



REBECCA CHRISTINA KATHLEEN MAUNSELL

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS
ENTRE AS TÉCNICAS DE MICROFLAP, MICROFLAP COM
SUTURA E MICROFLAP COM USO DE COLA DE FIBRINA ME
PREGAS VOCAIS DE COELHOS**

CAMPINAS
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

REBECCA CHRISTINA KATHLEEN MAUNSELL

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS ENTRE AS
TÉCNICAS DE MICROFLAP, MICROFLAP COM SUTURA E MICROFLAP
COM USO DE COLA DE FIBRINA EM PREGAS VOCAIS DE COELHOS**

Orientador: Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração em Otorrinolaringologia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA REBECCA CHRISTINA
KATHLEEN MAUNSELL

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M444a Maunsell, Rebecca Christina Kathleen, 1972-
Análise comparativa das alterações teciduais entre as técnicas de microflap, microflap com sutura e microflap com uso de cola de fibrina em pregas vocais de coelhos / Rebecca Christina Kathleen Maunsell. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Agrício Nubiato Crespo.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vibração. 2. Cicatriz. 3. Colágeno. 4. Laringe. 5. Voz. I. Crespo, Agrício Nubiato, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Histologic comparison of vocal fold microflap healing by second intention, with sutures and glue in rabbits.

Palavras-chave em inglês:

Vibration

Cicatriz

Collagen

Larynx

Voice

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Agrício Nubiato Crespo [Orientador]

Regina Helena Garcia Martins

André de Campos Duprat

José Vassalo

Ana Lúcia Spina

Data da defesa: 22-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

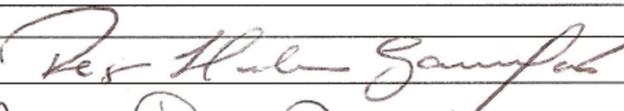
Banca examinadora de Tese de Doutorado

Rebecca Christina Kathleen Maunsell

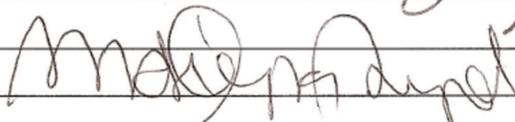
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Agricio Nubiato Crespo

Membros:

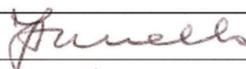
Professor (a) Doutor (a) Regina Helena Garcia Martins



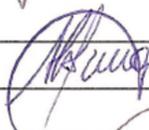
Professor (a) Doutor (a) André de Campos Duprat



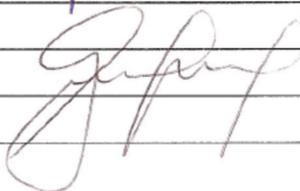
Professor (a) Doutor (a) José Vassalo



Professor (a) Doutor (a) Ana Lúcia Spina



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: 22/11/2012

AGRADECIMENTOS

Sou sinceramente grata ao meu orientador Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo pelos preciosos ensinamentos desde minha formação como otorrinolaringologista na residência médica, sempre me estimulando a querer mais. Pelo exemplo de liderança, profissionalismo e entusiasmo constante com a especialidade. Por ter me aceitado sob sua tutela tanto no mestrado quanto nesta tese de doutorado e pelas oportunidades dadas no decorrer do percurso destes trabalhos. Pelas muitas horas de discussões e conversas que me inspiraram para realização deste trabalho e continuamente me inspiram na busca de novos desafios. O convívio profissional e pessoal nestes anos foi um privilégio e motivo de orgulho para mim.

Ao Prof. Dr Edmyr Reis do Laboratório de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas pelas centenas de horas de auxílio na realização dos experimentos, sua experiência na experimentação animal e generosidade em transmiti-los foram essenciais.

À Profa. Dra. Ester Maria Nicola chefe do Laboratório de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas por ter gentilmente cedido o espaço de seu laboratório para realização dos experimentos e ainda pelos valiosos aconselhamentos nestes anos.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental: William Adalberto Silva, Miguel Luis Candido, Waldemir Benedito Costa Ana Cristina de Moraes pela colaboração, gentileza e ajuda sempre bem humorada mesmo nas solicitações de última hora.

Ao Prof. Dr. Leandro Freitas pelo companheirismo e disponibilidade em todas as fases deste estudo, sua ajuda foi inestimável.

Ao Sr Marcos Begnami da Biogen pelas horas de paciência e disponibilidade para explicações online.

Ao Prof. Dr. Jorge Rizzato Paschoal pelos ensinamentos e aconselhamentos desde minha residência médica e pelo exemplo de sabedoria e experiência aplicados à ética e profissionalismo nos quais sempre busquei me espelhar.

Aos docentes, médicos contratados, colaboradores voluntários médicos, fonoaudiólogos e equipe de enfermagem da Disciplina de Otorrinolaringologia pelo apoio nestes anos de trabalho a oportunidade da troca de experiência com vocês me engrandece sempre.

Aos funcionários da secretaria de Otorrinolaringologia pelo apoio ao longo de todos estes anos.

Aos residentes da Disciplina de Otorrinolaringologia em especial Dr Pablo Soares G. Pereira e Dr Guilherme Machado de Carvalho que sempre estiveram curiosos e disponíveis para ajudar neste projeto apesar de suas rotinas atribuladas.

Aos meus sogros Rogério Antunes Pereira e Adriana Sevá Pereira, cunhadas Roberta Pereira de Oliveira e Maria Angélica Nucci Pereira e cunhados Gustavo Sevá Pereira e Cassiano Rodrigues de Oliveira e irmã Samantha Maunsell que em inúmeras ocasiões se ocuparam de meus filhos e me permitiram o isolamento necessário para que este trabalho pudesse ser concluído.

À minha sogra Adriana Sevá Pereira pelos palpites informais e correções técnicas embasadas em seus anos de experiência em pesquisa médica.

Aos meus pais Sueli de Lourdes Tassi Maunsell e Michael George Maunsell, exemplos de superação e esforço que sempre me incentivaram e apoiaram incondicionalmente, em absolutamente tudo e me ensinaram que tudo é possível com trabalho e dedicação.

Ao meu marido Tiago Sevá Pereira, sua sabedoria, companheirismo, cumplicidade e sobretudo sua paciência foram essenciais tanto nos momentos de ajuda e incentivo na elaboração deste trabalho quanto nos meus momentos de ausência junto à nossa família.

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

RESUMO

Alterações benignas das pregas vocais são causas importantes de disfonia e compreendem parte significativa dos casos atendidos pelo otorrinolaringologista na prática diária. Nas últimas décadas diversas técnicas foram descritas para o tratamento cirúrgico destas lesões, com sucesso variável. Para uma excelente qualidade vocal é necessária a preservação do complexo movimento ondulatório da superfície das pregas vocais. A presença de cicatriz nas pregas vocais pode comprometer o resultado da cirurgia e constitui hoje um dos principais desafios da fonocirurgia. Existem inúmeros tratamentos das cicatrizes das pregas vocais e, ainda hoje, com resultados bastante insatisfatórios. Diversos autores têm estudado o processo cicatricial procurando meios de intervir para interromper a produção de substâncias que alterem definitivamente as propriedades vibratórias das pregas vocais. Laringologistas com grandes séries de pacientes tratados cirurgicamente descrevem resultados excelentes com uma ou outra variação de suas técnicas cirúrgicas. Faltam, no entanto, estudos controlados que confirmem o melhor efeito de uma técnica sobre outra. Relatos clínicos tendem a favorecer uma ou outra técnica conforme a experiência e formação do cirurgião, disponibilidade de material e instrumental cirúrgico. Existem divergências quanto à necessidade de fechamento da incisão por meio de sutura, utilização de cola de fibrina ou permitir que a reepitelização ocorra por segunda intenção. *Objetivo:* Comparar os aspectos cicatriciais resultantes da técnica de microflap das pregas vocais quando utilizadas cola de fibrina, sutura e cicatrização por segunda intenção. *Material e Métodos:* Realizou-se estudo experimental em coelhos comparando as técnicas: microflap, microflap e seu fechamento com sutura e microflap e seu fechamento com cola de fibrina com o objetivo de avaliar os efeitos de cada técnica na cicatrização das pregas vocais. A cicatrização foi avaliada histologicamente em três tempos pós-operatórios: sete dias, trinta dias e três meses. Avaliou-se a concentração de colágeno, presença de células inflamatórias, espessuras do epitélio e da lâmina própria. *Resultados:* As três técnicas provocaram um aumento significativo na concentração de colágeno em comparação com grupo controle normal, não operado. A cicatrização por segunda intenção provocou menor concentração de colágeno aos 90 dias. Todas as técnicas apresentaram aumento significativo da espessura epitelial uma semana após as intervenções. O grupo submetido a sutura atingiu níveis semelhantes ao do grupo controle após 90 dias. Após sete dias a espessura da lâmina própria obteve valores próximos aos normais com todas as técnicas. Após 90 dias apenas o grupo submetido a confecção do microflap e uso de cola manteve espessura

semelhante ao grupo controle, todos os outros tiveram uma significativa redução da espessura. O número de células inflamatórias aumentou significativamente com todas as técnicas exceto nas pregas vocais submetidas a microflap e cola após 30 dias e, também, nas pregas vocais submetidas à microflap e sutura após 90 dias. *Conclusão:* Apesar do uso da cola de fibrina e suturas em microfonocirurgia serem seguros e resultar em bons resultados conforme relatados por outros autores, ainda não há evidência científica que justifique seu uso.

ABSTRACT.

Benign lesions of the vocal cords are an important cause of dysphonia and represent a significant number of patients attended by the otolaryngologist specialist. Several techniques have been described for the surgical treatment of these lesions with variable outcome. Satisfactory vocal quality is imperative when considering a good or bad surgical outcome. To achieve satisfactory vocal quality the complex vibratory movement of the vocal folds must be preserved and kept at its best. Scarring of the vocal folds may compromise vocal outcome and this is the main challenge in microphonosurgery nowadays. Several treatments have been described to solve the problem of scar formation on the vocal folds. Nevertheless, satisfactory long-term vocal quality has been described as quite disappointing. Studies have focused on the early stages of the scarring process of the vocal cords and on the refinement of surgical techniques to prevent or minimize scar formation. There is, a lack of studies comparing surgical techniques and their impact on scar formation. Clinical reports tend to favor one or other technique but these vary depending on the surgeons personal experience and training, instrumentation and material availability. There is a consensus on the need of maximum preservation of the epithelium and superficial lamina propria and minimal exposure of vocal ligament. On the other hand the need of microsuture or glue to cover the wound is controversial.

Objective: To compare scarring characteristics of microflap in vocal folds when left to heal by second intention and when the defect was closed with sutures or fibrin glue. *Material and methods:* A comparative experimental study comparing the microflap technique alone, microflap with microsuture and microflap with fibrin glue was carried out. The experiments were performed out on a rabbit model to evaluate the effects of each technique on vocal cord healing and scar formation. Healing was evaluated histologically one week, 30 and 90 days after surgical intervention. Scar formation was evaluated based on: collagen concentration, inflammatory cell infiltration, epithelium and lamina propria thickness. *Results:* A significant increase in collagen concentration was observed with all three techniques when compared to normal control vocal folds. Vocal folds submitted to microflap alone presented the smallest values for collagen concentration at 90 days. *Conclusion:* All techniques showed significant increase in epithelium thickness one week after the procedures. At 90 days epithelium thickness had decreased in all techniques but reached values similar to control vocal folds only in the suture group. Lamina propria thickness was similar to the control group in all groups after one week, after 90 days only the fibrin glue group was not significantly different from the control group. Inflammatory cells where significantly increased in all groups except for the

suture group at 90 days. Although the use of sutures and glue is safe and can produce good vocal results as reported by experienced surgeons there remains to be no evidence consistently justifying its use in microphonosurgery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, QUADROS, TABELAS, GRÁFICOS

Figura 1 – laringe exposta após abertura da pele, subcutâneo e dissecação romba da musculatura pré laríngea. Vê-se cartilagem tireóidea, membrana cricotireóidea, músculos cricotireóideos, cartilagem cricóidea e primeiros anéis traqueais.	39
Figura 2 – incisão vertical na porção inferior da cartilagem tireóidea e membrana cricotireóidea.	40
Figura 3 – pontos de reparo passados no limite inferior das cartilagens tireóideas para exposição do intróito laríngeo.....	40
Figura 4 – visão frontal através da laringofissura anterior com dissecação de microflap em prega direita.	41
Figura 5 – microdissector.....	42
Figura 6 – visão posterior da laringe aberta com exposição das pregas vocais e aplicação nas bordas da pregas vocais com pincel. Porções membranosas das pregas vocais marcadas com tinta nanquim azul. A flecha preta indica o processo vocal da prega vocal esquerda.	43
Figura 7 – exemplo de corte coronal através pregas vocais em uma das laringes: a) corada com HE e; b) corada com tricrômico de Massom. As setas pretas marcam as cartilagens tireóideas e a área ovalada assinala a região da borda livre das pregas vocais.....	44
Figura 8 – lâmina do bordo livre de prega vocal corada com HE vista em aumento de 10X com as medidas de espessura epitelial (linhas vermelhas) e as medidas de espessura de LP (linhas amarelas). Em nanquim azul está a marcação do bordo livre da prega vocal.....	45
Figura 9 – corte coronal de prega vocal corada com tricrômico de Massom. A linha vermelha contínua demarca o ponto médio perpendicular ao ponto de convexidade máxima da prega vocal. Áreas quadradas em vermelho estão demarcadas acima e abaixo desta linha: seis áreas superficiais e seis áreas profundas. O código alfanumérico sobre cada quadrado identifica o lado, grupo de estudo e localização (superficial e profunda) na LP.	47
Figura 10 – quantificação de colágeno de uma das áreas demarcadas pelo programa Histoquant® após determinação de “padrão” considerado adequado: a) área demarcada ainda sem a quantificação e b) demarcação das áreas identificadas como colágeno em amarelo.....	47
Figura 11 – quantificação de núcleos celulares pelo programa Histoquant® após determinação de “padrão” considerado adequado: a) área demarcada ainda sem a quantificação e b) com a quantificação em vermelho.	48

Figura 12 – distribuição das laringes nos grupos A e B para cada tempo de estudo e no grupo controle.	50
Figura 13 – cortes coronais de pregas vocais coradas com tricrômico de Massom vistas em aumento de 10X: a) prega vocal controle, não operada; b) prega vocal submetida a microflap com uso de cola após 30 dias.	52
Gráfico 1 – evolução da concentração de colágeno (valor das medianas) na LP das pregas vocais ao longo do tempo conforme a técnica cirúrgica realizada e o grupo controle não operado. Variação estatisticamente significativa nos grupos submetidos a microflap com sutura ($p=0,0053$) e microflap ($p=0,0247$).	55
Gráfico 2 – variação das medianas da espessura epitelial em cada uma das três técnicas para cada tempo de avaliação e sua comparação com o grupo controle não operado. Variação estatisticamente significativa observada apenas para o grupo submetido ao microflap e sutura.	58
Gráfico 3 – Variação dos valores das medianas da espessura da LP ao longo dos três tempos estudados para cada técnica realizada. Variação significativa nos grupo submetido a microflap com cola ($p=0,0264$) e no grupo submetido a microflap com sutura ($p=0,0271$).	60
Tabela 1 – concentração de colágeno em cada uma das três técnicas, para os três tempos de seguimento e valor de “ <i>p</i> ” quando comparado cada técnica com o grupo controle de pregas vocais normais não operadas. Em negrito assinala-se o grupo cujos valores mais se aproximaram do grupo controle normal.	51
Tabela 2 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B, e análise comparativa entre as pregas vocais direitas do grupo A e B com os respectivos valores de “ <i>p</i> ” sete dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística.	53
Tabela 3 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B, e análise comparativa entre as pregas vocais direitas dos grupos A e B com os respectivos valores de “ <i>p</i> ” trinta dias após os procedimentos.	53
Tabela 4 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B e análise comparativa entre as pregas vocais direitas dos grupos A e B com os respectivos valores de “ <i>p</i> ” 90 dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística.	54

