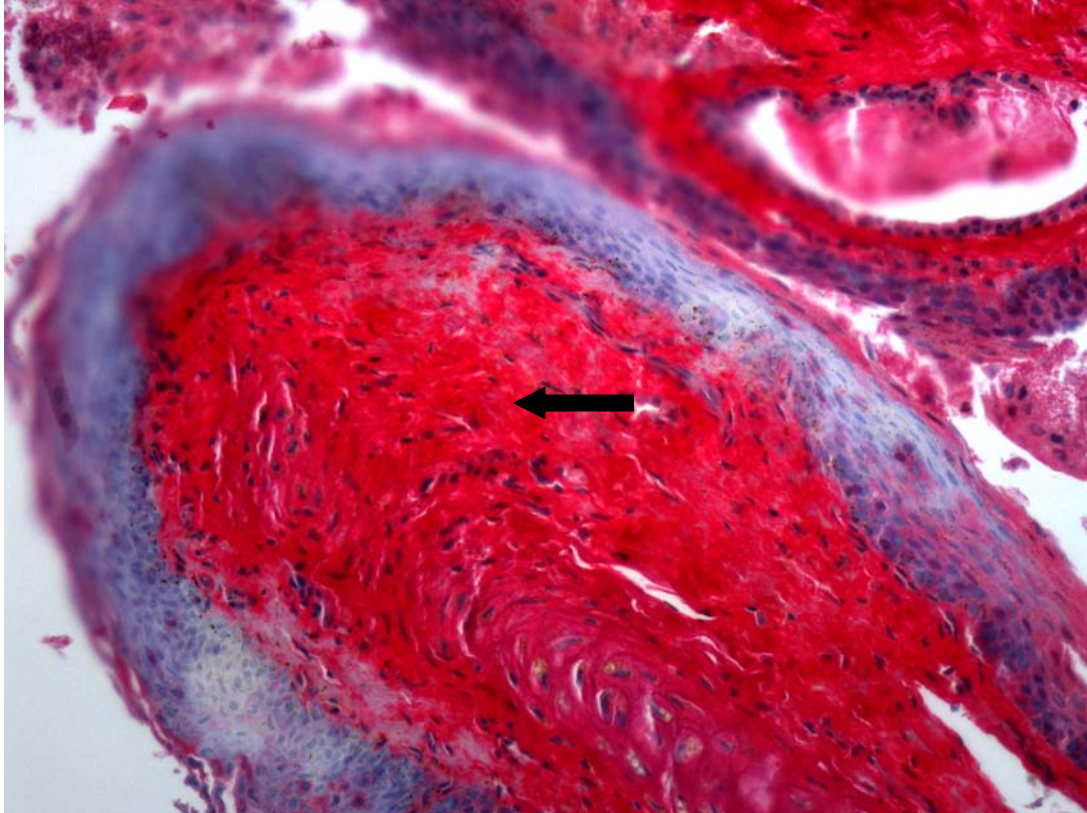
**Figura 6-** Prega vocal esquerda, com enxerto de fásia sem adição de FGF(coelho 2), sacrificado após 12 meses. Observar discreto infiltrado inflamatório (seta) (20X)  
HE

A figura 7 corte histológico no mesmo nível anterior, corado por Tricrômico de Masson (20X) da prega vocal esquerda, apenas com enxerto de fáscia (controle) do coelho 2, onde pode-se observar que a lâmina própria não apresenta fibrose, tem baixa celularidade e ausência de neoformação vascular.



**Figura 7-** Prega vocal esquerda, submetido apenas ao enxerto de fáscia (coelho 2), controle de animal sacrificado após 12 meses. Mesmo corte da figura 6, corado por Tricrômico de Masson. Observar que a ausência de fibrose. (20X)

Na figura 8, corte histológico da prega vocal direita (coelho 3), corado por picro sirius. Percebe-se aumento da densidade das fibras colágenas, coradas em vermelho, e discreto infiltrado inflamatório.



**Figura 8-** Prega vocal direita (Coelho 3) com enxertia de fásia e adição de FGF na lâmina própria de animal sacrificado após 12 meses. Corado por picro sirius. Neste caso percebe-se aumento da densidade das fibras colágenas, coradas em vermelho, e discreto infiltrado inflamatório. (20X)(seta)



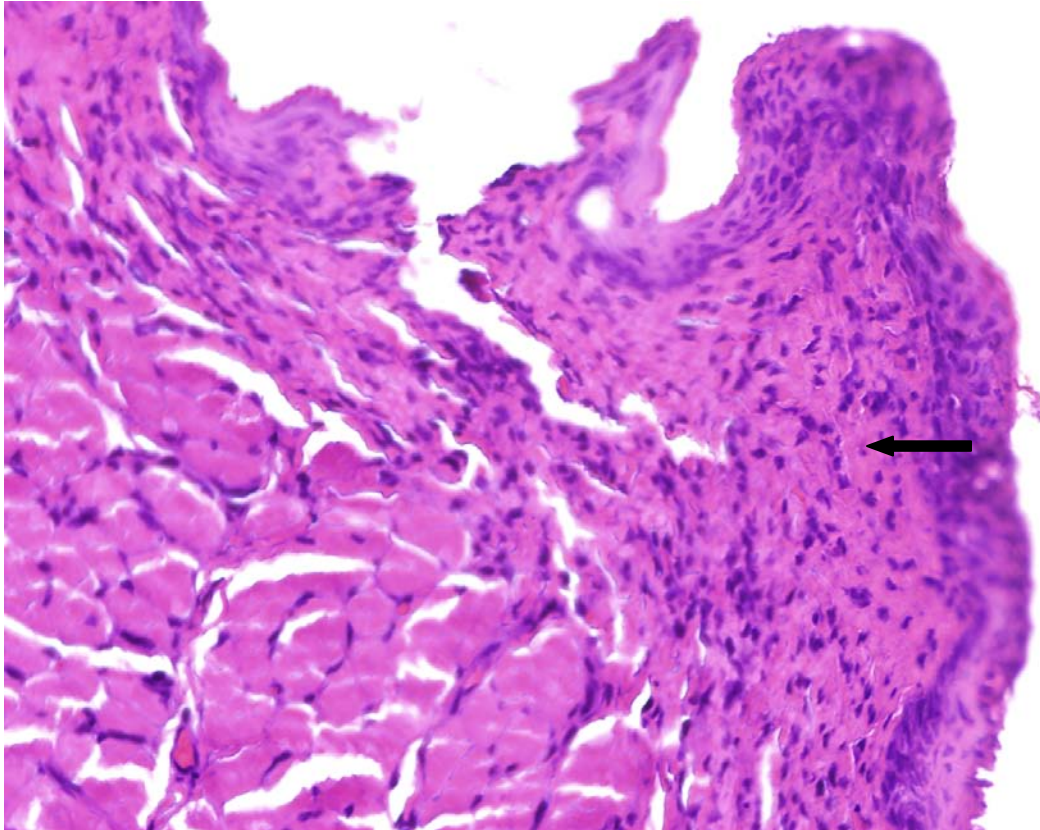
## 5.2- Análise histológica grupo B

**Tabela 3-** Aspectos histológicos encontrados no grupo B

Número do coelho	Intensidade do infiltrado		Predomínio celular		Intensidade da fibrose		Reação crônica		Neo vascularização	
	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE
7	II	Ø	H	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
8	II	I	LH	L	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
9	III	I	L	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
10	II	II	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
11	III	I	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
12	III	I	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