- Tabela 5 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B sete dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística. _____ 56
- Tabela 6 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B trinta dias após os procedimentos. _____ 56
- Tabela 7 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B 90 dias após os procedimentos. _____ 56
- Tabela 8 – valores da espessura epitelial, em μm , para cada técnica e tempo estudados e os valores de “*p*” quando comparados aos controles normais. Em negrito os valores que mais se aproximaram do grupo controle normal. _____ 57
- Tabela 9 – Comparação da espessura da LP (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B, 7, 30 e 90 dias após os procedimentos. Os valores estatisticamente significativos estão assinalados em negrito. _____ 59
- Tabela 10 – valores de espessura da LP (em μm) para cada técnica e tempo de estudo e os valores de “*p*” quando comparados ao grupo controle normal. Em negrito estão assinalados os grupos com maior similaridade com grupo controle. _____ 60
- Tabela 11 – Número de células inflamatórias encontradas na LP de cada grupo, em cada tempo estudado e sua comparação com o grupo controle, não operado. Em negrito estão assinalados os grupos com valores mais semelhantes ao grupo controle normal. _____ 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D	direita
E	esquerda
ed	edição
FAPESP	Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxicilina-Eosina
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma
LP	lâmina própria
MEC	matriz extra celular
mg	miligramas
ml	mililitros
n	número
p	proporção, representação de significância estatísticas
sut	sutura
U	unidade internacional, medida padronizada
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
µm	micrômetros
µm²	micrômetros quadrados
®	marca registrada

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, QUADROS, TABELAS, GRÁFICOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
SUMÁRIO	16
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	22
Objetivo Geral	22
Objetivos Específicos	23
REVISÃO DE LITERATURA	24
MATERIAL E MÉTODOS	38
Animais de experimentação	38
Formação dos grupos de estudo	38
Procedimentos cirúrgicos	39
Preparação das laringes	42
Avaliação histológica	45
Avaliação dos resultados	48
RESULTADOS	50
Quanto à concentração de colágeno	51
Quanto à espessura do epitélio	55
Quanto à espessura da LP	58
Quanto a densidade de células inflamatórias: análise objetiva	61
Quanto a densidade celular: análise subjetiva	61
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	79
Anexo 1	79
Anexo 2	83

Anexo 3	84
Anexo 4	85
Anexo 5	86
Anexo 6	87

INTRODUÇÃO

As propriedades vibratórias das pregas vocais têm sido diretamente relacionadas à qualidade e características biomecânicas de sua lâmina própria (LP). O objetivo da microfonocirurgia é aproveitar os planos histológicos naturais da prega vocal para cuidadosamente remover a doença com rompimento mínimo do mecanismo vibratório (1). A técnica do microflap está bem estabelecida como método para o manejo cirúrgico das alterações benignas das pregas vocais. Com esta técnica, evita-se a dissecação do ligamento vocal e, assim, o processo inflamatório e reação cicatricial é minimizada (1,2). A LP das pregas vocais consiste em uma complexa estrutura estratificada em camadas (3). A manutenção desta estratificação e, principalmente, das características da chamada cobertura das pregas vocais, que é constituída por um epitélio de revestimento e pela camada superficial da LP, é essencial para que o movimento vibratório produza uma qualidade vocal satisfatória (4). Isto porque o movimento vibratório depende essencialmente de um deslizamento desta cobertura sobre o chamado corpo da prega vocal, constituído pelas duas camadas mais profundas da LP e pelo músculo vocal (4). A presença de cicatriz na cobertura das pregas vocais pode alterar este deslizamento e, conseqüentemente, o movimento vibratório. Cicatrizes e aderências têm sido descritas como a maior causa de disfonia após cirurgias envolvendo as pregas vocais e são o maior desafio terapêutico da laringologia na última década (5,6).

O tratamento das cicatrizes das pregas vocais pode ter dois enfoques: minimizar a reação cicatricial durante o ato cirúrgico e no período pós operatório, visando reduzir o depósito de substâncias que causem o indesejado enrijecimento e fibrose da prega vocal ou tratar uma cicatriz já estabelecida e a insuficiência glótica secundária. A segunda opção é motivo de utilização e desenvolvimento de inúmeras técnicas e uma diversidade de materiais para injeção e preenchimento das pregas vocais na tentativa de restabelecer ao menos o volume da LP e reduzir a incompetência glótica. Nenhuma destas técnicas se mostrou, até hoje, completamente satisfatória no que se refere à manutenção de qualidade vocal boa e duradoura (7). Allen, em 2010 (8), enfatizou a vantagem do desenvolvimento de técnicas preventivas no tratamento das cicatrizes das pregas vocais. Mortensen (9) enfatizou o fato de que, uma vez presente, a fibrose e conseqüente cicatriz em um prega vocal não se desaparecem e todos os métodos até hoje desenvolvidos para isto mostraram efeito limitado. Afirmou ainda que, enquanto não tenhamos um material disponível para prevenir a formação de cicatriz ou outro que seja capaz de substituir a camada superficial da LP, este problema continuará sem solução.

O termo “fonocirurgia” surgido na década de 60 refere-se a procedimentos cirúrgicos para manter, restaurar ou melhorar a qualidade vocal (10). Este tipo de cirurgia visa o tratamento de lesões benignas das pregas vocais como nódulos, pólipos e cistos. Pacientes portadores deste tipo de lesão procuram auxílio médico em decorrência de graus variados de disфония que afetam sua vida social e profissional. É inaceitável, portanto, que uma cirurgia proposta para melhorar a qualidade vocal não o faça e ainda possa levar à piora da disфония, devido à substituição da alteração inicial por uma cicatriz que não possui as qualidades vibratórias e/ou viscoelásticas do tecido original. Da década de 70 até a década de 90 as técnicas cirúrgicas evoluíram baseadas no princípio de máxima preservação da cobertura mucosa das pregas vocais e, menor trauma possível à camada superficial da LP. Técnicas que inicialmente preconizavam a ressecção de lesões benignas com o epitélio subjacente utilizando pinças do tipo saca-bocado, ou realizando uma desepitelização de áreas extensas das pregas vocais, foram sendo substituídas por técnicas visando o máximo de preservação do epitélio de revestimento da prega vocal, e a mínima manipulação da camada superficial da LP subjacente. Com esta filosofia Bouchayer e Cornut em 1992 (11), na França, e Courey *et al.* (1), em 1995 nos Estados Unidos da América descreveram o que denominaram de técnica do microflap. O fundamento desta técnica está na dissecação de um retalho da cobertura mucosa da prega vocal para atingir a lesão e, ao mesmo tempo, preservar sua cobertura que irá posteriormente, cobrir a área cruenta facilitando e minimizando o processo cicatricial. Nos últimos anos, diversos autores defendem a realização de flaps ainda menores visando minimizar a desestruturação da LP (12,13).

Com a evolução e o refinamento da instrumentação na microcirurgia de laringe, alguns autores passaram a defender a necessidade de manter a cobertura de áreas cruentas das pregas vocais, anteriormente deixadas para cicatrizar por segunda intenção. A manutenção da cobertura epitelial evitaria a formação de exsudato fibrinoso e a retração cicatricial, o que impediria o retorno à qualidade vibratória normal (13). Os meios relatados para cobrir áreas expostas de LP foram a realização de suturas e, alternativamente, o uso de cola de fibrina.

As suturas e o uso de cola de fibrina têm sido propostas para cobrir áreas expostas de LP. Considerando que a superfície das pregas vocais, diferente de outras superfícies corpóreas, está em constante movimentação e submetida continuamente a traumas repetitivos, durante a emissão vocal e mesmo durante funções fisiológicas primárias como deglutição, respiração e proteção de vias aéreas (14). Dailey *et al.* (13) justificam que a cicatrização por segunda intenção, que ocorre quando áreas de LP superficial são deixadas expostas, gera maior resposta inflamatória. Woo *et al.* (14), em relato

de 18 pacientes, descreveram excelentes resultados na avaliação subjetiva da qualidade vocal com a realização do microflap seguido do fechamento da incisão com sutura, em estudo sem grupo controle. Por outro lado, experimentos com laringes de coelho para estudo do processo cicatricial após trauma cirúrgico demonstram que a cobertura epitelial, ou a reepitelização, é um dos eventos mais precoces do processo cicatricial, mesmo após amplas remoções do mesmo (15). Este é o motivo pelo qual outros autores defendem que defeitos no fechamento da ferida cirúrgica ou na reepitelização não seriam clinicamente relevantes na fonocirurgia. Outros autores desencorajam o uso da sutura considerando a dificuldade de sua realização em um campo cirúrgico relativamente estreito e de difícil acesso, como é o das microcirurgias de laringe (16,17). No único estudo experimental que compara os resultados da cicatrização das pregas vocais em animais submetidos a realização do microflap, com e sem sutura das bordas do retalho, os resultados favoreceram a técnica com aproximação das bordas do retalho com sutura (18).

A utilização da cola de fibrina poderia ser uma alternativa para atingir o resultado final ideal, isto é, ausência de áreas desepitelizadas expostas e, ainda com a vantagem de acrescentar pouco tempo ao ato cirúrgico, e não exigir habilidades especiais que requeiram um tempo de aprendizado. O seu uso está bastante disseminado entre os mais habilidosos laringologistas da atualidade, baseados em impressões clínicas, sem grupos controles ou qualquer método comparativo (17). Não encontrou-se na literatura relato de complicações no uso da cola de fibrina nas pregas vocais. A cola de fibrina autóloga é amplamente utilizada em outros campos da otorrinolaringologia, como enxertia de nervos, reconstrução de cadeia ossicular, membrana timpânica, conduto auditivo externo, fechamento de fistulas liquóricas na base do crânio, entre outros. Em decorrência da potencial transmissão de doenças e reações imunes o seu uso não é permitido nos Estados Unidos. Na Europa, onde são utilizados, não há relatos destas intercorrências (19). Segundo os seus fabricantes a cola de fibrina é completamente absorvida e não interfere com o processo de cicatrização. Seu uso seria benéfico no processo de cicatrização por estimulação imediata dos fibroblastos (19). Análises histológicas de pregas vocais animais submetidas à manipulação cirúrgica e enxertia de gordura mostram que, aparentemente, o processo de fibrinogênese é induzido pela manipulação da prega vocal e não pelo material enxertado (20). Por outro lado, Okamura *et al.*, (16) em 1987, em um dos raros estudos experimentais, comparando técnicas fonocirúrgicas, relataram, em pregas vocais caninas, maior proliferação de fibras colágenas e pior resultado no que diz respeito à vibração mucosa com a utilização de cola de fibrina sob o retalho do microflap quando comparado com a

realização do microflap isoladamente. A utilização empírica da cola de fibrina acrescenta custo adicional considerável ao procedimento cirúrgico. Não existem evidências até o momento de que o seu custo-benefício seja válido nas fonocirurgias.

O atual estudo teve por intuito dar sustentação às observações clínicas relatadas de maneira a justificar a realização de sutura ou a utilização de cola de fibrina na técnica de microflap das pregas vocais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar aspectos cicatriciais resultantes das cirurgias das pregas vocais em três técnicas distintas: confecção de microflap e seu fechamento com sutura, confecção de microflap e seu fechamento com cola de fibrina e confecção de microflap e cicatrização por segunda intenção. Identificar a técnica que obtenha parâmetros histológicos mais próximos de uma prega vocal não operada.

Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar a intensidade do processo inflamatório
- Avaliar e comparar a concentração de colágeno;
- Avaliar e comparar os efeitos na espessura do epitélio;
- Avaliar e comparar os efeitos na espessura da LP

REVISÃO DE LITERATURA

Hirano em 1974 (21), descreveu a estrutura básica da prega vocal humana como sendo composta por músculo com ligamento vocal e a camada mucosa. Em 1975, o mesmo autor, em revisão sobre a histologia das pregas vocais dividiu a estrutura da prega vocal em cinco camadas: epitélio, LP com suas camadas superficial, intermediária e profunda e músculo vocal. (4). Em 1985 Hirano e Katita (4) formularam a teoria de corpo e cobertura onde a prega vocal estaria dividida em três regiões: uma cobertura composta pelo epitélio e a camada superficial da LP, uma região de transição, composta pelas camadas intermediária e profunda da LP (ligamento vocal) e um “corpo” formado pelo músculo vocal.

A qualidade vocal depende da integridade desta superfície vibratória e da manutenção de suas características biomecânicas e viscoelásticas. As propriedades biomecânicas das pregas vocais são determinadas em grande parte pela relação entre densidade e organização dos componentes da matriz extracelular (MEC) da LP (22). O conhecimento desta estratificação e do conceito de corpo e cobertura foi essencial para o desenvolvimento e refinamento das técnicas de microfonocirurgia.

O termo “fonocirurgia” estabelecido no início dos anos 1960 refere-se a procedimentos que mantenham, restaurem ou melhorem a voz humana (10,23,24). Dentre as fonocirurgias, a microfonocirurgia refere-se a procedimentos endoscópicos das pregas vocais com auxílio do microscópio. A microfonocirurgia é realizada para tratamento de lesões benignas que acometem em geral a camada superficial da LP e, algumas vezes, a cobertura epitelial. As técnicas de microfonocirurgia envolvem invariavelmente a confecção de um retalho subepitelial para a abordagem das lesões na camada superficial da LP, preservando ao máximo a cobertura epitelial e também a camada superficial da LP. Uma incisão é realizada no epitélio da superfície vestibular da prega vocal, lateral à lesão e paralela ao ventrículo. Um plano avascular na camada superficial da LP é dissecado de forma a expor a lesão e facilitar a identificação e preservação do ligamento vocal. Ao final do procedimento este retalho é reposicionado de forma a cobrir a LP e a área cruenta resultante da remoção da lesão. A cicatrização por segunda intenção ocorre na maior parte das vezes de modo satisfatório através da migração epitelial (1,25). No caso de remoção de lesões mais extensas, podem ocorrer defeitos de fechamento epitelial com exposição de segmentos de LP, o que em teoria, poderia levar a resultados cicatriciais piores e, conseqüentemente, a resultados vocais insatisfatórios.

A manutenção da integridade da camada superficial da LP é particularmente relevante na escolha da técnica cirúrgica (26). Tecidos com altas concentrações de colágeno e fibroblastos tem um maior potencial para cicatrização aberrante (5) e, por isso, as camadas mais profundas da LP devem ser evitadas. Aderências da membrana basal epitelial ao ligamento vocal devido à não preservação da LP, podem resultar em menor oscilação e enrijecimento da prega vocal (27). Todo procedimento microfonocirúrgico produz lesão tecidual, reação inflamatória e cicatricial secundárias que irão definir o resultado vocal (14).

A presença de uma cicatriz nas pregas vocais é a maior causa da persistência de disфонia após microfonocirurgia (28). Quando uma cicatriz se forma nas pregas vocais, a viscosidade e as forças de tensão das pregas vocais se alteram, inibindo assim a progressão da onda mucosa através da margem vibratória da prega vocal. Estas alterações resultam em rouquidão, perda do controle vocal e fadiga. Até o momento o tratamento para cicatrizes de pregas vocais é insatisfatório. O entendimento do processo de formação de cicatriz nas pregas vocais e, o efeito de variações e refinamentos nas técnicas da microfonocirurgia na cicatrização poderiam atuar na prevenção destas cicatrizes.

A definição de cicatriz segundo Dicionário Médico Stedman (29) é “substituição de tecido normal, destruído por trauma ou doença, por tecido fibroso”. A literatura dermatológica é rica na descrição dos processos cicatriciais da pele. O processo cicatricial pode ser descrito em fases: hemostasia, inflamação, reepitelização, proliferação celular, deposição de matriz, angiogênese e retração cicatricial. Estas fases se sobrepõem e são interdependentes sendo, portanto, difícil distinguir onde termina uma e onde começa a seguinte (15). Classicamente este processo é descrito da seguinte forma (30,31): a resposta inflamatória é iniciada pela extravasamento dos componentes do sangue com a lesão vascular. O afluxo de células liberam numerosos mediadores químicos, citocinas e fatores de crescimento que recrutam neutrófilos, macrófagos, monócitos para o sítio injuriado. Os macrófagos limpam e desbridam a ferida e liberam numerosas citocinas adicionais que aumentam a migração e proliferação de fibroblastos incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos e fator β de transformação de fibroblastos. Os macrófagos também liberam citocinas responsáveis pela formação de tecido. A resposta inflamatória é necessária não apenas para orquestrar as fases tardias da cicatrização, mas também para assegurar imunocompetência após a lesão. Em geral, cicatriz é vista como tecido fibroso. Acredita-se que o aumento de colágeno é a base da fibrose e, que a força de uma cicatriz depende da sua concentração

de colágeno, tanto o colágeno recém sintetizado, reacional, quanto o colágeno residual recrutado pelo processo inflamatório (32). O arranjo anormal de fibras colágenas pode ser considerado patognomônico de cicatriz (33). Na pele, entre três e seis semanas após a lesão, ocorre o pico de síntese do colágeno, que se organiza em uma forma mais densa, em bandas ao longo das linhas de tensão, eventualmente com formação de reações cruzadas à partir de duas semanas até um ano após a lesão inicial (33).

Na laringe, e mais especificamente nas pregas vocais, uma cicatriz promove déficit funcional devido à perda da viscoelasticidade da mucosa, e de sua capacidade de modular o fluxo aéreo para produzir fonte sonora glótica (5). A presença de tecido cicatricial na porção membranosa da prega vocal interrompe o movimento muco-ondulatório pois altera as propriedades físicas do tecido, destruindo a interface entre corpo e cobertura da prega vocal (5). A estratificação da LP das pregas, e a composição de sua MEC conferem à ela as características necessárias para permitir movimentos de deslizamento, periódicos e simétricos, resultando em emissão vocal satisfatória. A presença de cicatriz, sua localização e extensão vai determinar o grau de disfonia (34). Clinicamente, uma cicatriz nas pregas vocais pode resultar em voz soprosa, fraca e rouca, áspera e mesmo diplofônica (5). À estroboscopia observa-se uma onda mucosa assimétrica, reduzida ou abolida, coaptação glótica incompleta, segmentos não vibratórios e mecanismos de compensação secundários como hiperconstrição de bandas vestibulares (5).

A LP da prega vocal humana é composta por um componente celular e outro extracelular. Em 1981 Hirano (35) descreveu os componentes das camadas da LP: fibras colágenas finas na camada superficial, predomínio de fibras elásticas entrelaçadas com fibras colágenas na camada intermediária, e fibras colágenas mais densas na camada profunda. Benninger *et al.* (5) em 1996, estudando a LP de pregas vocais normais de cadáveres com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Massom observaram a camada superficial ou espaço de Reinke contendo pequeno número de fibroblastos, conteúdo relativamente alto de fibras reticulares e poucas fibras elásticas e colágenas. Uma camada intermediária, um pouco mais rica em matriz extracelular e fibras colágenas e quantidade moderada de fibras elásticas e fibroblastos. A camada intermediária se insinuava para dentro da camada profunda, sendo difícil a distinção entre as duas na maior parte das áreas, no entanto, a camada profunda aparentemente era constituída de uma acúmulo denso de MEC com muitas fibras elásticas e colágenas e uma quantidade intermediária de fibroblastos. Ishii *et al.*, em 1996 (36) realizaram estudo tridimensional do arranjo das fibras elásticas e colágenas na prega vocal

através de técnicas de digestão seletiva para as fibras. Na camada superficial da LP, observaram agrupamentos de fibras colágenas e fibras elásticas finas de trajeto retilíneo ou em espiral. Na camada intermediária encontraram fibras elásticas espessas e, fibras colágenas de trajeto longitudinal à borda livre da prega vocal, além de finas fibras elásticas em espiral. Os espaços entre as fibras de colágeno foram descritos como amplos, e preenchidos pelas fibras elásticas espessas e abundantes. Na camada profunda, encontraram feixes densos de fibras colágenas e finas fibras elásticas em espiral.

Buhler *et al.* em 2011 (37), estudaram a distribuição de colágeno em pregas vocais humanas normais. O estudo analisou a distribuição de colágeno tipo I e colágeno tipo III em 20 laringes adultas, sendo metade do gênero masculino e metade do gênero feminino. A presença de colágeno foi determinada através de reações imuno-histoquímicas. Confirmaram a maior concentração de colágeno tipo I nas camadas mais superficiais da LP, logo abaixo da cobertura epitelial e também nas camadas mais profundas da LP adjacente ao músculo vocal. O colágeno tipo III foi observado em maior concentração na camada profunda da LP.

Aparentemente apenas os componentes extracelulares teriam um papel determinante nas características biomecânicas, pois o componente celular na LP é muito escasso (38). O tecido extracelular, também chamado de MEC, contém duas famílias de macromoléculas que fornecem um “arcabouço” de sustentação para a LP: colágenos e elastinas e outras moléculas que preenchem o espaço no meio deste arcabouço compostos por glicoproteínas e proteoglicanos (39). Os componentes da MEC de maior interesse estudados na literatura referente aos processos cicatriciais são: colágeno, pró-colágeno, elastina, ácido hialurônico, decorina, fibromodulina e fibronectina (22,40,41). Conceitos básicos desenvolvidos nas últimas décadas de estudos sobre cicatrização de pregas vocais foram o recrutamento de fibroblastos e a produção de componentes da MEC em resposta à lesão das pregas vocais (8).

O colágeno é o maior componente das pregas vocais humanas, representando 43% do total de proteínas (42). Além disso, o colágeno regula a migração celular e a remodelação dos tecidos durante o crescimento, diferenciação e cicatrização. A densidade relativa de fibras colágenas na LP de pregas vocais humanas é variável, com maior concentração nas camadas superficiais e profundas (42-44). Colágeno tipo I é uma proteína fibrosa primária do tecido conectivo e, é o subtipo mais abundante de colágeno no corpo humano. Tem localização preferencial nas pregas vocais humanas nas camadas mais superficiais junto à membrana basal do epitélio e, na camada mais profunda da LP, junto ao

ligamento vocal. Acredita-se, que seja ele o responsável pela força tensora durante a vibração das pregas vocais, mantendo a forma e contorno da prega vocal durante o movimento muco-ondulatório (45). Colágeno tipo III é o subtipo mais abundante e uniformemente distribuído na LP das pregas vocais, cujo papel provavelmente está relacionado à manutenção das características elásticas das pregas vocais (45). Ele forma uma rede fibrosa que tem papel nos estágios iniciais da cicatrização. Em estudos de imuno-histoquímica, colágeno I e III juntos compreendem a maior parte do colágeno presente na LP das pregas vocais (42). Colágeno tipo IV é uma proteína não fibrosa, altamente abundante na região da membrana basal (45,46). Gray *et al.*, em 1993 (47) realizaram trabalho de revisão sobre a estrutura molecular e celular da prega vocal humana. Os autores evidenciaram colágeno do tipo IV e VII na região da membrana basal do epitélio. Na LP observaram predomínio do colágeno tipo III.

Madruza de Melo *et al.* em 2003 (48) descreveram com o auxílio da coloração picrossírius red uma estreita faixa de colágeno tipo I na camada superficial da LP, camada intermediária composta de colágeno tipo III e, na profundidade do músculo vocal bandas de colágeno tipo I e III entrelaçadas no que o autor descreveu como aspecto tipo “cesta de vime”.

Zapater *et al.* em 2009 (49) estudaram biópsias extraídas de 12 pregas vocais humanas submetidas previamente a cordectomia com laser de CO₂ e/ou microdissecção com cautério elétrico. Biópsias foram colhidas entre a 9^a e a 104^a semana após o procedimento por ocasião de outras indicações clínicas. Tricrômico de Massom foi a coloração escolhida para o estudo do grau de colagenização. Os autores classificaram histologicamente, de maneira subjetiva, o que chamaram de grau de colagenização do estroma: grau 1 sendo um baixo grau de colagenização, com poucas fibras colágenas e fibroblastos esparsos; grau 2 indicando um grau moderado de colagenização e, grau 3 um alto grau de colagenização, com numerosas fibras espessas de colágeno em padrão desorganizado. Classificaram ainda a colagenização em superficial e profunda, conforme a região da LP descrita. Notaram que a colagenização se estendeu por todas as camadas da LP e consideraram então, que esta representaria o estágio final de uma lesão tecidual crônica nas pregas vocais, o que ocorreu de 12 a 20 semanas após o procedimento cirúrgico nesta série. A limitação deste estudo, reportada inclusive pelos autores, foi a heterogeneidade das lesões a que os sujeitos foram submetidos e, a grande variação dos tempos de estudo histológico, devido ao fato de o estudo ter sido realizado em humanos e envolver questões éticas.

Hirano *et al.* em 2009 (50) obtiveram biópsias de 10 pregas vocais humanas de três a 13 meses após corpectomia ou cordotomia. Estes autores concluíram que a variabilidade individual foi muito grande no padrão de cicatrização das pregas vocais em humanos. Sugeriram ainda, que, em lesões que acometem as porções mais profundas da LP, ocorreu maior depósito de bandas de colágeno distribuídas em toda a LP, o que não ocorreu nas lesões mais superficiais. Os autores destacaram as limitações deste tipo de estudo em humanos, onde não se consegue padronizar o tempo no estudo da cicatrização e nem o tipo e extensão da lesão, parâmetros estes que podem ser controlados nos estudos experimentais.

A resposta à lesão de mucosa da subglote foi descrita por Goldstein *et al.* em 1998 (51), em coelhos. Os autores estudaram a evolução natural da cicatriz provocada na subglote de coelhos do dia zero ao dia 21 após lesão. No primeiro dia, assim como em lesões de pele, observaram a formação de um coágulo de fibrina. A reepitelização da mucosa se iniciou no quinto dia e, no 14º dia, estava completa. Fibroplasia e fibrose foram observadas na LP a partir do sétimo dia e até o 21º dia. Os autores concluíram que seus achados, para a mucosa e LP, foram semelhantes àqueles descritos para epiderme e derme, respectivamente. No entanto, as alterações epiteliais foram mais prolongadas na via aérea.

Diversos modelos animais têm demonstrado que alterações na composição da MEC (52) e das proteínas intersticiais da LP das pregas vocais ocorrem como resultado da formação de cicatriz. Espessamento da LP (53), redução na quantidade de ácido hialurônico (41), aumento na densidade de colágeno e desorganização das fibras de colágeno (52) e fibrina são algumas das alterações descritas. A compreensão dos processos biológicos que envolvem a cicatrização e a fibrose pode levar ao desenvolvimento de técnicas preventivas e intervencionais que modulem positivamente o processo cicatricial.

Alguns estudos experimentais em animais avaliaram as fases agudas do processo cicatricial em pregas vocais. Kurita *et al.* em 1983 (54) estudaram a LP de dez espécies diferentes, com o objetivo de compará-las com a estrutura em camadas da prega vocal humana descrita por Hirano (3). Foram estudados cinco laringes de cada animal: cão, cavalo, macaco, porco, coelho, cobaia, boi, rato e ovelha. Cortes histológicos transversais no ponto médio da porção membranosa foram corados com HE, van Gieson, Azan e Weigert com o objetivo de avaliar as densidades de fibras colágenas e elásticas, bem como a espessura da mucosa. Com relação aos coelhos, os autores observaram que, a LP poderia ser dividida em duas camadas, uma superficial pobre em componentes fibrosos e outra

profunda densa em fibras elásticas e colágenas. Os autores descreveram a LP como fina e mais rígida, o que poderia interferir em estudos de fonação. Concluíram que a prega vocal que mais se assemelha estruturalmente com a humana dentre os animais investigados foi a dos porcos. No entanto, os autores referem que esse fato não necessariamente representa que o porco seja o melhor modelo experimental em estudos de fonação.

Garrett *et al.*(55), em 2000 revisaram este assunto comparando laringes frescas *ex vivo* de cães, macacos e porcos com três laringes humanas de cadáver. Os autores realizaram elevação de microflap unilateral em três laringes de cada animal e as submeteram a análise histológica com HE e coloração pentacrômica de Movat para realce dos componentes fibrosos. Submeteram ainda dois cães e dois porcos a videoestroboscopia *in vivo* após a análise histológica ter concluído que o plano do microflap na prega vocal dos macacos não é similar ao de pregas vocais humanas. Os autores ainda compararam seus resultados com os encontrados por Kurita *et al.* em 1983 (54) observando que, estes autores descreveram a estratificação da prega vocal em cães em duas camadas, enquanto que eles, em três. Baseados nos seus achados da histologia do microflap, e da videoestroboscopia, os autores concluíram que o cão seria o animal mais apropriado para estudos laríngeos, em especial, no caso de lesões benignas da laringe.

Como já observado por Bless *et al.* em 2010 (34), a escolha do animal a ser utilizado não se baseia apenas nas suas características físicas, mas também em questões práticas. Estas questões incluem o tamanho do animal, infraestrutura disponível, custo de compra e manutenção dos animais durante a pesquisa.

A utilização de coelhos como modelo experimental no estudo da cicatrização das pregas vocais tem sido cada vez mais frequente nas últimas décadas. Alguns autores relatam que a similaridade histológica da prega vocal de coelhos com pregas vocais humanas é maior do que a similaridade de pregas vocais de cães com humanos. Aparentemente, coelhos têm o ligamento vocal mais bem delimitado do que cães (20), os quais foram largamente utilizados como modelos de cicatrização das pregas vocais em anos passados. Hallén *et al.* em 1996 (56) já relataram que a estrutura das pregas vocais dos coelhos é semelhante à humana, apesar de a LP ser menos desenvolvida. Hertegard *et al.*, 2006 (53) descreveram a constituição da prega vocal normal do coelho como sendo composta de uma LP amorfa sem fibras colágenas longitudinais visíveis.

Thibeault *et al.* em 2002 (22) criaram um modelo experimental em coelhos para estudos do processo cicatricial das pregas vocais. Por via endolaríngea realizaram biópsias com saca-bocado em

uma das pregas vocais de 11 coelhos, para estudo da cicatrização das pregas vocais após dois meses. O tricromico de Massom foi a coloração escolhida. Em comparação com pregas vocais normais encontraram: redução e desorganização das fibras colágenas, aumento no pró colágeno e redução da elastina acompanhando a rigidez tecidual. Não houve diferença estatística nos níveis de ácido hialurônico entre os grupos. O achado mais notável foi o aumento da rigidez tecidual apesar do conteúdo total de colágeno ter diminuído o que, segundo os autores, indica que talvez o colágeno não seja a única proteína da MEC responsável por determinar as características viscoelásticas da prega vocal.