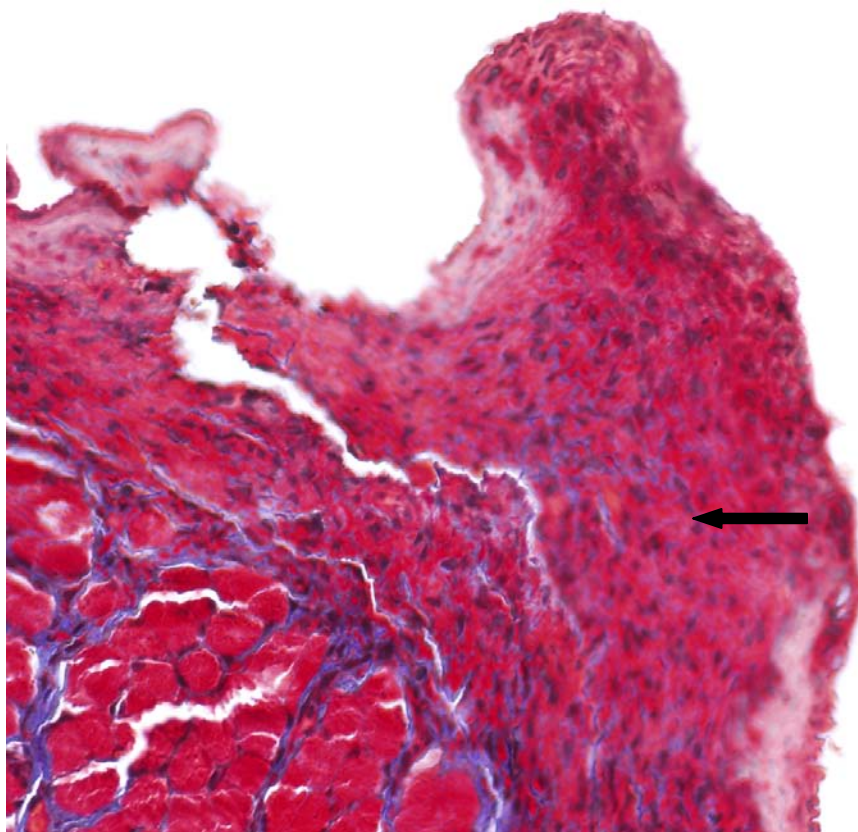
Intensidade do processo inflamatório: ausente (Ø), leve (I), moderado (II), intenso (III); Predomínio de celularidade: Polimorfonucleares (P), Linfocitário (L), Linfocitário (LH), Histiocitário (H); Intensidade da fibrose: ausente (Ø), leve (I), moderado (II), intenso (III); Reação gigante celular: ausente (Ø), presente (I); Presença de neovascularização: ausente (Ø), presente (I)

A figura 9 (coelho 11) apresenta o aspecto da prega vocal submetida ao enxerto de fásia com adição de fator de crescimento de fibroblastos após um mês. Observa-se infiltrado inflamatório intenso, composto principalmente por histiócitos.



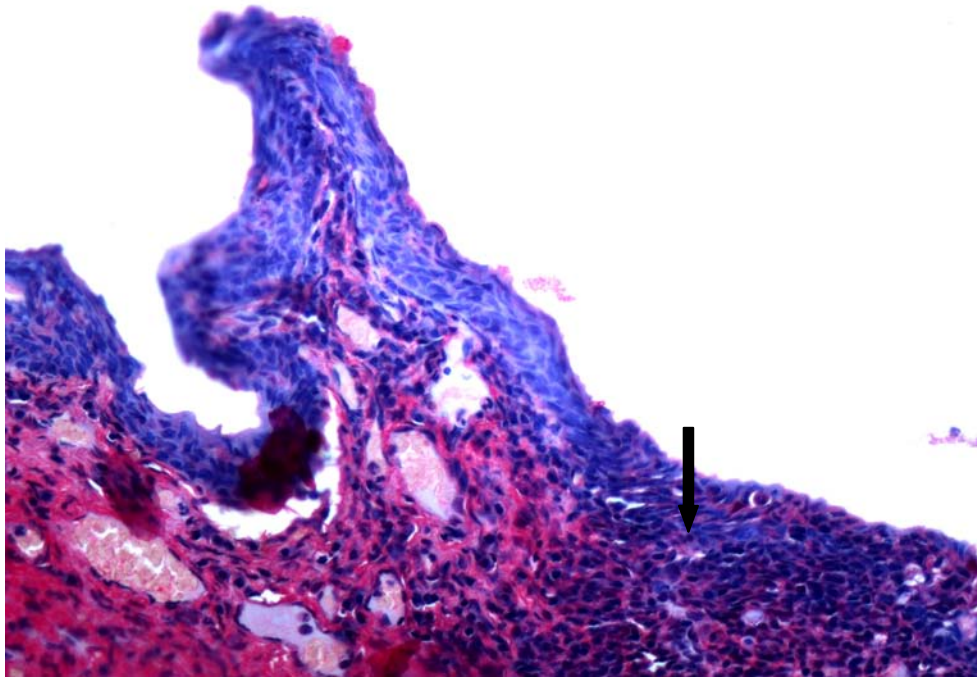
**Figura 9-** Prega vocal direita, (coelho 11), com enxertia de fásia na lâmina própria associada ao FGF em animal sacrificado após um mês, corado por HE. Observar a celularidade bastante aumentada (seta). (20X)

Na figura 10 observa-se o aspecto da prega vocal direita do mesmo animal (coelho 11) (corado por Tricrômico de Masson, em aumento de 20X). Observar o aumento da celularidade, e a presença de fibrose discreta. Os cortes apresentam aumento do número de fibroblastos.