Rousseau *et al.* em 2003 (52) introduziram um modelo de lesão de pregas vocais em cães removendo completamente a LP até o músculo vocal usando micro tesouras e pinças de laringe por via endolaríngea. A coloração Elastin-van Giesen foi utilizada para identificação de colágeno e elastina. Estes autores relataram aumento do pró colágeno tipo I, dois meses após a lesão. Um sistema de análise de imagens foi usado para medir a densidade de cada área corada. O colágeno encontrava-se desorganizado e aumentado seis meses após a lesão, enquanto que o pró colágeno havia diminuído. Os níveis de ácido hialurônico e elastina encontravam-se iguais aos controles não operados.

Duprat *et al.*, em 2004 (20) em experimento com coelhos submeteram os animais a procedimento com confecção de microflap bilateralmente e enxertia de gordura em um dos lados através de laringofissura. Estudaram o processo inflamatório ocasionado pelos procedimentos em três tempos: uma semana, três semanas e três meses. Avaliaram a intensidade do processo inflamatório com HE, e a fibrinogênese com tricrômico de Massom, de modo subjetivo, estabelecendo quatro graus de ausente a intenso. Não observaram diferença entre as pregas vocais submetidas a enxertia de gordura e as que foram submetidas apenas à confecção do microflap em nenhum dos tempos estudados, nem na intensidade do processo inflamatório, nem na fibrinogênese que na maior parte das pregas vocais foi ausente ou leve.

Hertegard *et al.* em 2006 (53), em estudo com 15 coelhos, submeteram 22 pregas vocais a lesões tipo biópsias de pregas vocais. Metade das pregas vocais foram tratadas com injeções de ácido hialurônico e a outra metade foi submetida à injeção de solução salina oito semanas após as biópsias. Oito pregas vocais foram usadas como controle. Onze semanas após as injeções as pregas vocais foram estudadas com HE e van Gieson, onde foi observado espessamento da LP nas pregas vocais lesadas quando comparadas com as do grupo controle, independente da injeção de ácido hialurônico.

Branski *et al.* em 2005 (15) estudaram as reações cicatriciais agudas em um grupo de coelhos submetidos a decorticação unilateral de pregas vocais por via endolaríngea. Observaram completa reepitelização já no quinto dia após injúria. Três dias após o procedimento notaram grande infiltrado celular, uma combinação de células inflamatórias e fibroblastos. Entre o quinto e o 21º dia após lesão notaram aumento no depósito de colágeno, que não foi avaliado quantitativamente. Até o 21º dia a LP não havia refeito a sua estrutura estratificada normal.

Ainda em 2006, Hertegard *et al.* (53), realizaram estudo para avaliar os efeitos da injeção de células tronco mesenquimais em pregas vocais de coelhos submetidas a cordectomia. Seu grupo controle consistiu de pregas vocais submetidas à injeção de solução salina e as alterações histológicas foram observadas quatro semanas após as lesões. As pregas vocais com cicatriz não tratadas apresentaram acúmulo de fibras tipo colágeno, longitudinais na LP e maior concentração de colágeno quando comparadas com grupo controle não operado.

Ling *et al.*, 2010 (57) descreveram a anatomia da prega vocal de ratos e as alterações agudas na morfologia celular e densidade e distribuição após lesão unilateral das pregas vocais. Alterações grosseiras foram descritas na LP e na composição celular do epitélio sete dias após a lesão. A reepitelização e a normalização da área e volume da mucosa ocorreu três dias após a lesão. As avaliações histológicas revelaram um recrutamento sequencial de células tipo neutrófilos, células epiteliais e células tipo fibroblastos do primeiro ao quinto dia após lesão, sugerindo que as alterações celulares antecedem as alterações funcionais e podem formar as bases para uma cicatrização indesejável.

Yamashita *et al.* em 2010 (58) estudaram grupos de ratos submetidos a cordectomia e avaliados nos dias 1, 7, 14, 28, 42 e 56 após as intervenções. Realizaram estudos de imunohistoquímica para detecção de colágeno tipo I, III e IV, pró colágeno, elastina, decorina, fibronectina e ácido hialurônico. Observaram que, na prega vocal normal, todas as proteínas estiveram presentes, enquanto pró colágeno e colágeno IV eram fracamente positivas. No primeiro dia após a lesão descreveram um aumento de pró colágeno, no 7º dia observaram picos máximos de colágeno tipo I e IV e um aumento do colágeno tipo III e decorina. Elastina não apresentou variação significativa nos períodos estudados. Fibronectina apresentou aumento entre o primeiro e o 42º dia e ácido hialurônico apresentou aumento do 1º ao 14º dia. Nas avaliações histológicas realizadas com HE observaram uma LP simples nas pregas vocais normais. Nas pregas vocais submetidas a lesão, no 1º dia observou-se presença de coágulo de fibrina, infiltrado inflamatório e ausência de epitélio. Já no 7º

dia observaram reepitelização e no 28º dia uma LP contraída, com presença de eosinófilos denotando o que chamaram de cicatriz madura.

Suehiro *et al.* em 2012 (2) em estudo com 10 coelhos por via endolaríngea com laringoscopia de suspensão realizaram microflap unilateralmente nas pregas vocais de cinco animais e cinco controles. Estudaram a espessura epitelial e a presença de marcadores inflamatórios através de imuno-histoquímica e PCR . Avaliaram os animais duas semanas após a lesão inicial. Concluíram que não houve diferenças na espessura do epitélio nem na expressão genética de agentes fibrinóticos.

Rousseau *et al.* em 2004 (59), examinaram histologicamente e reologicamente as alterações nas pregas vocais de coelhos com cicatrizes após seis meses da lesão. Verificaram que os níveis de colágeno estavam aumentados significativamente e os de pró colágeno diminuídos, comparáveis aos níveis normais. A elastina estava reduzida e o ácido hialurônico mantinha-se inalterado. A rigidez das pregas vocais mantinha-se maior do que o normal. Sugeriram que, após seis meses, a maturação do colágeno estaria completa caracterizando uma cicatriz crônica ou madura. Achados similares foram descritos em cães (52,60).

Apesar de não haver estudos de incidência e prevalência de cicatriz em pregas vocais, Hirano (50) sugere que este é um dos grandes problemas ainda a serem solucionados no futuro.

Ainda em 1996, Benninger *et al.*(5), afirmavam que o melhor tratamento para uma cicatriz nas pregas vocais é a prevenção com escolha de técnicas microcirúrgicas adequadas. Em seu artigo de revisão sobre o tratamento de cicatrizes em pregas vocais, sugeriu que o uso de suturas com fio absorvível poderia reduzir o tempo de cicatrização epitelial por segunda intenção.

Woo *et al.* em 1995 (14) baseado na observação de exames de estroboscopia após microfonocirurgia identificaram regiões das pregas vocais com significativa redução da amplitude dos movimentos vibratórios ou mesmo ausência destes movimentos. Os autores relataram 18 pacientes submetidos a microfonocirurgia realizando fechamento do microflap com suturas e avaliaram a possibilidade de uma melhor cicatrização. Descreveram como vantagens do fechamento do microflap com sutura: redução do tamanho do defeito epitelial, promoção de cicatrização primária da ferida, posicionamento da ferida cirúrgica longe da borda livre da prega vocal na superfície vestibular da mesma e a aplicação de uma força de tensão local vantajosa durante o período de reparação em uma estrutura tão dinâmica. Observaram que, destes 18 pacientes, nenhum apresentou piora da qualidade vocal após o procedimento. Ao exame estroboscópico todos os pacientes

apresentaram movimentos muco-ondulatórios com amplitude preservada sugerindo bom resultado cicatricial. Os autores não apresentaram, no entanto, grupo controle.

Tsunoda e Niimi em 2000 (61) detalharam a técnica de transplante de fâscia para tratamento de aderências das pregas vocais. Neste artigo, os autores relataram dois casos de insucesso sendo um deles devido a extrusão total do enxerto pelo microflap, sugerindo a necessidade de sutura após o implante de fâscia. Estes autores descreveram ainda um instrumento denominado *knot-pusher* (empurrador de nó) para facilitar a confecção da sutura.

Fleming *et al.*, 2001 (18), no único estudo experimental histológico com utilização de suturas em microfonocirurgia aplicaram a técnica em quatro cães tendo como controle a prega vocal contralateral que foi submetida apenas à confecção do microflap. Observaram área cicatricial 75% maior nas pregas vocais em que não foi realizado o fechamento do retalho com sutura seis semanas após o procedimento. Suas avaliações histológicas foram realizadas com colorações com HE e tricrômico de Masson e as áreas foram mensuradas quantitativamente com auxílio de um micrômetro acoplado ao microscópio óptico com aumento de 40X. Apesar da determinação da área da cicatriz ter sido realizada cegamente por um patologista, esta mensuração foi subjetiva. A definição do que os autores estabeleceram como área de cicatriz foi descrita como: “fibroblastos maduros, roliços de formato alongado ou estrelados com estroma mixóide frouxo colagenoso com poucas fibras elásticas”.

Nishiyama *et al.*, 2001 (62) descreveram bons resultados com utilização de sutura após implante de gordura e fâscia em pregas vocais para tratamento de sulco vocal. Observaram a permanência do enxerto e também uma boa qualidade vocal pós operatória.

Wang *et al.*, 2008 (63) relataram em 61 pacientes submetidos a microfonocirurgia um menor tempo de cicatrização e menor recorrência de lesões além de melhora na qualidade vocal com a utilização de suturas no fechamento do microflap.

Informalmente, inúmeros laringologistas defendem o uso de microssuturas em microfonocirurgia apesar da dificuldade técnica de sua execução levando a um maior tempo cirúrgico e da necessidade de instrumental específico (61,64). Tsuji *et al.*, (64) publicaram uma técnica de sutura em microcirurgia laríngea dispensando a necessidade de um auxiliar. Pinças curvas de uso habitual em microfonocirurgia foram utilizadas, no entanto, os autores também desenharam uma pinça com curvatura maior apropriada para esta finalidade.

Uma alternativa atraente à realização de suturas seria a utilização de cola para o fechamento do microflap. O mecanismo de ação da cola de fibrina é baseado nas reações da cascata de coagulação, cujo passo final é a conversão de fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina, e a ligação dos monômeros de fibrina em uma rede insolúvel. Bergel (65) originalmente descreveu a fibrina como hemostático em 1909. Em 1915, Lippencott utilizou a fibrina como hemostático em cirurgia cerebral (66). Em 1940, Young e Medawar (67) utilizaram o fibrinogênio como adesivo em anastomose de nervos. Nesse período o fibrinogênio humano e a trombina começaram a tornar-se disponíveis em maiores quantidades através do processo de fracionamento do plasma. Em 1944, Cronkite *et al.*, (68) utilizaram o fibrinogênio pela primeira vez associado à trombina para fixação de enxertos de pele. A trombina bovina foi inicialmente comercializada na Europa, porém, a partir da década de 70 a inativação viral da trombina humana permitiu seu uso na maioria dos selantes. Com o refinamento dos métodos de produção o primeiro selante de fibrina foi lançado na Europa em 1982. Entretanto, a agência reguladora norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) não aprovou o produto em função do risco de transmissão de hepatite pelo plasma humano utilizado na produção do fibrinogênio, apenas em 1998, a cola de fibrina foi aprovada pela FDA. As primeiras colas de fibrina lançadas na Europa foram o Tissucol® e o Beriplast HS®. Ambos contêm dois componentes: fibrinogênio humano liofilizado com fator XIII que é reconstituído com antifibrinolítico (aprotinina) e trombina bovina, reconstituída com solução de cloreto de cálcio. A cola de fibrina tem sido empregada em uma variedade de procedimentos cirúrgicos como adesivo e hemostático e, mais recentemente, como meio para liberação de medicamentos e em engenharia tecidual. Na área cirúrgica, sua aplicação tem sido relatada por inúmeras especialidades: craniomaxilofacial (69), plástica e estética (70), ortopedia (71), ocular (72), cabeça e pescoço (73), cardíaca e vascular (74), neurocirurgia (75) e urologia (76).

Em otorrinolaringologia, relatos do uso de cola de fibrina podem ser encontrados desde 1979 por Staindl (77), que publicou sua experiência com a utilização de cola nas miringoplastias, fechamento de fistulas liquóricas, tonsilectomias em coagulopatas, laringectomias para prevenção de fistulas e anastomoses do nervo facial. O autor concluiu que, indubitavelmente, outras aplicações seriam encontradas para o uso da cola de fibrina em otorrinolaringologia, tanto para hemostasia quanto para síntese tecidual.

Trabalhos publicados relatando o uso da cola de fibrina especificamente nos procedimentos microcirúrgicos de laringe são poucos, apesar do frequente relato informal de laringologistas que utilizam esta técnica rotineiramente.

Pryor *et al.* (78) apresentaram no *Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation* em 2004 um trabalho comparando a cola de fibrina com as técnicas de sutura convencionais para aproximação de retalhos mucosos em microcirurgia laríngea. Através de análise de quadros e endoscopia digital, dois revisores avaliaram a cicatrização mucosa após três meses de seguimento. Os autores não encontraram diferenças na cicatrização, bem como não houve complicações relacionadas ao uso da cola de fibrina.

Martin *et al.*, 1981 (79) em trabalho experimental com procedimentos endolaríngeos em cães relataram excelentes resultados com bons resultados cicatriciais atribuídos às propriedades hemostáticas da cola e à falta de irritabilidade e toxicidade dos tecidos.

Okamura *et al.*, em 1987 (16), em um dos raros trabalhos experimentais compararam quatro técnicas de microfonocirurgia em um modelo experimental com cães: biópsia epitelial, confecção de microflap, biópsia epitelial com cobertura com enxerto de mucosa utilizando cola e confecção de microflap com fechamento com utilização de cola. Observaram após seis meses que a composição histológica do epitélio e da LP superficial foram mais semelhantes com o normal nos procedimentos com enxerto de mucosa e cola e confecção de microflap sem cola. Foram utilizados neste estudo as colorações HE e Azan para detecção de colágeno. Sugeriram que o uso da cola em associação com o microflap promoveu distúrbios da cobertura epitelial e maior proliferação de fibras colágenas na LP superficial.

O uso clínico de cola de fibrina em microfonocirurgia tem sido descrito por diversos autores e ainda relatado informalmente por muitos em comunicações pessoais.

Remacle *et al.* (17,80), entusiastas do uso de cola de fibrina, relataram em 2000 o tratamento de um grupo de 45 pacientes com sulco vocal com uso de cola de fibrina cobrindo enxertos de colágeno introduzidos no microflap. Os autores descreveram bons resultados clínicos. Com seguimento médio de cinco meses (um a 18 meses) observaram, em média, melhora nos parâmetros: tempo máximo de fonação e análise espectrográfica, bem como melhora na vibração à laringostroboscopia. Não foram descritas complicações relacionadas ao uso da cola, nem tampouco resultados cirúrgicos ruins relacionados ao uso da cola de fibrina.

Scapini *et al.*, 2011 (81) estudaram os efeitos da cola de fibrina aplicada para fixação de enxerto de fáscia em pregas vocais de coelhos. Estes efeitos foram estudados após 7, 30 e 90 dias, a mensuração da concentração de colágeno na cicatriz foi realizada utilizando o picrossírius red como coloração. Os autores concluíram que após 90 dias os níveis de concentração de colágeno foram significativamente maiores quando comparados aos lados submetidos a enxerto sem o uso de cola e que, portanto, medidas tomadas no início do processo cicatricial ou durante o procedimento cirúrgico como o uso de cola de fibrina podem interferir com a complexa interação entre fibroblastos, células inflamatórias e citocinas modulando todo o processo cicatricial.