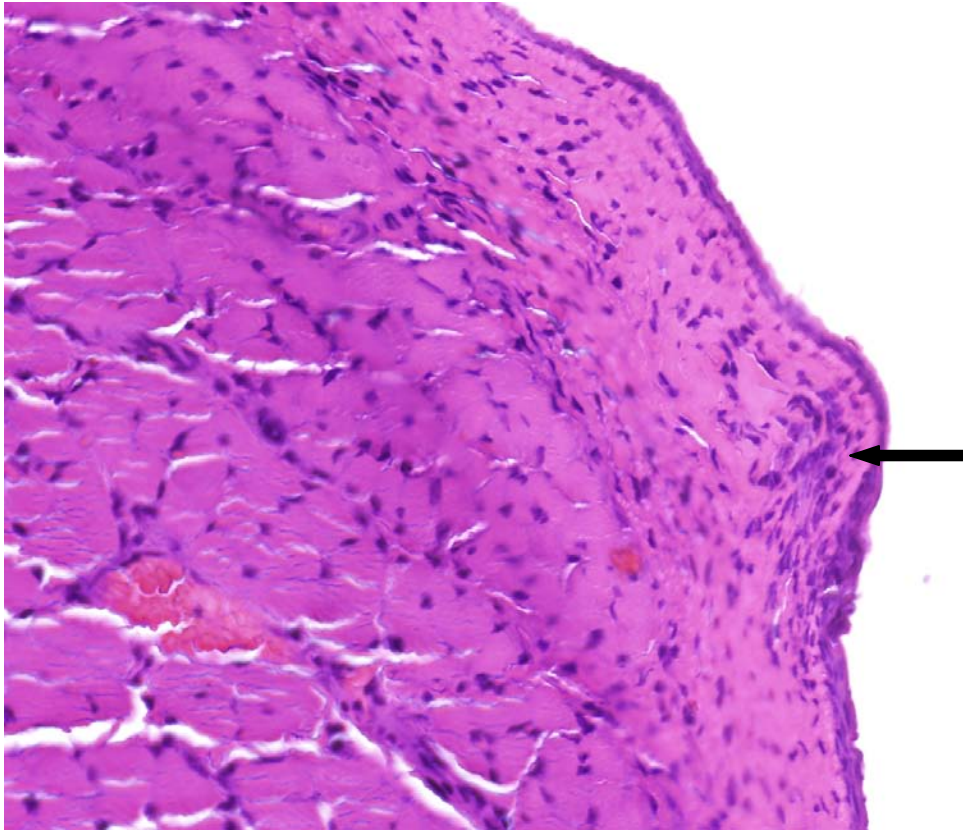
**Figura 10-** Prega vocal direita, (coelho 11), com enxerto de fáscia na lâmina própria associada ao FGF em animal sacrificado após um mês, corado por Tricrômico de Masson. Observar a fibrose muito leve corada em azul (seta). (20X)

Na figura 11 observa-se o aspecto da prega vocal direita do mesmo animal (coelho11). Observar o aumento da celularidade, porém e não se observa o aumento da densidade do colágeno (corado por picro sirius, em aumento de 20X). Os cortes apresentam aumento do número de fibroblastos, histiócitos e linfócitos.



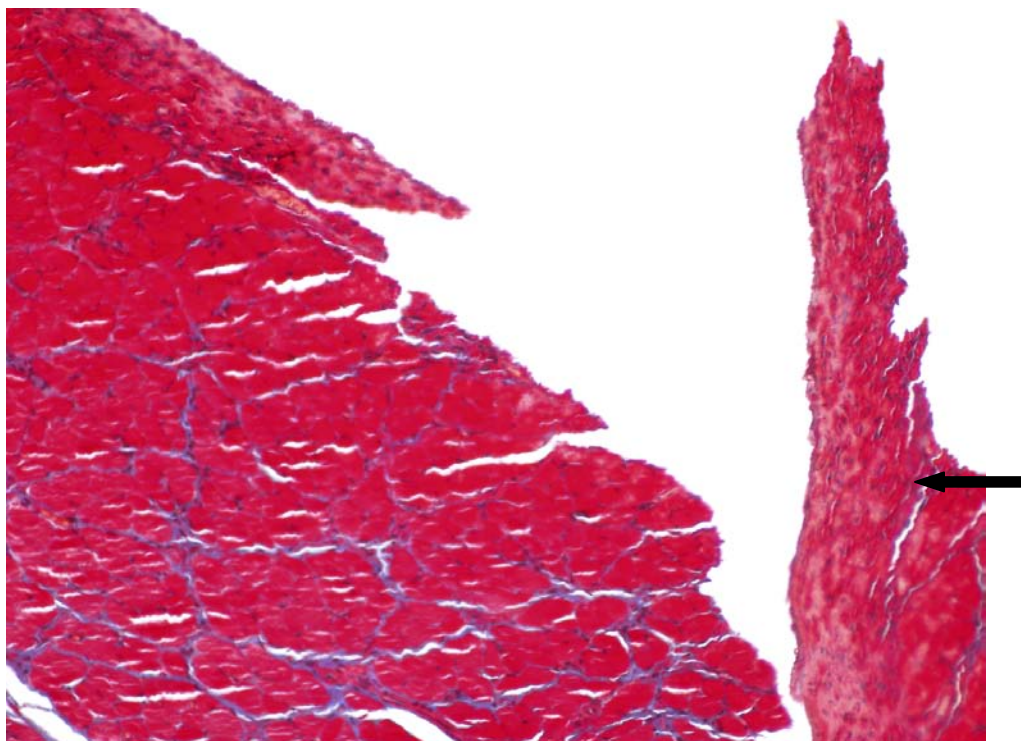
**Figura 11-** Prega vocal direita, (coelho 11), com enxertia de fásia na lâmina própria, associada ao FGF em animal sacrificado após um mês, corado por picro sirius. A intensidade do infiltrado inflamatório, com aumento da quantidade de fibroblastos (seta). (20X)

A figura 12 apresenta detalhe da prega vocal esquerda (controle) do coelho 11(em aumento de 20X). A lâmina própria tem aspecto muito semelhante ao da lâmina própria da prega vocal contralateral, no que diz respeito à celularidade, porém, em menor intensidade e ausência de fibrose.



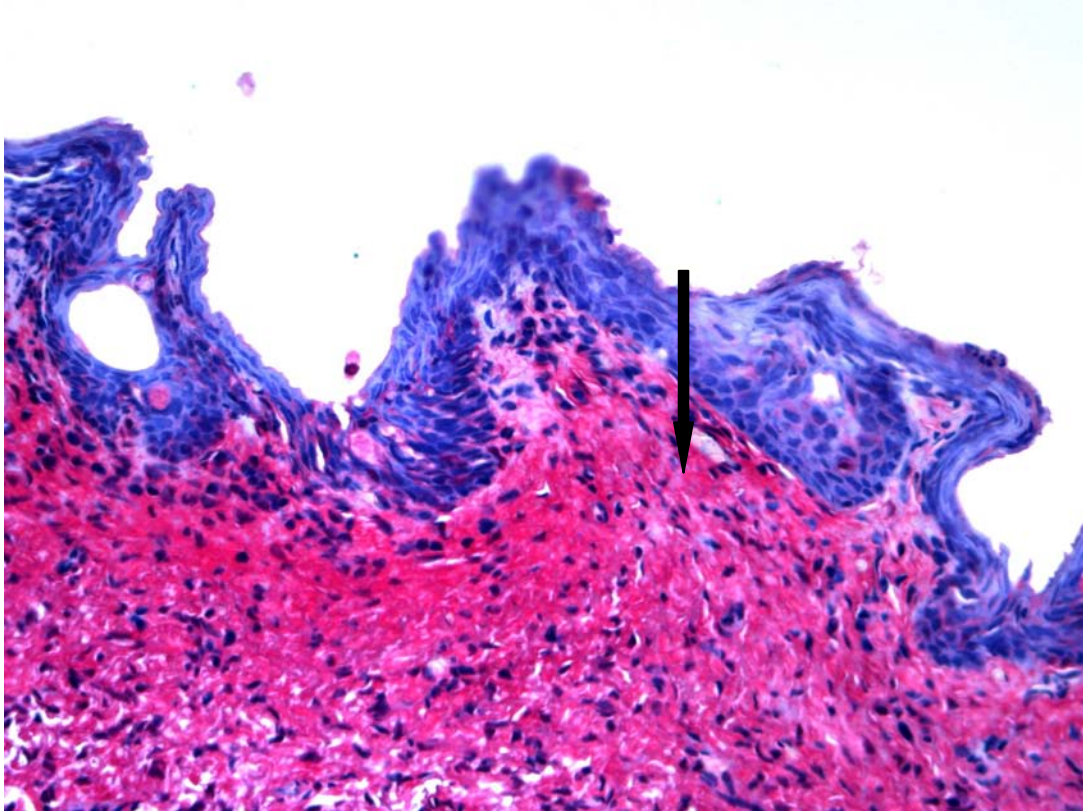
**Figura 12-** Prega vocal esquerda (coelho 11), em animal sacrificado após um mês, com enxerto da fáscia na lâmina própria, porém, sem adição de FGF, corado por HE. Observar infiltrado inflamatório discreto (seta). (20X)

Na figura 13 (coelho 11) nota-se que lâmina própria não apresenta fibrose significativa.



**Figura 13-** Prega vocal esquerda (coelho 11), em animal sacrificado após um mês, com enxerto de fásia na lâmina própria, sem adição do FGF, corado por Tricrômico de Masson. Notar a ausência de fibrose significativa na lâmina própria (seta). (20X)

A figura 14 mostra, em detalhe, a prega vocal esquerda (coelho 11). Observar que não houve aumento na densidade do colágeno. Houve aumento na celularidade, porém, em menor intensidade que a prega contralateral.



**Figura 14-** Prega vocal esquerda, (coelho 11), lado controle, em animal sacrificado após um mês, corado por picro sirius. Observar que não houve aumento na densidade do colágeno (seta). (20X)

### 5.3- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos no grau da reação inflamatória nos períodos estudados.

**Tabela 4-** Análise comparativa da intensidade do infiltrado inflamatório entre o lado submetido à enxertia de injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem a adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).

Prega vocal	Ausente	Leve	Moderado	Intenso	Total
PVD	0,0%	83,4%	16,6%	0,0%	100%
PVE	16,6%	83,4%	0,0%	0,0%	100%

**Tabela 5-** Análise comparativa da intensidade do infiltrado inflamatório entre o lado submetido à enxertia de injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem a adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).

Prega vocal	Ausente	Leve	Moderado	Intenso	Total
PVD	0,0%	0,0%	50%	50,0%	100%
PVE	16,6%	66,8 %	16,6%	0,0%	100%

Após um mês do procedimento inicial, o fator de crescimento promoveu aumento da reação inflamatória. Ao contrário do grupo de animais com um ano de acompanhamento, onde não houve desencadeamento de reação inflamatória evidente.

**Tabela 6-** Análise da reação inflamatória na prega vocal esquerda nos períodos avaliados.

Grupo	Ausente	Leve	Moderado	Intensa	Total
Após um mês	16,6%	66,8%	16,6%	0%	100%
Após um ano	16,6%	83,4%	0%	0%	100%

**p= 0,57375**



**Tabela 7-** Análise da reação inflamatória na prega vocal direita nos períodos avaliados.

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Intensa</b>	<b>Total</b>
Após um mês	0	0	50%	50%	100%
Após um ano	0	83,4%	16,6%	0%	100%

**p= 0,01111**

A comparação da intensidade da resposta inflamatória na prega vocal esquerda (controle), não mostrou diferença estatística significativa, nos períodos avaliados (p=0,57375).

O lado com fator de crescimento mostrou diferença significativa entre os períodos avaliados (p-valor = 0,01, com 2 graus de liberdade). Ou seja, após um mês o fator de crescimento mostrou-se associado à reação inflamatória moderada ou intensa, e para o grupo com um ano de acompanhamento, o fator de crescimento se mostrou associado com uma leve reação inflamatória.

#### 5.4- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos no predomínio celular, nos períodos estudados.

**Tabela 8-** Análise comparativa do predomínio celular entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).

Grupo	Ausente	linfocitário	Linfohistiocitário	Histiocitário	Total
PVD	0,0%	33,2%	66,8%	0	100%
PVE	0,0%	16,6%	83,4	0	100%

**P=0,182**

**Tabela 9-** Análise comparativa dos animais quanto ao predomínio celular entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).

Grupo	Ausente	linfocitário	Linfohistiocitário	Histiocitário	Total
PVD	0,0%	0,0%	83,4	16,6%	100%
PVE	0,0%	16,6%	66,8%	16,6%	100%

**P=0,141**

A prega vocal controle não apresentou, após 1 ano, qualquer resposta inflamatória. No entanto, a prega vocal direita apresentou predomínio linfohistiocitário.

A análise comparativa da celularidade da lâmina própria no lado submetido à enxertia associada a injeção do fator de crescimento e no lado controle, nos coelhos sacrificados após 1 mês, mostra predomínio linfohistiocitário sem diferença estatística entre os lados .

**Tabela 10-** Análise do predomínio celular na prega vocal esquerda nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>linfocitário</b>	<b>Linfohistocitário</b>	<b>Histiocitário</b>	<b>Total</b>
Após um mês	0,0%	16,6%	83,4%	0,0%	100%
Após um ano	0,0%	16,6%	83,4%	0,0%	100%

**P=1,0**

**Tabela 11-** Análise do predomínio celular na prega vocal direita nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>linfocitário</b>	<b>Linfohistocitário</b>	<b>Histiocitário</b>	<b>Total</b>
Após um mês	0,0%	16,6%	66,8%	16,6%	100%
Após um ano	0,0%	33,2%	66,8%	0	100%

**P=0,51342**

No grupo examinado após um mês, o lado controle esteve associado à presença de infiltrado inflamatório linfohistocitário. No grupo examinado após um ano, no lado controle houve ausência de células inflamatórias. No lado em que foi aplicado fator de crescimento, não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando associação com infiltrado inflamatório linfohistocitário. Como se o fator de crescimento induzisse migração dessas células.

### 5.5- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na indução de fibrose, nos períodos estudados

**Tabela 12-** Análise comparativa da intensidade da fibrose entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).

Prega vocal	Ausente	Leve	Moderado	Intenso	Total
PVD	0,0%	83,4%	16,6%	00,0%	100%
PVE	0,0%	0,0 %	0,0%	0,0%	0.0%

**P= 0,0182**

**Tabela 13-** Análise comparativa da intensidade da fibrose entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).

Prega vocal	Ausente	Leve	Moderado	Intenso	Total
PVD	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
PVE	0,0%	0,0 %	0,0%	0,0%	0.0%

**P= 1,0**

Nos coelhos examinados após um mês, o fator de crescimento não teve nenhuma influência na indução da fibrose. Mas, nos coelhos examinados após um ano, o fator de crescimento esteve associado à indução da fibrose.