Mais recentemente, 2012 Portes *et al.* (82) descreveram os efeitos da cola de fibrina aplicada em cicatrizes de pregas vocais de suínos após confecção de microflap. Relataram aumento na concentração de colágeno nas pregas vocais em que foi utilizada a cola de fibrina quando comparado com a prega vocal contralateral submetida apenas ao microflap. Os autores relataram que este achado após três meses do procedimento pode sugerir que a cola de fibrina tenha realmente um papel na fibrinogênese da cicatriz em pregas vocais.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (processo 1378-1).

Recebeu fundo de auxílio à pesquisa da FAPESP (processo 2009/06918-4).

Os procedimentos foram todos realizados no Laboratório de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental com auxílio de biólogo treinado em experimentação animal.

Animais de experimentação

Foram utilizados 52 coelhos, da raça New Zealand, pesando entre 2,5Kg e 3,5Kg de ambos os gêneros.

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

Formação dos grupos de estudo

Inicialmente dois animais foram utilizados em estudo piloto a fim de padronizar e aprimorar a técnica operatória. Três animais não operados, ou seja, seis pregas vocais compuseram o grupo controle normal e foram submetidas aos mesmos cortes histológicos e colorações e à análise dos mesmos parâmetros avaliados nos grupos submetidos às intervenções. Ao longo do período de experimentação houve cinco óbitos de animais na primeira semana de pós operatório em decorrência de possível complicação cirúrgica.

Determinou-se a formação de dois grupos de animais estudados em três tempos distintos:

- Grupo A, constituído de 21 coelhos nos quais foi realizado microflap da porção membranosa da prega vocal direita e prega vocal esquerda. Ao final do procedimento cola de fibrina foi aplicada sobre as bordas da incisão na prega vocal direita.
- Grupo B, constituído de 21 coelhos nos quais foi realizado microflap da porção membranosa da prega vocal direita e prega vocal esquerda. Ao final do procedimento as bordas da incisão foram aproximadas com um ponto de sutura na prega vocal direita.

O estudo histológico foi realizado em três tempos: sete dias, 30 dias e 90 dias.

Considerou-se como melhor resultado histológico aquele em que os parâmetros avaliados mais se assemelhavam ao de uma prega vocal normal, não operada.

Procedimentos cirúrgicos

Após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à anestesia geral intramuscular, utilizando-se cloridrato de quetamina (Vetaset®, laboratório Fort Dodge Saúde Animal) na dose de 40mg/Kg e cloridrato de xilazina (Kensol®, laboratório König do Brasil) na dose de 5mg/Kg e mantidos em respiração espontânea. Após a aplicação da anestesia intramuscular os animais foram submetidos a tricotomia da região cervical anterior e assepsia com solução iodada. Os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal em um suporte em forma de canaleta, sobre a mesa cirúrgica com coxim sob as escápulas para extensão do segmento cefálico e os quatro membros imobilizados.

O procedimento cirúrgico foi realizado segundo os seguintes tempos:

- a) Cervicotomia vertical na linha média com bisturi e lâmina número 15 após palpação e identificação das cartilagens laríngeas;
- b) Dissecção romba dos planos musculares até adequada exposição da cartilagem tireóidea e cartilagem cricóidea (Figura 1);

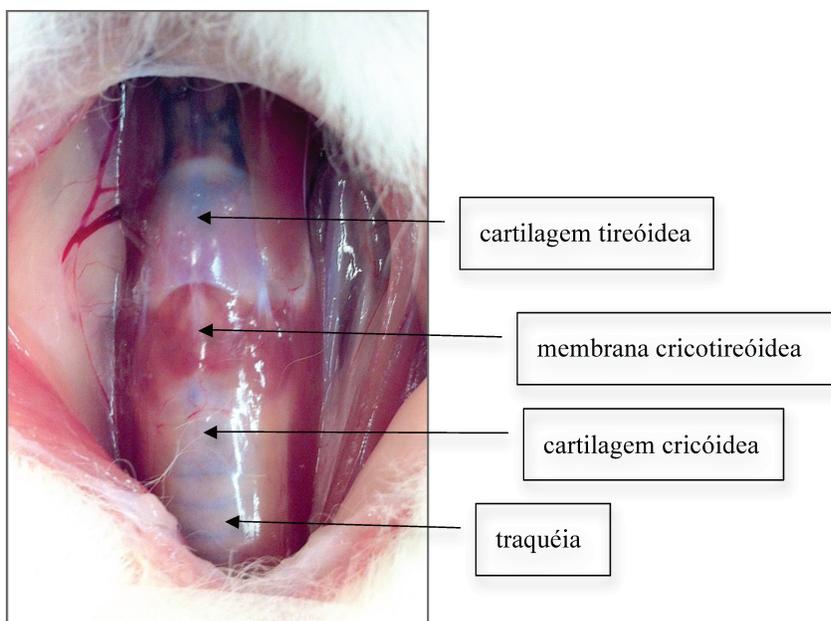


Figura 1 – laringe exposta após abertura da pele, subcutâneo e dissecção romba da musculatura pré laríngea. Vê-se cartilagem tireóidea, membrana cricotireóidea, músculos cricotireóideos, cartilagem cricóidea e primeiros anéis traqueais.

- c) Condrotomia vertical (laringofissura) na linha média da metade inferior da cartilagem tireóidea até o limite inferior da membrana cricótireóidea (Figura 2);

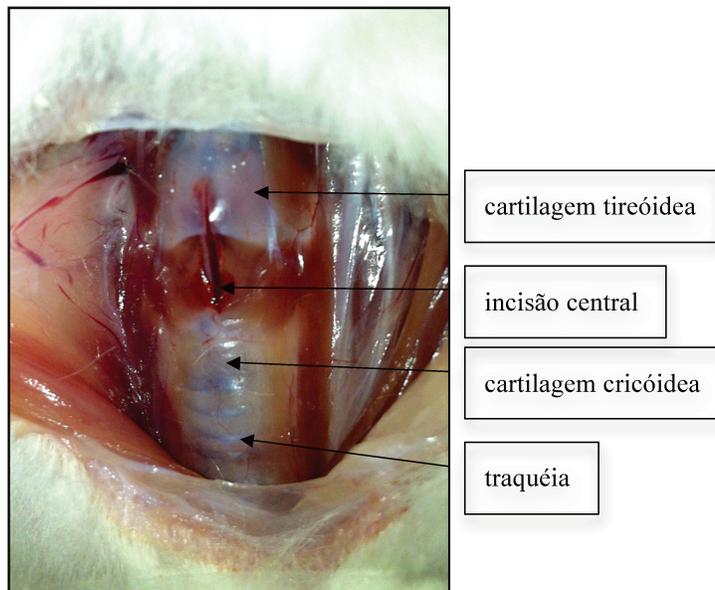


Figura 2 – incisão vertical na porção inferior da cartilagem tireóidea e membrana cricótireóidea.

- d) Na borda inferior da cartilagem tireóidea, em cada lado da laringofissura, foi fixado um fio de Prolene™ 4.0 para reparo e exposição da região endolaríngea (Figura 3);

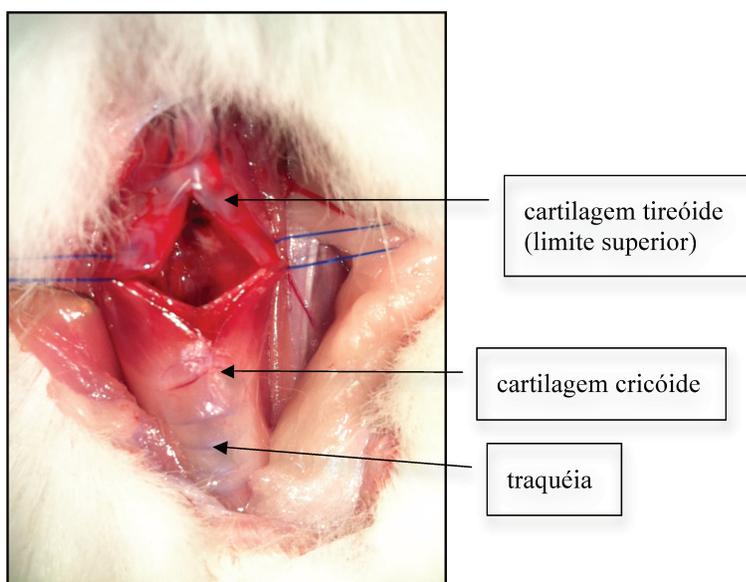


Figura 3 – pontos de reparo passados no limite inferior das cartilagens tireóideas para exposição do intróito laríngeo.

- e) Hemostasia local foi realizada com algodão embebido em epinefrina 1:1000, quando necessário;
- f) As pregas vocais foram identificadas sob microscopia com aumento de 16X com microscópio cirúrgico marca DFVasconcelos (Brasil) e lente de 200mm. Incisões foram realizadas na superfície vestibular das pregas vocais, paralelas à borda livre da porção membranosa das pregas vocais com estilete adaptado;
- g) A partir das incisões foram elevados microflaps em toda a extensão da porção membranosa de ambas as pregas vocais, com microdissector de ponta romba em forma de “L” com angulação de 45° (Figuras 4 e 5). Os retalhos foram dissecados em plano submucoso, tomando o extremo cuidado para não atingir a musculatura, observando-se sempre o instrumental cirúrgico por transparência, e tendo como referência a borda livre da prega vocal a partir do processo vocal;

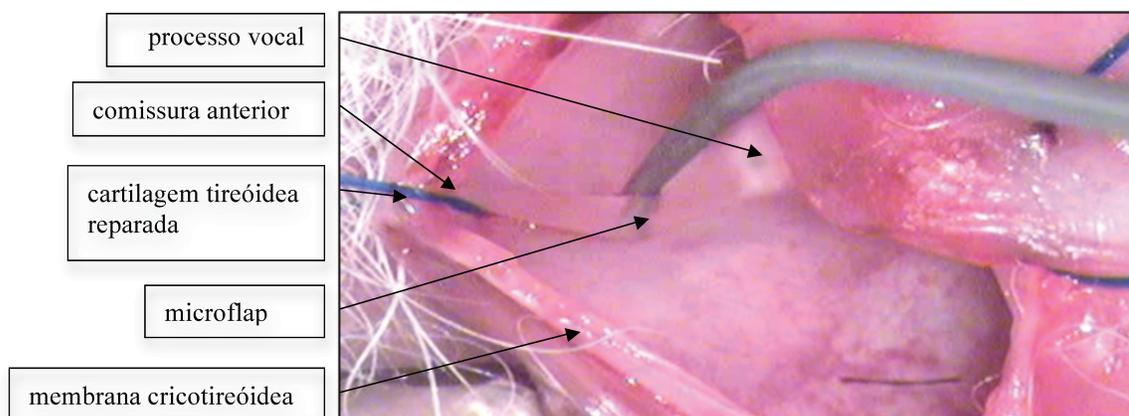


Figura 4 – visão frontal através da laringofissura anterior com dissecação de microflap em prega direita.

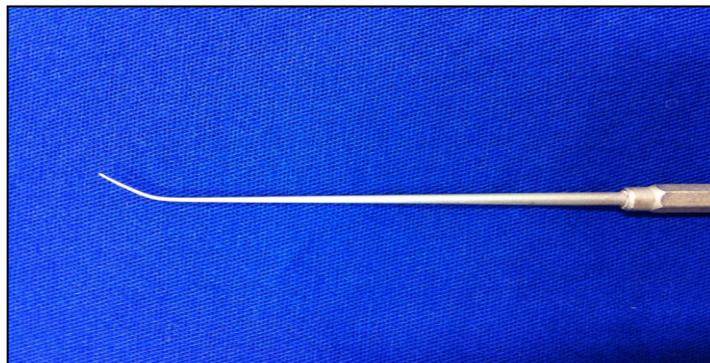


Figura 5 – microdissector.

- h) Em 21 animais (grupo A), aplicou-se cola de fibrina Tissucol® (Baxter, Immuno AG, Vienna, Áustria) sobre microflap confeccionado na prega vocal direita das pregas vocais. Utilizou-se do kit: o fibrinogênio liofilizado, a aprotinina bovina, a trombina liofilizada de 500UI e o cloreto de sódio. A preparação dos componentes foi facilitada pelo dispositivo Fibrinotherm®;
- i) Nos outros 21 animais (grupo B) as bordas do microflap foram suturados com um ponto de fio polycryl® 8.0;-
- j) Sutura da cartilagem tireóidea e da membrana cricotireóidea com um ou dois pontos de Prolene™ 5.0, sem transfixar a cartilagem tireóidea;
- κ) Fechamento de tecido celular subcutâneo e pele com fio polycryl® 4.0 e fio Prolene™ 4.0.

Os animais foram mantidos em gaiolas separadas e identificadas com a data do procedimento e o grupo ao qual o animal pertencia.

Preparação das laringes

Sete animais de cada grupo foram sacrificados após sete dias do procedimento; sete animais de cada grupo foram sacrificados após 30 dias do procedimento e sete animais de cada grupo foram sacrificados após 90 dias do procedimento. Os animais foram sacrificados por injeção intravenosa

em “bolus” de 10ml de Tiopental sódico a 1% seguidos por 5ml de KCl a 19,1%. As laringes foram excisadas através de incisão cervical vertical mediana. Em seguida, foram fixadas durante 48 horas em solução tamponada de formaldeído 5% e depois transferidas para recipientes com álcool etílico 70%, identificados segundo o grupo ao qual o animal pertencia e segundo o tempo de estudo (7 dias, 30 dias ou 90 dias).

A preparação macroscópica das laringes foi realizada pela aluna sob supervisão de patologista do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-Unicamp.

No intuito de facilitar a exposição e demarcação das pregas vocais, as laringes foram seccionadas no plano axial no nível das pregas vestibulares e o restante da porção supraglótica foi desprezada. A face externa do lado direito das laringes foi marcada com tinta nanquim para identificação dos lados direito e esquerdo.

Em seguida, as laringes foram abertas com incisão vertical na linha média posterior (Figura 6) e a borda livre da porção membranosa das pregas vocais foi marcada com tinta nanquim para facilitar sua posterior identificação microscópica nas lâminas (Figura 6).

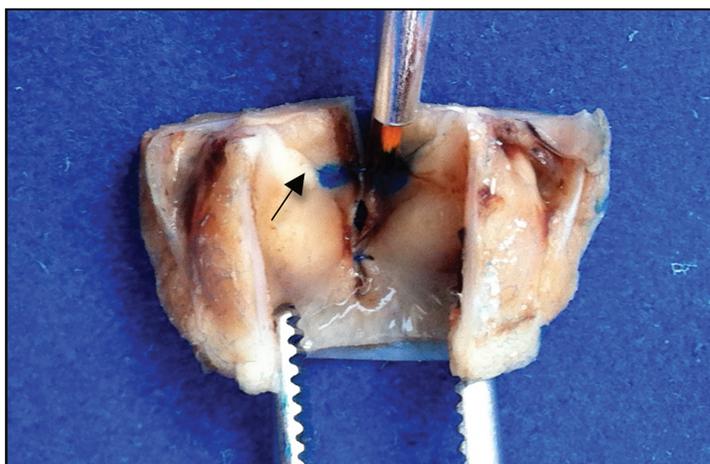


Figura 6 – visão posterior da laringe aberta com exposição das pregas vocais e aplicação nas bordas da pregas vocais com pincel. Porções membranosas das pregas vocais marcadas com tinta nanquim azul. A flecha preta indica o processo vocal da prega vocal esquerda.