**Tabela 14-** Análise comparativa da intensidade da fibrose presente no lado controle, nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Total</b>
Após um mês	100%	0,0%	0,0%	100%
Após um ano	100%	0,0%	0,0%	100%

**p= 1,00**

**Tabela 15-** Análise comparativa da intensidade da fibrose presente no lado submetido a injeção de FGF, nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Total</b>
Após um mês	100%	0,0%	0,0%	100%
Após um ano	0,0%	83,8%	16,6%	100%

**p= 0,01431**

Os grupos não mostraram fibrose, no lado sem fator de crescimento.

O lado com fator de crescimento mostrou fibrose leve para o grupo examinado após um ano, com significancia estatística.

## 5.6- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na presença da reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho, nos períodos estudados

**Tabela 16-** Análise comparativa da presença de reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A(12 meses).

Prega vocal	Ausente	Presente	Total
PVD	0,0%	0,0%	0,0%
PVE	0,0%	0,0 %	0.0%

P= 1,0

**Tabela 17-** Análise comparativa da presença de reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).

Prega vocal	Ausente	Presente	Total
PVD	0,0%	0,0%	0,0%
PVE	0,0%	0,0 %	0.0%

P= 1,0

Em nenhum dos experimentos foi observada a presença de reação inflamatória crônica.

## 5.7- Análises comparativas da influência do fator de crescimento na neovascularização, nos períodos estudados

**Tabela 18-** Análise comparativa da presença de neovascularização entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo A (12 meses).

Prega vocal	Ausente	Presente	Total
PVD	100,0%	0,0%	100,0%
PVE	0,0%	0,0 %	0.0%

P= 0,1431

**Tabela 19-** Análise comparativa da presença de neovascularização entre o lado submetido à injeção de FGF (PVD) e o lado controle, sem adição de FGF (PVE) do grupo B (1 mês).

Prega vocal	Ausente	Presente	Total
PVD	0,0%	0,0%	0,0%
PVE	0,0%	0,0 %	0.0%

P= 1,0

O grupo examinado após um mês, o fator de crescimento não teve influencia na neovascularização, mostrando-se ausente. O grupo examinado após um ano, o fator de crescimento fez diferença na angiogênese entre os lados.

**Tabela 20-** Análise da presença da neovascularização na prega vocal esquerda nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>Presente</b>	<b>Total</b>
Após um mês	100%	0,0%	100%
Após um ano	100%	0,0%	100%

**p= 1,00**

**Tabela 21-** Análise da presença da neovascularização na prega vocal direita nos períodos avaliados

<b>Grupo</b>	<b>Ausente</b>	<b>Presente</b>	<b>Total</b>
Após um mês	100%	0,0%	100%
Após um ano	0,0%	100%	100%

**p= 0,1431**

O lado sem fator de crescimento, não mostrou nenhum caso de neovascularização. O lado com fator de crescimento, mostrou, para o todo grupo examinado após um ano, com neovascularização.

### **5.8- Análises comparativas da influência do fator de crescimento de fibroblastos na indução de formação de colágeno, nos períodos estudados**

**Tabela 22-** Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um ano, utilizando Teste t pareado.

<b>Prega vocal</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Direita	6	0,3057	0,30093	0,01	0,84
Esquerda	6	0,3509	0,27858	0,0	0,77



Após um ano não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras colágenas entre as pregas vocais, direita e esquerda.

**Tabela 23-** Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um ano, utilizando teste de Wilcoxon Signed Ranks

		<b>n</b>	<b>Taxa média</b>	<b>Sum taxa</b>
Esquerda - direita	Taxas negativas	3 <sup>a</sup>	3,00	9,00
	Taxas negativas	3 <sup>b</sup>	4,00	12,00
	Ties	0 <sup>c</sup>		
	Total	6		

a esquerda < direita; b esquerda > direita; c esquerda = direita

Após um ano não houve diferença estatística quanto à densidade de fibras colágenas entre as pregas vocais, direita e esquerda.

**Tabela 24-** Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um mês, utilizando Teste t pareado

<b>Prega vocal</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Direita	3	0,388	0,3132	0,00	0,07
Esquerda	2	0,012	0,00147	0,0	0,0

A análise deste parâmetro foi prejudicada, pois foi avaliada utilizando dados de dois animais, sendo menos confiável.

**Tabela 25-** Comparação das pregas vocais direita e esquerda quanto a densidade de fibras colágenas após um mês, utilizando teste de Wilcoxon Signed Ranks

		<b>n</b>	<b>Taxa média</b>	<b>Sum taxa</b>
Esquerda - direita	Taxas negativas	2 <sup>a</sup>	1,50	3,00
	Taxas positivas	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Ties	0 <sup>c</sup>		
	Total	2		

a esquerda < direita; b esquerda > direita; c esquerda = direita

A análise deste parâmetro foi prejudicada, pois foi avaliada utilizando dados de dois animais, sendo menos confiável.

Analisando a diferença da densidade de colágeno entre os dois períodos avaliados, percebe-se que a proporção de colágeno por área é bem maior nos animais após um ano do que após um mês, com significância estatística.

## **6- DISCUSSÃO**

---

A correção das alterações da lamina própria da prega vocal persiste até hoje como um dos grandes dilemas da laringologia.

Em alterações como sulcos vocais e cicatrizes em pregas vocais ocorre a atrofia da camada superficial da lâmina própria e até a aderência do epitélio nas camadas intermediária e profunda, com prejuízo à propagação da onda mucosa e produção da voz.

Dentre as alternativas terapêuticas disponíveis, nenhuma restitui a estratificação da lâmina própria e restaura as características da voz. Existem várias técnicas cirúrgicas propostas na tentativa de melhorar ou solucionar as alterações da lâmina própria da prega vocal. As opções consistem em excisão e ablação do tecido cicatricial; liberação da mucosa e quebra da contratura linear; medialização da prega vocal seja pela injeção de substâncias e tecidos no espaço de Reinke ou no músculo vocal, seja por cirurgia do arcabouço laríngeo como propostas por Isshiki há 30 anos. (Pontes et al., 1994; Chan et al., 1999; Ford et al., 1999; Ford C., 1999; Hallen et al., 2001; Nishiyama et al., 2002; Reijonen et al., 2001; Rihkanen et al., 1998; Rosen C A, 2000)

Recentemente, as estratégias de tratamento tem visado aumentar a concentração de ácido hialurônico, importante para reparação tecidual, e diminuir a concentração de colágeno do tipo I, e assim diminuir a fibrose na prega vocal. (Kanemaru et al., 2003; Kishimoto et al., 2009; Ohno et al., 2008, 2009)

Essas pesquisas baseiam-se na adição de fatores de crescimento (hepatócitos, fibroblastos, fibroblastos  $\beta$ 1 transformante) a culturas celulares e sua aplicação em animais de experimento, na tentativa de atuar nos fibroblastos da lâmina própria. Assim eles produziram nível ótimo de ácido hialurônico e colágeno, e restituiriam as propriedades biomecânicas da prega vocal. (Kishimoto et al., 2009; Ohno et al., 2008, 2009)

O resultado ideal na reparação das alterações das pregas vocais será aquele que considerar as propriedades do tecido biológico utilizado e do sítio receptor, além de aplicar princípios mecânicos já bem estabelecidos, como o observar o contato de toda a prega vocal membranosa e o correto nivelamento das pregas vocais.

Seguindo os princípios sugeridos por Constantino e Friedman, 1994, o bioimplante ideal depende da facilidade para sua obtenção, da quantidade disponível, da baixa morbidade ao doador, das características imunogênicas e mutagênicas, da baixa susceptibilidade à infecção, da sua maleabilidade e de sua taxa de absorção. Carvalho, 2006 avaliaram a utilização de fásia lata implantada na lâmina própria das pregas vocais de cães. Observaram que ela apresenta boa integração tecidual, baixa taxa de infecção ou absorção. É um tecido disponível em todo o organismo, em grande quantidade e é conseguido com baixa morbidade. A fásia é uma boa fonte de fibroblastos, já que é constituída somente este tipo celular, produtor de ácido hialurônico e colágeno.

Nesta pesquisa, foi analisada a fásia com fonte adicional de fibroblastos e o fator de crescimento de fibroblastos como fator de regulação na atividade dessas células. Foi buscado compreender se haveria incremento na reparação tecidual da prega vocal, na presença da fásia e essa substância.

Para essa avaliação foi utilizado o modelo experimental, por ser mais controlado. O animal escolhido foi o coelho, animal amplamente utilizado em estudos experimentais em laringologia. É um animal de fácil manuseio. No presente estudo foi estudada de que maneira o enxerto de fragmento de fásia superficial se comporta quando implantado no espaço de Reinke de pregas vocais de coelhos, na presença de fator de crescimento de fibroblastos.

O coelho apresenta inúmeras dificuldades como animal de experimentação em laringologia. A laringe e as pregas vocais são muito pequenas, o que dificulta o acesso endoscópico. Optamos por expor as pregas vocais através de laríngo-fissura para assegurar homogeneidade à técnica cirúrgica. A inserção do pecíolo da epiglote é muito baixa e, quando lesada, apresentava sangramento que interfere no procedimento cirúrgico. A porção cartilaginosa da prega vocal é proporcionalmente muito grande corresponde a quase metade da extensão da mesma. A porção membranosa da prega vocal é muito reduzida e dificulta a obtenção de vários cortes, muitas vezes necessários para a realização dos diversos métodos de coloração. Por esse motivo em três animais não conseguimos amostra representativa para a captação da imagem da lâmina e medição da densidade no grupo de sacrifício após um mês.

Em estudo prévio realizado em cães, com metodologia semelhante pelos mesmos autores, pudemos constatar que o experimento em coelhos oferece mais dificuldades técnicas, tanto na realização das intervenções cirúrgicas quanto na confecção de material para análise histológica.

Os parâmetros escolhidos para avaliar o comportamento da fásia implantada, a influencia do fator de crescimento e leito receptor foram baseados na resposta normal de cicatrização do organismo.

Quando o enxerto é introduzido em qualquer outro tecido, os estágios de inflamação e proliferação são prolongados. Ocorre migração de polimorfonucleares, que se dispõem na sua periferia resultando em lise e fagocitose do enxerto. A seguir, por estímulo quimiotático, macrófagos são atraídos e substituem os neutrófilos. Os macrófagos realizam fagocitose de bactérias e desbridam a ferida. O grau de resposta inflamatória ao enxerto parece estar relacionado ao quanto o enxerto é químico ou fisicamente reativo ao sítio receptor. O que pode levar à reparação tecidual normal ou à inflamação crônica (Hom, 1994).

Os resultados deste estudo sugerem que o fator de crescimento de fibroblastos não seja bem tolerado, por ter desencadeado reação inflamatória quando injetado na lâmina própria de prega vocal de coelho. Houve diferença estatisticamente significativa, nos períodos de um e doze meses de seguimento pós-operatório, entre a intensidade da resposta inflamatória nas pregas vocais submetidas à injeção de fator de crescimento de fibroblastos e o grupo controle. Não há resultados que avaliem este parâmetro na literatura indexada. Os estudos realizados avaliam a ação do fator de crescimento de fibroblastos em fibroblastos cultivados e não avaliam a resposta tecidual à presença deste fator. A presença da fásia isolada não desencadeia resposta inflamatória conforme demonstrado por estudo anterior de Carvalho (2006) e Duke et al. (2001), que avaliaram a histologia de pregas vocais submetidas à injeção de fásia lata triturada em músculo vocal de cães.

O predomínio linfo-histiocitário presente na lâmina própria das pregas vocais submetidas a enxerto de fásia associado a injeção de FGF não pode ser considerado como sendo decorrente de reação inflamatória crônica desencadeada pela presença deste fator de

crescimento. O predomínio linfo-histiocitário também ocorreu na prega vocal controle e não houve diferença estatística significativa quando os dois lados foram comparados.

A ausência de macrófagos ativados, no estudo histológico do presente estudo, é outro fato que comprova a biocompatibilidade entre a fáschia e a prega vocal. Esse fato sugere ainda que o fator de crescimento não seja fator ativador destes macrófagos, pois estas células estão presentes nos cortes histológicos na forma inativa. Quando qualquer substância é reconhecida como estranho ao tecido, ocorre a coalescência dos macrófagos que se tornam ativados, e realizam a fagocitose e eliminação do mesmo. Sua presença caracteriza a reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho (Robins et al., 1986)

Este estudo revelou que a presença do fator de crescimento de fibroblastos pode ter desencadeado fibrose além do esperado com a manipulação cirúrgica e enxertia de fáschia, já que a intensidade da fibrogênese foi maior que a encontrada nas pregas vocais controle, após 1 ano. Fato que corrobora com as observações de Hirano et al., 2003 e Branski et al., 2009 que em estudos in vitro, demonstraram que o fator de crescimento de fibroblastos leva ao aumento da produção de colágeno do tipo I e ácido hialurônico. No presente estudo, todas as pregas vocais com injeção de fator de crescimento apresentaram focos de fibrose, caracterizados como leve, e em somente um a fibrose foi caracterizada como moderada na avaliação com Tricrômico de Masson. Provavelmente focos de fibrose estejam mais relacionados a injeção do fator de crescimento do que à presença do enxerto, já que nos animais submetidos somente a enxertia de fáschia a fibrose foi caracterizada como ausente. A ausência de fibrose após um mês, provavelmente se deva ao pequeno período de acompanhamento, onde não tenha havido tempo para o desencadeamento de fibrose visível à análise histológica.

Na avaliação da densidade de colágeno nas pregas vocais observa se que a proporção de colágeno por área é bem maior nos animais após 1 ano do que com 1 mês, em ambos os lados, esse dado está bem de acordo com o que encontramos normalmente, que é o fato de o processo de cicatrização levar mais que um mês, às vezes 4 ou 5, de forma que o colágeno mais maduro está presente nesse grupo.

O fator de crescimento associado à fáscia parece ter aumentado a angiogênese, o que pode indicar um efeito de integração do tecido enxertado no sitio receptor. Não há estudos prévios que avaliem a neovascularização em fáscia enxertada em pregas vocais.