Após identificação das pregas vocais foi realizado um corte coronal no ponto médio da porção membranosa das mesmas, de modo a transfixar ambas as pregas vocais. A porção anterior a esta incisão, contendo os dois lados da laringe, foi posicionada em cápsulas plásticas identificadas segundo o tempo de evolução (1= 7 dias, 2=30 dias, 3=90 dias) e grupo ao qual o mesmo pertencia (A= cola, B= sutura) e encaminhadas para processamento histológico com inclusão em parafina.

Os blocos foram submetidos a cortes coronais por micrótomo, com profundidade de 4 μ m. Após a confecção da lâmina, uma primeira lâmina foi sempre corada com HE, e o patologista responsável pela análise das lâminas verificava a presença de artefatos e a eventual necessidade de proceder a novo corte. Uma vez aprovada a lâmina em HE, outra lâmina era confeccionada com corte consecutivo e corada com tricrômico de Massom (Figura 7). Novamente o patologista verificava a qualidade da lâmina e a necessidade de proceder novo corte. Desta forma foram obtidas pelo menos duas lâminas para cada prega vocal, uma corada com HE e outra com tricrômico de Massom (Figura 7).

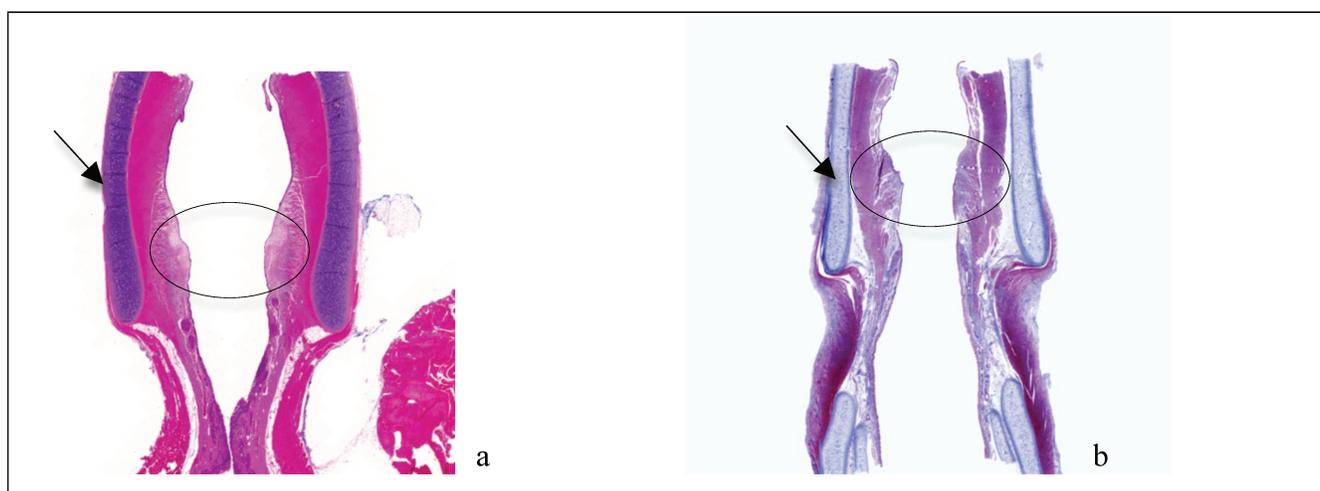


Figura 7 – exemplo de corte coronal através pregas vocais em uma das laringes: a) corada com HE e; b) corada com tricrômico de Massom. As setas pretas marcam as cartilagens tireóideas e a área ovalada assinala a região da borda livre das pregas vocais.

Para análise objetiva, procedeu-se ao escaneamento e digitalização das lâminas com uso do scanner 3DHISTECH modelo Panoramic MIDI®. As lâminas foram então visualizadas e analisadas digitalmente pela pesquisadora, conforme descrito a seguir, com aumento de 200X utilizando-se os programas Panoramic Viewer® (3DHISTECH) e Histoquant® (3DHISTECH).

Os reparos anatômicos utilizados para localização das bordas livres das pregas vocais foram: identificação da marcação com tinta nanquim feita na macroscopia; morfologia do músculo vocal subjacente e seu segmento medial e a borda livre da prega vocal em seu ponto de maior convexidade. Com o auxílio do programa Panoramic Viewer traçou-se uma linha perpendicular à borda livre das pregas vocais nas lâminas coradas com HE e tricrômico de Masson e, com base nesta linha, foram

feitas mensurações histológicas.

Avaliação histológica

1) Espessura do epitélio:

Foram realizadas três medidas da espessura do epitélio: uma sobre a linha demarcada correspondente ao ponto de máxima convexidade da borda livre da prega vocal, uma 100 μ m no sentido cranial e uma 100 μ m no sentido caudal. A espessura foi considerada desde a base do epitélio, junto à membrana basal, até o limite citoplasmático da célula escamosa mais superficial (Figura 8).

2) Espessura da LP:

Três medidas da espessura da LP foram feitas nos mesmos locais onde se mensurou o epitélio, sendo considerada a espessura da LP desde a membrana basal do epitélio até o encontro da primeira fibra muscular esquelética (Figura 8). A unidade utilizada foi micrômetro (μ m).

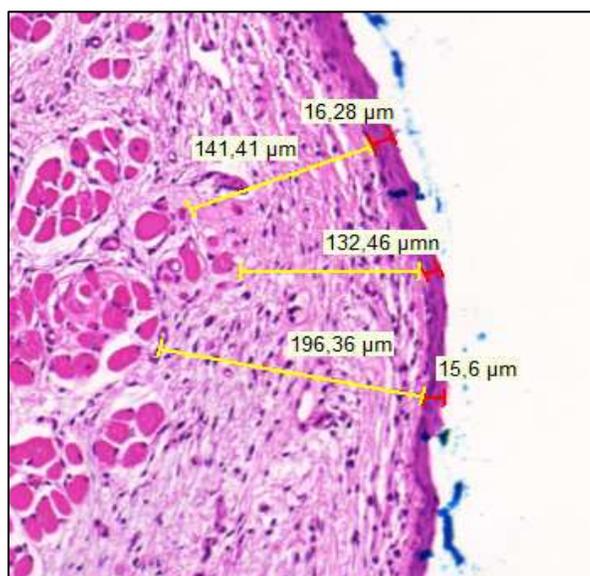


Figura 8 – lâmina do bordo livre de prega vocal corada com HE vista em aumento de 10X com as medidas de espessura epitelial (linhas vermelhas) e as medidas de espessura de LP (linhas amarelas). Em nanquim azul está a marcação do bordo livre da prega vocal.

3) Avaliação objetiva da concentração de colágeno e do processo inflamatório pela quantificação da densidade de núcleos celulares: Para avaliar áreas semelhantes em todas as laringes em ambas as pregas vocais foram selecionadas áreas a partir da linha perpendicular supracitada nas lâminas coradas com tricrômico de Masson. As áreas foram delimitadas com auxílio do *mouse* sobre uma moldura colada à tela do computador. Foram delimitadas até doze regiões (quadrados) com áreas variando entre $2600\mu\text{m}^2$ a $2900\mu\text{m}^2$, sendo seis superficiais, imediatamente abaixo da membrana basal do epitélio, e seis profundas, localizados entre os quadrados superficiais e o músculo vocal. Em cada região, superficial e profunda, três quadrados eram craniais à linha perpendicular e três caudais (Figura 9). As áreas demarcadas foram submetidas a mensuração objetiva da quantidade de colágeno e da quantidade de núcleos celulares através do programa Histoquant®. Este software faz a mensuração de áreas com base na identificação de cores após o estabelecimento de um padrão ou “máscara”, testada em um número significativo de áreas e definidas como aceitáveis (Figuras 10 e 11). Estes padrões foram estabelecidos com o auxílio de um patologista experiente e testadas em 10% das lâminas para verificação da confiabilidade da mensuração. O programa fez o cálculo da área demarcada e a sua relação em função da área total fornecendo assim a porcentagem de colágeno na área analisada. Para determinar a porcentagem de colágeno presente na LP de uma prega vocal realizou-se uma média das porcentagens encontradas em todas as áreas demarcadas para aquela prega vocal. Para determinar a porcentagem de células presentes e o que se chamou de “densidade celular”, estabeleceu-se um padrão para identificação dos núcleos celulares da mesma forma descrita previamente para o colágeno, a partir da identificação de cores. Uma média das porcentagens de núcleos celulares presentes em todas as áreas demarcadas em uma prega vocal definiu a densidade celular.

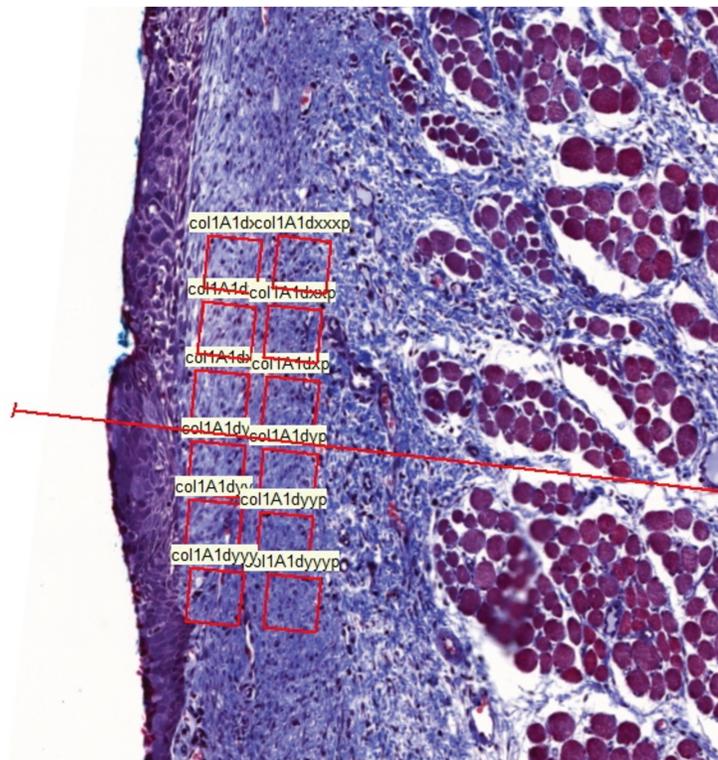


Figura 9 – corte coronal de prega vocal corada com tricrômico de Massom. A linha vermelha contínua demarca o ponto médio perpendicular ao ponto de convexidade máxima da prega vocal. Áreas quadradas em vermelho estão demarcadas acima e abaixo desta linha: seis áreas superficiais e seis áreas profundas. O código alfanumérico sobre cada quadrado identifica o lado, grupo de estudo e localização (superficial e profunda) na LP.

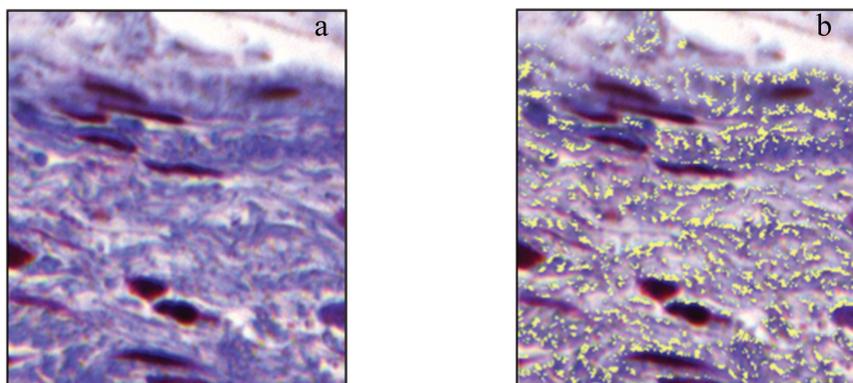


Figura 10 – quantificação de colágeno de uma das áreas demarcadas pelo programa Histoquant® após determinação de “padrão” considerado adequado: a) área demarcada ainda sem a quantificação e b) demarcação das áreas identificadas como colágeno em amarelo.

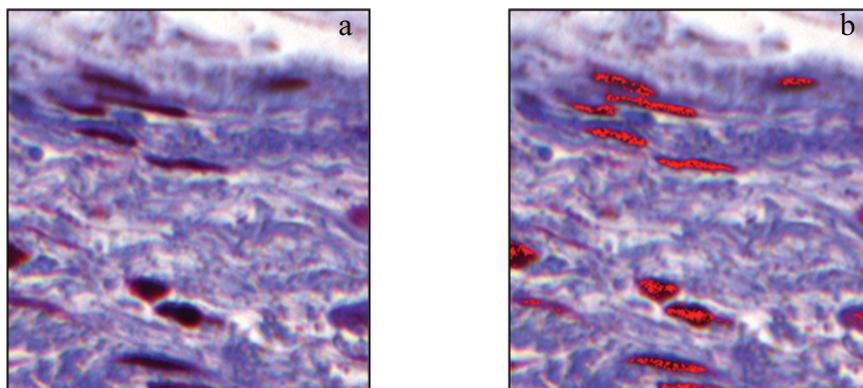


Figura 11 – quantificação de núcleos celulares pelo programa Histoquant® após determinação de “padrão” considerado adequado: a) área demarcada ainda sem a quantificação e b) com a quantificação em vermelho.

4) Avaliação subjetiva da densidade de células inflamatórias:

As lâminas digitalizadas foram analisadas subjetivamente, por um patologista que não tinha acesso aos objetivos dos experimentos realizados, com auxílio do programa de visualização Panoramic Viewer com aumento de até 100X. Foi realizada a contagem do número de células inflamatórias em cada uma das áreas demarcadas em cada prega vocal e calculada a média de células inflamatórias por prega vocal.

Avaliação dos resultados

Inicialmente, cada grupo ou técnica cirúrgica em cada tempo foi comparada com o grupo controle normal, animais não submetidos ao procedimento. Considerou-se neste estudo, que a melhor técnica seria aquela em que os resultados histológicos dos parâmetros estudados fossem mais semelhantes aos de uma prega vocal normal.

Em seguida, foram comparadas as pregas vocais submetidas a procedimentos diferentes nos mesmos animais. Compararam-se as pregas vocais direitas e esquerdas nos animais do grupo A e as pregas vocais direitas e esquerdas nos animais do grupo B. Depois, no mesmo tempo de avaliação, compararam-se as pregas vocais direitas do grupo A com as pregas vocais direitas do grupo B (em animais diferentes).

Avaliou-se ainda, para cada técnica, a evolução dos parâmetros nos três tempos estudados e fez se a comparação entre os grupos: pregas vocais submetidas a microflap apenas, pregas vocais submetidas a microflap com sutura e pregas vocais submetidas a microflap e cola de fibrina.

As concentrações de colágeno, medidas de espessura epitelial e LP e densidade celular foram consideradas variáveis contínuas e descritas pelos valores de média, desvio padrão, mediana, 1º e 3º quartis e valores mínimos e máximos para cada grupo: controle normal, microflap, microflap com cola de fibrina, microflap com sutura.

O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para avaliar a aderência dos dados à distribuição normal.