Este é o primeiro estudo que avalia a integração de fragmento de fáscia implantado na lâmina própria com a adição de fator de crescimento de fibroblastos. Em todos os animais com acompanhamento mais longo, o fator de crescimento desencadeou fibrose, mesmo que leve, ao contrário da presença isolada da fáscia que não induziu a fibrogênese em nenhum. Este fato pode sugerir que este enxerto, quando utilizado de forma isolada, possa apresentar boa perspectiva de utilização para o restabelecimento estrutural da lâmina própria na correção de sulcos e cicatrizes, por não induzir à formação de fibrose, corroborando achados de estudo prévio da UNICAMP (Carvalho, 2006).

No que diz respeito à espessura da fáscia, em estudo prévio, Carvalho, 2006 demonstraram que quando a fáscia era mais espessa, ela permanecia bem identificada à avaliação histológica. Neste estudo, a fáscia não foi distinguível do tecido circunvizinho. Este fato talvez se deva realmente à menor espessura da fáscia cervical ou porque os animais sejam diferentes, e ela provavelmente seja mais adequada às características do leito receptor, a lâmina própria.

O conjunto dos resultados deste estudo supõe que a utilização do fator de fibroblastos associado ao enxerto de fáscia talvez não seja adequada à correção das alterações da lâmina própria da prega vocal.



## **7- CONCLUSÃO**

---

Da avaliação de 12 coelhos estudados, submetidos ao enxerto de fáscia cervical superficial e à injeção de fator de crescimento de fibroblastos na lâmina própria de pregas vocais de coelhos, pode-se concluir que:

A reação inflamatória foi mais intensa na prega vocal com enxerto de fáscia e fator de crescimento de fibroblastos nos dois períodos estudados: um mês e doze meses.

A intensidade da reação inflamatória foi maior no grupo avaliado após um mês que no grupo avaliado após doze meses.

A injeção de crescimento de fibroblastos induziu neovascularização, desencadeou maior intensidade de fibrose e não causou resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

BOYCE R G; NUSS D W; KLUKA E A. The use of autogenous fat, fascia and nonvascularized muscle grafts in head and neck. *Otolaryngol. Clin. of north am.* 1994, 27(1): 39-68.

BRANSKI R C; BARBIERI S S; WEKSLER B B; SALTMAN B; KRISHNA P; KRAUS D H; BROADBELT N V; CHEN J; POPPAS D P; FELSEN D. Effects of transforming growth factor-beta1 on human vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009, 118(3): 218-226.

BUTLER J E; HAMMOND T H; GRAY S D. Gender- related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope* 2001, 111(5): 907-911.

CARVALHO E G B. Integração de fragmento de fásia lata enxertado na lâmina própria de prega vocal de cães: estudo histológico. Campinas-SP, 2006. (Dissertação- Mestrado- Universidade Estadual de Campinas)

CHAN R W; TITZE I R; Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope* 1998, 108(5): 725-731.

CHAN R W; TITZE I R. Hyaluronic acid ( with fibronectin) as a bioimplant for the vocal fold mucosa. *Laryngoscope* 1999, 109 (7 pt1): 1142-1149.

CONSTANTINO P D; FRIEDMAN C D; LANE A. Synthetic biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial plastic surg. New York*, 1993, (9): 1-15.

DUKE S G; SALOMON J; BLALOCK D; POSTMA G N; KOUFMAN J A. Fascia augmentation of the vocal fold: Graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope* 200, 111(5): 759-764.

FORD C N; INAGI K; BLESS D M; KHIDR A; GILCHRIST K W. Sulcus vocalis: A rational analytical approach to diagnosis and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999, 105(2): 189-200.

FORD C N. Advances and refinements in phonosurgery. *Laryngoscope* 1999, 109(12): 1891-1900.

GRAY S; PIGNATARI S S N, HARDING P. Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *J voice* 1994, 8(1): 48- 52.

GRAY S D; HAMMOND E; HANSON D F. Benign pathologic reponses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995, 104(5): 13-18.

GRAY S D; TITZE I R; CHAN R; HÁMMOND T H. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999, 109(6): 845-854.

GRAY S D; ALIPOUR F; TITZE I R; HÁMMOND T H. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000, 109(1): 77-85.

HALLÉN L; TESTAD P; SEDERHOLM S L P; DAHLQVIST A; LAURENT C. DiHA Injections for treatment of Insufficient closure of the vocal folds: early clinical experiences. *Laryngoscope* 2001, 111(6): 1063-1067.

HÁMMOND T H; ZHOU R; HÁMMOND E H; PAWLAK A; GRAY S D. The intermediate layer: A morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of human vocal folds. *J Voice* 1997, 11 (1); 59-66.

HAMMOND TH, GRAY SD, BUTLER JE. Age- and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000, 109(10 Pt 1):913-20.

HILL DP, MEYERS AD, HARRIS J. Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine larynx. *Laryngoscope*. 1991, 101(4 Pt 1):344-8.

HIRANO M; TANAKA S; YOSHIDA T; HIBI S. Sulcus vocalis: funcional aspects. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990, 99(9 pt 1): 679-683.

HIRANO M; SATO K; NAKASHIMA T. Fibroblasts in human vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol ( Stockh )* 1999, 119(3): 271-276.

HIRANO M; SATO, K; NAKASHIMA T. Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001, 110(5 pt 1): 417-424.

HIRANO S, BLESS DM, HEISEY D, FORD CN. Effect of growth factors on hyaluronan production by canine vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003, 112(7): 617-24.

HIRANO S; BLESS D M; ROUSSEAU B; WELHAM N; SCHEIDT T; FORD CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. . *Laryngoscope* 2003, 113(6): 966-972.

HIRANO S, BLESS DM, MASSEY RJ, HARTIG GK, FORD CN. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003, 112(12):1026-33.

HIRANO S, KISHIMOTO Y, SUEHIRO A, KANEMARU S, ITO J. Regeneration of aged vocal fold: first human case treated with fibroblast growth factor. *Laryngoscope.* 2008, 118(12):2254-9.

HOM D B. The Wound healing reponse to grafted tissues. *Otolaryngol. Clin. of North Am.* 1994, 27(1): 13-24.

ISHII K, ZHAI W G; AKITA M; HIROSE H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol ( Stockh )* 1996, 116(5):778-782.

KANEMARU S I; KOJIMA H; HIRANO S; NAKAMURA T; MAGRUFOV A; ITO J; OMORI K; HIRATSUKA Y; SHIMIZU Y. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchimal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003, 112(11): 915-920.

KANEMARU S, NAKAMURA T, YAMASHITA M, MAGRUFOV A, KITA T, TAMAKI H, TAMURA Y, IGUCHI F, KIM TS, KISHIMOTO M, OMORI K, ITO J. Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005, 114(12):907-12.

KISHIMOTO Y; HIRANO S; SUESHIO A; TATEYA I; KANEMARU S; NAKAMURA T; ITO J. Effect of exogenous hepatocyte growth factor on vocal folds fibroblasts. *Ann Otol Rhinol. Laryngol* 2009, 118(7):606-611.

LINDESTAD P A; HERTEGARD S. Spindle shaped glottal insufficiency with and without sulcus vocalis: a retrospective study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994, 103(7): 547-553.

LUO Y, KOBLER JB, ZEITELS SM, LANGER R. Effects of growth factors on extracellular matrix production by vocal fold fibroblasts in 3-dimensional culture. *Tissue Eng.* 2006 Dec;12(12):3365-74.

MELO E C M; LEMOS M; XIMENOS FILHO J A; SENNES L U; SALDIVA P H N; TSUJI D H. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003, 113(12): 2187-2191.

NISHIYAMA K; HIROSE H; IGUSHI Y; NAGAI H; YAMANAKA J; OKAMOTO M. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold as a treatment for recurrent nerve paralysis. *Laryngoscope* 2002, 112(8): 1420-1425.

OHNO T; LESLEY C; HIRANO S; OSSOF R H; ROUSSEAU B. Effect of hepatocyte growth factor on gene expression of extracellular matrix during wound healing of the injured rat vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008, 117(9): 696-702.

OHNO T; YOO M J; SWANSON E R; HIRANO S; OSSOF R H; ROUSSEAU B. Regenerative effects of basic fibroblasts growth factor on extracellular matrix production in aged rat vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009, 118(8): 559-64.

PAWLAK A S; HÁMMOND E H; HÁMMOND T; GRAY S. D. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996, 105(1): 6-11.

PONTES P; BEHLAU M; GONSALVES I. Alterações estruturais mínimas da laringe (AEM): considerações básicas. *Acta Awho* 1994, XIII(1 ): 2-6.

REIJONEN P; LEIVO I; NEVALAINEN T; RIHKANEN H. Histology of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2001, 111(6): 1068-1074.

RIHKANEN H. Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. *Laryngoscope* 1998, 108(1 pt1): 51-54.

RODJERS B J; ABDUL-KARIM F W; STRAUSS M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2000, 110(12): 2012-2015.

ROSEN C A. Vocal fold scar: evaluation and treatment. *Otolaryngol. Clin. of North Am.* 2000, 33(5): 1081-1086.

SOMMER B; SATTLER G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg.* 2000, 26 (12): 1159-1166.

THIBEAULT S L; ROUSSEAU B; WELHAM N; HIRANO S; BLESS D M. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope* 2004, 114(4): 760-764.

TSUNODA K; TAKANOSAWA M; NIIMI S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope* 1999, 109(3): 504-508.

TSUNODA K; NIIMI S. Autologous transplatation of fascia into the vocal fold. *Laryngoscope* 2000, 110(4): 680-682.

TSUNODA K; BAER T; NIIMI S. Autologous transplatation of fascia into the vocal fold: long-term results of a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope* 2001, 111 (3): 453-457.

XIMENES FILHO J A; NASCIMENTO P H S; TSUJI D H; SENNES L U. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003, 112(10): 894-898.

WOO P; RAHBAR R; WANG Z. Fat implantation into Reike's space: Histologic and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999, 108(6): 738-744.



## **9- FONTES CONSULTADAS**

---

Robins, S. L.; Cotran, R. S.; Kumar, V.M. ed. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro, ed Guanabara, 1886. p.39-82.

Soares Amora, A. A., Dicionário da língua portuguesa. São Paulo, ed. Saraiva, 1997.

## **10- ANEXO**

---

## ANEXO 1- DADOS DE CADA COELHO

Número do coelho	Intensidade do infiltrado		Predomínio celular		Intensidade da fibrose		Reação crônica		Neo vascularização	
	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>
1	I	I	LH	Ø	II	Ø	Ø	Ø	I	Ø
2	I	I	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
3	II	I	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
4	I	Ø	LH	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
5	I	I	L	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø
6	I	I	L	Ø	I	Ø	Ø	Ø	I	Ø

Número do coelho	Intensidade do infiltrado		Predomínio celular		Intensidade da fibrose		Reação crônica		Neo vascularização	
	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>	<u>PVD</u>	<u>PVE</u>
7	II	Ø	H	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
8	II	I	LH	L	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
9	III	I	L	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
10	II	I	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
11	III	II	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
12	III	I	LH	LH	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

## ANEXO 2 DADOS DENSIDADE

animal	tempo	lado	foto	area colageno	área total
1	1 ano	direito	26	1259.1353	7966.8193
1	1 ano	direito	23	664.31940	7377.2007
1	1 ano	direito	22	379.15442	5133.7817
1	1 ano	direito	18	538.2419	10898.538
1	1 ano	direito	16	1162.6460	12019.814
1	1 ano	direito	27	3221.2212	10568.465
1	1 ano	esquerdo	30	1016.6860	6047.9473
1	1 ano	esquerdo	29	815.92102	3924.0693
1	1 ano	esquerdo	31	993.72992	8075.4043
2	1 ano	direito	33	2866.0610	5508.8311
2	1 ano	direito	34	4106.3179	10289.823
2	1 ano	direito	37	5674.8306	14029.096
2	1 ano	esquerdo	32	401.78265	1650.3927
3	1 ano	direito	13	11517.540	12472.352
3	1 ano	direito	12	11787.357	15257.462
3	1 ano	direito	9	10818.134	12962.154
3	1 ano	esquerdo	14	4324.9780	5305.8740
3	1 ano	esquerdo	17	9218.2432	11545.024
3	1 ano	esquerdo	18	8681.8184	10667.270
3	1 ano	esquerdo	19	7096.3730	11721.371
3	1 ano	esquerdo	15	7239.4370	8861.3480
4	1 ano	direito	24	3082.1528	11351.479
4	1 ano	direito	23	4157.5029	15000.464
4	1 ano	direito	22	3128.2424	9016.2832
4	1 ano	direito	21	982.41925	6041.4795
4	1 ano	esquerdo	27	2041.0627	5114.8691
4	1 ano	esquerdo	25	264.89569	851.91583
5	1 ano	direito	29	93.128883	6369.5444
5	1 ano	direito	30	17.450993	1593.8461
5	1 ano	esquerdo	31	25.312479	6278.7378
6	1 ano	direito	37	1257.1272	8770.8691
6	1 ano	esquerdo	41	2456.6150	4887.8081
6	1 ano	esquerdo	42	5158.0562	8182.1323
8	1 mês	direito	46	53.691689	6636.0151
8	1 mês	direito	45	8.9133253	3050.0784
8	1 mês	direito	47	13.066848	5615.1968
8	1 mês	esquerdo	49	0.89474761	4770.9375
8	1 mês	esquerdo	50	0.23911373	5614.2954
9	1 mês	direito	5	284.25653	6618.2948

9	1 mês	direito	3	270.80801	4526.7192
9	1 mês	direito	2	722.13647	7631.8760
11	1 mês	direito	8	197.72556	10390.677
11	1 mês	direito	7	217.44415	8110.7642
11	1 mês	direito	10	1395.4375	15114.726
11	1 mês	esquerdo	12	50.474693	14546.308
11	1 mês	esquerdo	11	10.211051	10995.731