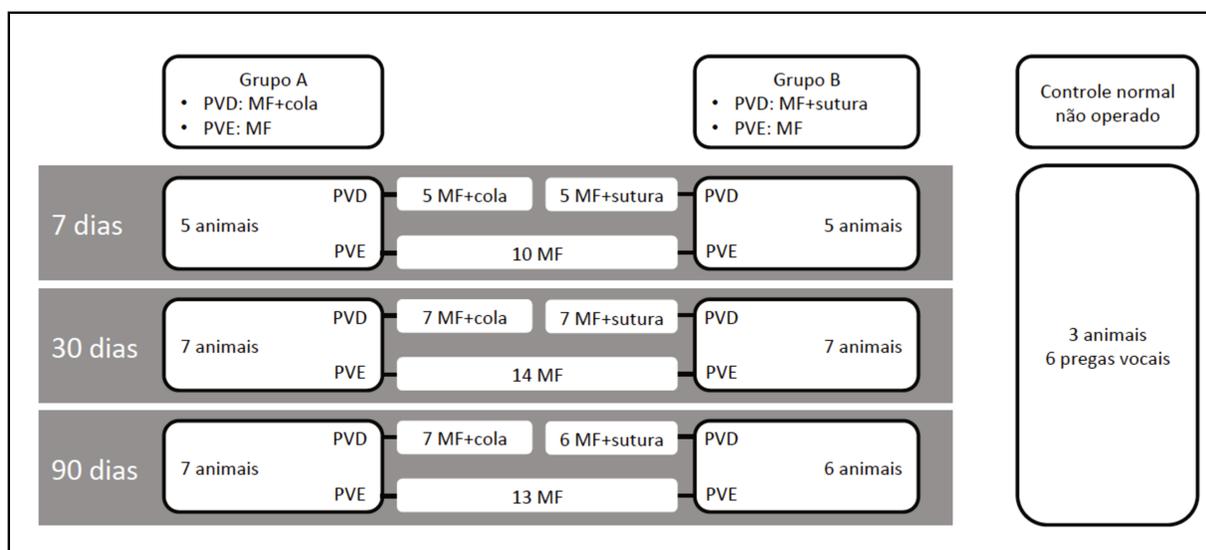
Para comparação dos grupos foram aplicados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Wilcoxon pareado para comparações de duas amostras independentes (pregas vocais em animais diferentes) e dependentes (pregas vocais nos mesmos animais), respectivamente. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações de três amostras independentes, seguido do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações dois a dois.

As análises foram realizadas com o software SAS (versão 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002-2003). Adotou-se o nível de 5% de significância estatística.

RESULTADOS

Ao longo do período de experimentação cinco animais foram a óbito na primeira semana de pós operatório em decorrência de possível complicação cirúrgica.

Após confecção dos blocos, cinco laringes foram desprezadas em razão da presença de artefatos que impediam a adequada avaliação das áreas operadas das pregas vocais. Assim foram excluídas duas laringes do grupo A correspondentes ao tempo de estudo de 7 dias e três laringes do grupo B sendo duas correspondentes ao tempo de estudo de 7 dias e uma laringe correspondente ao tempo de estudo de 90 dias. Desta forma, foram avaliadas 40 laringes distribuídas conforme a Figura 12.



MF= microflap; PVD= direita; PVE=esquerda

Figura 12 – distribuição das laringes nos grupos A e B para cada tempo de estudo e no grupo controle.

As áreas demarcadas para estudo da LP em cada prega vocal foram avaliadas separadamente, isto é, áreas superficiais e áreas profundas e, em sua totalidade, isto é, áreas superficiais somadas com às áreas profundas. A análise estatística, no entanto, revelou não haver diferença quando consideradas todas as áreas somadas ou as áreas superficiais e as profundas separadamente, de maneira consistente (Anexo 1). Optou-se portanto pela padronização do cálculo utilizando-se a soma de todas as áreas visto que o número de áreas profundas foi inconstante em decorrência da variação na espessura da LP.

Após verificação da distribuição não normal dos resultados resumiu-se os dados com os valores das medianas (percentil 50) e a distribuição dos 1º e 3º quartis que são menos afetados por valores extremos.

Quanto à concentração de colágeno

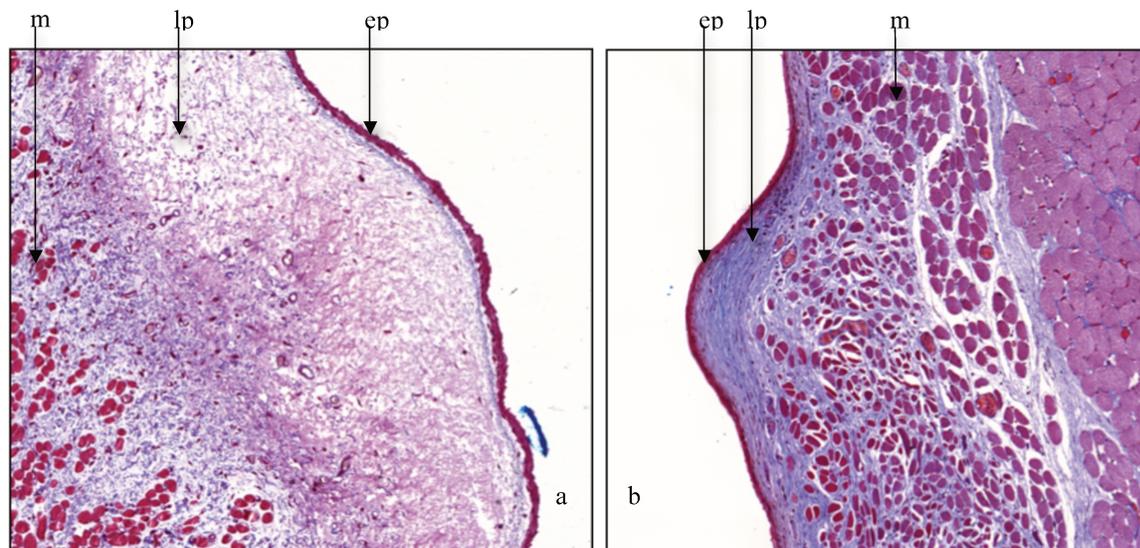
Utilizando-se o Teste de Mann-Whitney comparou-se a concentração de colágeno entre o grupo controle de pregas vocais normais e as três técnicas realizadas nos três diferentes tempos. Todas as técnicas: microflap isolado, microflap com uso de cola e microflap com uso de sutura apresentaram concentrações de colágeno significativamente mais elevadas do que o grupo controle nos três tempos estudados (Tabela 1). Um exemplo da nítida diferença observada pode ser vista na Figura 13. O grupo que apresentou concentração mais próxima do grupo controle foi a grupo submetido à confecção do microflap e sutura após 90 dias como pode ser observado na tabela 1 pelo valor da mediana. Apesar disso, a diferença entre este grupo e o grupo controle ainda foi estatisticamente significativa.

Tabela 1 – concentração de colágeno em cada uma das três técnicas, para os três tempos de seguimento e valor de “*p*” quando comparado cada técnica com o grupo controle de pregas vocais normais não operadas. Em negrito assinala-se o grupo cujos valores mais se aproximaram do grupo controle normal.

Técnica / tempo	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	<i>p</i> *
Controle	6	0,07	0,02	0,1	0,02	0,59	
MF+ cola 7 dias	5	9,37	6,99	10,66	3,92	26,52	0,0062
MF+cola 30 dias	7	5,54	2,29	16,62	0,34	20,96	0,0023
MF+cola 90 dias	7	6,59	3,07	8,57	0,94	9,3	0,0012
MF + sut 7 dias	5	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84	0,0043
MF + sut 30 dias	7	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44	0,0027
MF + sut 90 dias	6	9,8	5,48	10,97	2,53	18,3	0,0039
MF 7 dias	10	4,98	1,67	11,78	0,19	23,27	0,0012
MF 30 dias	14	9,09	3,98	14,87	0,82	18,26	<0,0001
MF 90 dias	13	2,44	1,01	4,35	0,48	7,78	<0,0001

MF= microflap; sut= sutura

*Teste de Mann-Whitney



m= camada muscular; lp= LP; ep= epitélio

Figura 13 – cortes coronais de pregas vocais coradas com tricrômico de Massom vistas em aumento de 10X: a) prega vocal controle, não operada; b) prega vocal submetida a microflap com uso de cola após 30 dias.

a) Concentração de colágeno no grupo de animais avaliados após 7 dias:

Não houve diferença estatisticamente significativa, através do teste de Wilcoxon pareado, na concentração de colágeno na LP entre as pregas vocais do grupo A..

Não houve diferença estatística na concentração de colágeno entre as pregas vocais do grupo B. Para esta avaliação foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado.

Quando comparadas as pregas vocais direitas dos grupos A e B (microflap com cola de fibrina e microflap com sutura) houve diferença estatisticamente significativa com $p = 0,0283$. Uma maior concentração de colágeno foi observada nas pregas vocais em que houve aplicação de cola de fibrina. Para estas comparações foi utilizado o teste Mann-Whitney (Tabela 2).

Tabela 2 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B, e análise comparativa entre as pregas vocais direitas do grupo A e B com os respectivos valores de “*p*” sete dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
A	MF + cola	5	9,37	6,99	10,66	3,92	26,52	0,8927*
	MF	5	11,78	5,11	16,47	4,84	23,27	
B	MF + sut	5	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84	0,5002*
	MF	5	1,67	1,25	2,61	0,19	6,37	
A X B	MF + cola	5	9,37	6,99	10,66	3,92	26,52	0,0283**
	MF + sut	5	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84	

*Teste de Wilcoxon pareado **Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura.

b) Concentração de colágeno no grupo de animais avaliados após 30 dias:

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na LP entre as pregas vocais do grupo A, nem entre as pregas vocais do grupo B. Para estas comparações foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado.

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na LP das pregas vocais quando comparadas as pregas vocais direitas dos grupos A e B. Observou-se, no entanto, uma maior concentração de colágeno no lado submetido a realização de microflap e sutura (grupo B). Esta comparação foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney (Tabela 3).

Tabela 3 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B, e análise comparativa entre as pregas vocais direitas dos grupos A e B com os respectivos valores de “*p*” trinta dias após os procedimentos.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	<i>p</i>
A	MF + cola	7	5,54	2,29	16,62	0,34	20,96	0,4990*
	MF	7	4,57	2,73	8,38	0,82	11,14	
B	MF + sut	7	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44	0,6121*
	MF	7	14,87	9,81	18,05	1,44	18,26	
AXB	MF + cola	7	5,54	2,29	16,62	0,34	20,96	0,0845**
	MF + sut	7	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44	

* Teste de Wilcoxon pareado ** Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura

c) Concentração de colágeno no grupo de animais avaliados após 90 dias:

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na LP das pregas vocais do grupo A. Observou-se, no entanto, maior concentração de colágeno no lado submetido a realização do microflap e aplicação da cola de fibrina.

Houve diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na LP das pregas vocais do grupo B sendo observada uma maior concentração de colágeno no lado submetido a realização da sutura ($p=0,0464$). Para estas comparações foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado.

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na LP entre as pregas vocais diretas dos grupos A e B ($p = 0,1531$). Para esta comparação foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A maior concentração de colágeno foi observada no grupo submetido a sutura (pregas vocais diretas do grupo B) como se pode observar na Tabela 4.

Tabela 4 – valores da concentração de colágeno (%), para os grupos A e B e análise comparativa entre as pregas vocais diretas dos grupos A e B com os respectivos valores de “ p ” 90 dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	p
A	MF + cola	7	6,59	3,07	8,57	0,94	9,3	0,0630*
	MF	7	4,35	1,98	6,62	0,61	7,78	
B	MF + sut	6	9,8	5,48	10,97	2,53	18,3	0,0464*
	MF	6	1,7	0,9	2,44	0,48	3,29	
A X B	MF + cola	7	6,59	3,07	8,57	0,94	9,3	0,1531**
	MF + sut	6	9,8	5,48	10,97	2,53	18,3	

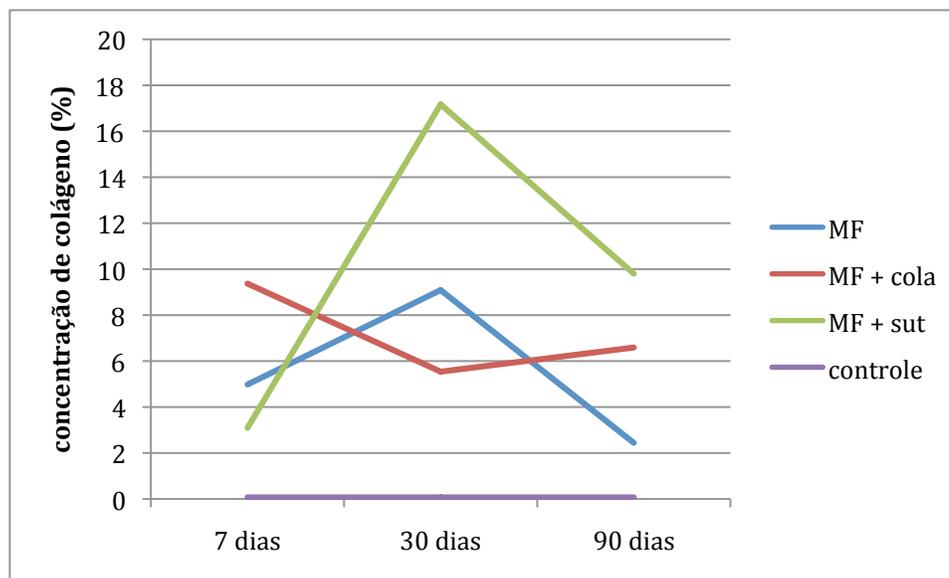
* Teste de Wilcoxon pareado **Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura

Quando se estudou a evolução da concentração de colágeno ao longo dos três tempos avaliados (Gráfico 1) constatou-se que nas pregas vocais submetidas a sutura houve aumento progressivo na concentração de colágeno com pico ocorrendo aos 30 dias e uma queda aos 90 dias. Este variação foi significativa ($p = 0,0053$). Para esta avaliação foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações dois a dois (Anexo 2).

Nas pregas vocais submetidas a microflap e cola de fibrina observou-se queda gradativa no aumento da concentração de colágeno inicialmente observada, no entanto, esta queda não foi estatisticamente significativa (Anexo 2).

Nas pregas vocais submetidas a confecção de microflap apenas observou-se aumento inicial na concentração de colágeno, com pico após 30 dias seguido de queda aos 90 dias. Esta variação foi estatisticamente significativa com $p = 0,0247$ (Anexo 2).



MF=microflap; sut=sutura

Gráfico 1 – evolução da concentração de colágeno (valor das medianas) na LP das pregas vocais ao longo do tempo conforme a técnica cirúrgica realizada e o grupo controle não operado. Variação estatisticamente significativa nos grupos submetidos a microflap com sutura ($p=0,0053$) e microflap ($p=0,0247$).

Quanto à espessura do epitélio

Quando comparada a espessura do epitélio nos animais do grupo A não houve diferença significativa em nenhum dos tempos observados entre as pregas vocais (Tabelas 5, 6 e 7).

Quando comparada a espessura do epitélio nos animais do grupo B observou-se diferença significativa após 7 dias com $p=0,0431$, sendo que o lado submetido a sutura apresentou espessamento epitelial maior (Tabela 5). Aos 30 e 90 dias esta diferença não foi significativa (Tabelas 6 e 7).

Quando comparadas as pregas vocais submetidas a microflap e sutura e microflap e aplicação de cola nos diferentes tempos não houve diferença significativa quanto à espessura epitelial (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B sete dias após os procedimentos. Em negrito os valores com significância estatística.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
A	MF + cola	5	50,69	35,95	59,84	31,99	116,96	0,3452*
	MF	5	32,09	17,87	52,52	12,02	55,52	
B	MF + sut	5	73,00	40,21	121,78	21,69	137,76	0,0431*
	MF	5	15,94	13,93	102,38	10,37	115,15	
A X B								0,4647**

* Teste de Wilcoxon pareado ** Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura

Tabela 6 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B trinta dias após os procedimentos.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
A	MF + cola	7	27,44	6,71	31,95	5,94	47,89	0,7353*
	MF	7	21,76	11,90	27,78	6,93	43,56	
B	MF + sut	7	21,71	17,47	34,06	14,53	307,81	0,1763*
	MF	7	18,10	12,04	39,60	9,40	49,61	
A X B								0,4062**

* Teste de Wilcoxon pareado ** Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura.

Tabela 7 – Comparação da espessura epitelial (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B 90 dias após os procedimentos.

Grupo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
A	MF + cola	7	16,42	10,12	81,56	4,53	114,35	0,7353*
	MF	7	13,34	10,17	27,71	7,52	206,36	
B	MF + sut	6	12,19	9,94	14,05	6,94	16,41	0,7532*
	MF	6	12,09	8,28	13,09	6,52	13,36	
A X B								0,1531**

* Teste de Wilcoxon pareado ** Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura

Quando observada a espessura do epitélio ao longo do tempo, observou-se uma redução na espessura epitelial inicial, no entanto, esta variação foi estatisticamente significativa somente no grupo submetido a microflap e sutura com $p = 0,0026$ (Gráfico 2 e Anexo 3).

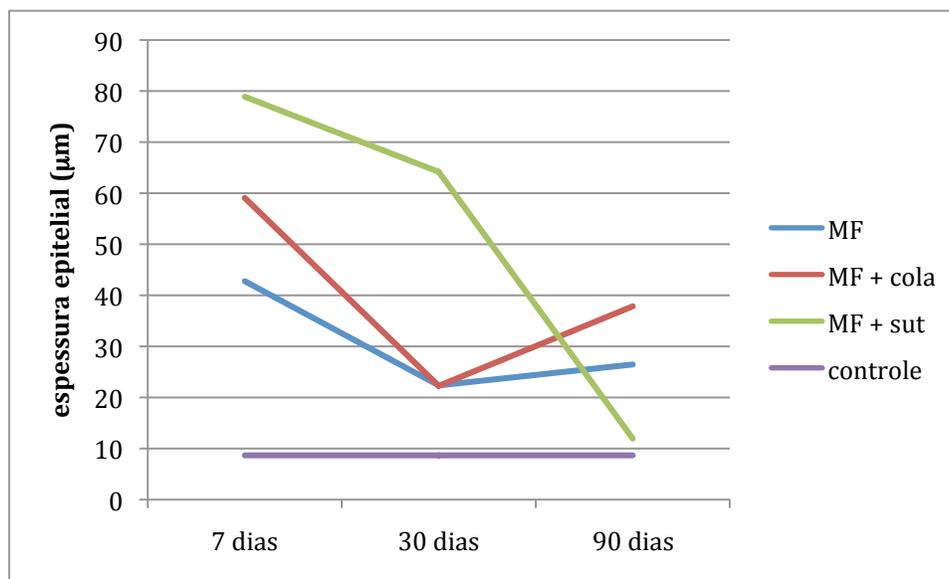
No grupo em que utilizou-se sutura observou-se após 90 dias valores de espessura de epitélio mais próximos dos observados nas pregas vocais normais do grupo controle, não apresentando diferença estatisticamente significativa do grupo controle normal (Tabela 8). O mesmo ocorreu com o grupo submetido ao uso de cola 30 dias após as intervenções. Todos os outros grupos apresentaram valores de espessura epitelial estatisticamente diferente do grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 – valores da espessura epitelial, em μm , para cada técnica e tempo estudados e os valores de “*p*” quando comparados aos controles normais. Em negrito os valores que mais se aproximaram do grupo controle normal.

Técnica	tempo (dias)	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	Valor p [§]
controle		6	8,22	8,12	9,62	7,95	9,94	-
MF + cola	7	5	50,69	35,95	59,84	31,99	116,96	0,0062
MF + cola	30	7	27,44	6,71	31,95	5,94	47,89	0,5677
MF + cola	90	7	16,42	10,12	81,56	4,53	114,35	0,0321
MF + sut	7	5	73	40,21	121,78	21,69	137,76	0,0062
MF + sut	30	7	21,71	17,47	34,06	14,53	307,81	0,0027
MF + sut	90	6	12,19	9,94	14,05	6,94	16,41	0,0782
MF	7	10	55,26	35,95	116,96	21,69	137,76	0,0001
MF	30	14	24,58	14,53	33,98	5,94	307,81	0,0392
MF	90	13	14,05	10,12	16,42	4,53	114,35	0,0226

§ Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura



MF=microflap; sut=sutura

Gráfico 2 – variação das medianas da espessura epitelial em cada uma das três técnicas para cada tempo de avaliação e sua comparação com o grupo controle não operado. Variação estatisticamente significativa observada apenas para o grupo submetido ao microflap e sutura.

Quanto à espessura da LP

Quando comparamos a espessura da LP após 7 dias, a espessura foi maior nas pregas vocais submetidas a microflap com cola de fibrina do que nas pregas vocais contralaterais no grupo A, e esta diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 9).

Quando comparadas as pregas vocais do grupo B não houve diferença estatisticamente significativa na espessura da LP em nenhum dos tempos observados (Tabela 9).

Quando comparadas as pregas vocais submetidas a aplicação de cola (grupo A) com as pregas vocais submetidas a sutura (grupo B) observou-se diferença estatisticamente significativa no tempo de 90 dias de pós operatório com menor espessura de LP observada na grupo submetido a sutura (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação da espessura da LP (em μm) entre as pregas vocais do grupo A, grupo B e entre as pregas vocais direitas do grupo A e B, 7, 30 e 90 dias após os procedimentos. Os valores estatisticamente significativos estão assinalados em negrito.

Grupo	Tempo	Técnica	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	p
A	7 dias	MF + cola	5	215,33	187,87	239,68	174,88	922,83	0,0431*
		MF	5	123,63	109,36	170,92	84,82	235,76	
B		MF + sut	5	282,05	158,73	451,99	114,40	517,35	0,2249*
		MF	5	187,47	169,25	203,29	92,16	278,00	
A X B		cola X sut		0,9168**					
A	30 dias	MF + cola	7	140,79	91,77	169,32	78,98	209,34	0,6121*
		MF	7	137,04	82,62	154,82	49,99	168,29	
B		MF + sut	7	184,38	89,82	277,61	83,09	308,63	0,4990*
		MF		150,29	121,30	220,74	108,62	248,39	
A X B		cola X sut		0,2774**					
A	90 dias	MF + cola	7	190,73	147,09	372,06	119,75	610,77	0,2367*
		MF	7	208,38	140,18	260,33	125,04	277,56	
B		MF + sut	6	88,22	71,87	104,85	61,85	164,91	0,1159*
		MF	6	143,96	100,29	190,25	67,97	197,92	
A X B		cola X sut		0,0101**					

*Teste de Wilcoxon pareado **Teste de Mann-Whitney

MF=microflap; sut=sutura

Quando comparamos a espessura da LP em cada tempo para cada técnica com os controles normais observamos que sete dias após as intervenções as três técnicas apresentaram valores semelhantes estatisticamente ao controle normal. No entanto após 30 e 90 dias observou-se uma redução na espessura da LP sendo que apenas o grupo submetido a microflap com cola de fibrina não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle normal. As outras duas técnicas apresentaram reduções estatisticamente significativas na espessura da LP (tabela 10) com valor de mediana menor para o grupo submetido à sutura.

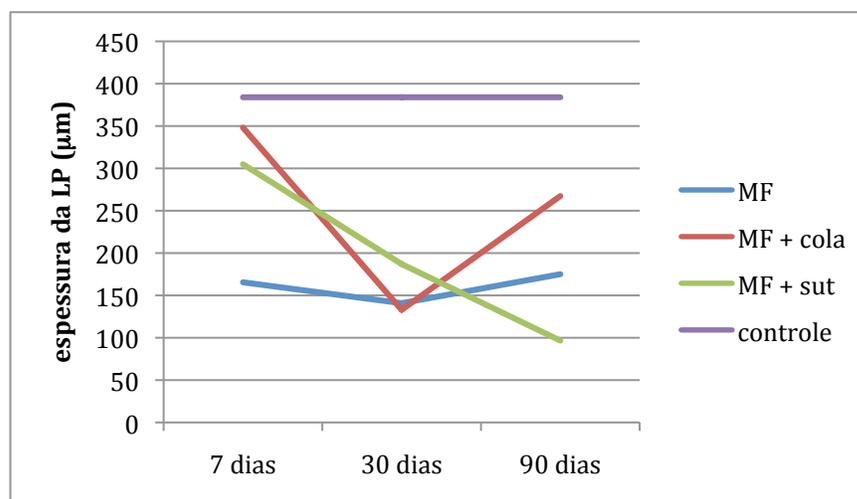
Tabela 10 – valores de espessura da LP (em μm) para cada técnica e tempo de estudo e os valores de “ p ” quando comparados ao grupo controle normal. Em negrito estão assinalados os grupos com maior similaridade com grupo controle.

Técnica	tempo (dias)	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	Valor p^{\S}
CONTROLE		6	346,61	342,05	450,86	337,28	480,6	-
MF + cola	7	5	215,33	187,87	239,68	174,88	922,83	0,1003
MF + cola	30	7	140,79	91,77	169,32	78,98	209,34	0,0027
MF + cola	90	7	190,73	147,09	372,06	119,75	610,77	0,1161
MF + sut	7	5	282,05	158,73	451,99	114,4	517,35	0,4652
MF + sut	30	7	184,38	89,82	277,61	83,09	308,63	0,0027
MF + sut	90	6	88,22	71,87	104,85	61,85	164,91	0,0039
MF	7	10	227,5	174,88	451,99	114,4	922,83	0,1585
MF	30	14	151,79	91,77	205,23	78,98	308,63	0,0001
MF	90	13	147,09	97,09	190,73	61,85	610,77	0,011

§ Teste de Mann-Whitney

MF = microflap; sut = sutura

Quanto à variação na espessura da LP ao longo do tempo de acordo com as três técnicas observou-se uma variação estatisticamente significativa nos grupos submetidos a cola e sutura com valores de p de 0,0264 e 0,0271 respectivamente (Gráfico 3 e Anexo 4).



MF=microflap; sut=sutura

Gráfico 3 – Variação dos valores das medianas da espessura da LP ao longo dos três tempos estudados para cada técnica realizada. Variação significativa nos grupo submetido a microflap com cola ($p=0,0264$) e no grupo submetido a microflap com sutura ($p=0,0271$).

Quanto a densidade de células inflamatórias: análise objetiva

A celularidade observada em toda as lâminas foi de infiltrado inflamatório essencialmente constituído por células linfomononucleares. Além de variados graus de células inflamatórias observou-se fibroblastos e células fibroblasto-like. Na verificação da confiabilidade das marcações do programa computadorizado, verificou-se que, em decorrência da similaridade da cor dos núcleos celulares, fibroblastos também foram contabilizados como células inflamatórias. Por este motivo abandonou-se este método. Os valores obtidos, no entanto, podem ser observados no Anexo 5.

Quanto a densidade celular: análise subjetiva

Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre as pregas vocais do grupos A e nem entre as pregas vocais do grupo B com relação à quantidade de células linfomononucleares presentes na LP, em nenhum dos tempos estudados (Anexo 6).

Quando comparada a densidade celular em cada tempo para cada técnica com o grupo controle observou-se que, apenas nos grupos submetidos à confecção do microflap com cola após 30 dias, e no grupo submetido à confecção do microflap com sutura após 90 dias não houve diferença estatisticamente significativa. Para todos os outros grupos houve um aumento significativo no número de células inflamatórias observadas na LP (Tabela 11).

Tabela 11 – Número de células inflamatórias encontradas na LP de cada grupo, em cada tempo estudado e sua comparação com o grupo controle, não operado. Em negrito estão assinalados os grupos com valores mais semelhantes ao grupo controle normal.

Técnica	tempo (dias)	n	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	Valor <i>p</i> §
CONTROLE		6	7	1	11	0	12	-
MF	7	10	23	19	30	1	43	0,0056
MF	30	14	27	19	38	5	112	0,0017
MF	90	13	22	11	37	1	50	0,002
MF + COLA	7	5	49	39	80	16	121	0,0062
MF + COLA	30	7	18	6	31	6	48	0,0721
MF+ COLA	90	7	30	15	37	12	106	0,0034
MF + SUT	7	5	38	26	39	21	62	0,0062
MF + SUT	30	7	19	14	45	8	84	0,0081
MF + SUT	90	6	15	5	18	3	19	0,1093

* Teste de Mann-Whitney

MF = microflap; sut = sutura

DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro realizado para a comparação da cicatriz com grupo controle utilizando tanto a cola de fibrina quanto a sutura. Diferentemente de trabalhos anteriores, o método para produção da cicatriz buscou simular uma técnica consagrada na microcirurgia das pregas vocais para remoção de processos benignos. A literatura mais recente tem demonstrado crescente interesse na simulação de processos cicatriciais focados na LP, que não ocasionem lesão às camadas mais profundas das pregas vocais, mais semelhantes àqueles que ocorrem em humanos (82,83). Busca-se compreender e encontrar medidas preventivas e aprimoramentos de técnica cirúrgica para evitar a formação de cicatriz nas pregas vocais. O ambiente controlado dos trabalhos experimentais é ideal para o embasamento de impressões clínicas, possibilitando o estudo histológico impossível no caso das microfonocirurgias de laringe, embora a transposição dos resultados seja limitada.

Existem atualmente inúmeras proposições de tratamento para as cicatrizes ou aderências na LP das pregas vocais. Nenhuma surgiu, até o momento, com resultados sistematicamente reprodutíveis e eficazes com relação a qualidade vocal (7). Isto também se deve à dificuldade de estudar o processo cicatricial das pregas vocais e o tratamento dos distúrbios da LP em humanos. Hirano *et al.*, em 2009 (50) descreveram a grande heterogeneidade das lesões cicatriciais observadas nas pregas vocais, em decorrência da variabilidade individual de resposta à injúria e, principalmente, a dificuldade de estabelecer um padrão de lesão e controlar os tempos de cicatrização neste tipo de estudo. Benninger *et al.*, em 1996 (5), com sua revisão sobre as cicatrizes das pregas vocais, impulsionaram os estudos em ciências básica e experimental. Os modelos animais são uma ótima oportunidade de estudar sistematicamente a prevenção e o tratamento da formação de cicatrizes nas pregas vocais pelo melhor entendimento do processo cicatricial. Nenhum modelo animal até o momento foi apontado como sendo o ideal. A seleção do animal utilizado nestes estudos depende das questões a serem respondidas, de suas características anatômicas como tamanho, propriedades biomecânicas e o próprio uso da laringe na vocalização do animal. A escolha do animal deve se basear ainda, em condições práticas como disponibilidade, custo do animal e de sua manutenção, além da disponibilidade de material e tecnologia para execução de técnicas cirúrgicas. O uso de roedores maiores, mais recentemente de coelhos, tem como atrativo dimensões laríngeas maiores do que ratos e camundongos e, ainda, com custo relativamente baixo. Em especial a partir de 2002, com o grupo da Universidade de Wisconsin (22) e seus estudos caracterizando o processo cicatricial

agudo e crônico em coelhos, este animal vem sendo amplamente utilizado, inclusive no âmbito nacional (81,84,85). A disponibilidade de *primers* e anticorpos de coelhos para estudos em biologia molecular se tornou um atrativo, mesmo para grupos que já experimentaram com roedores menores (2). Nos últimos anos verificou-se, também, mudança nas técnicas utilizadas para produção de cicatrizes nas pregas vocais. Inúmeros autores estabeleceram um modelo experimental com uso de biópsias ou decorticações das pregas vocais para formação de cicatriz. Este tipo de procedimento, altamente eficaz na produção de cicatriz, pouco simula a situação verdadeira das cicatrizes nas pregas vocais, que são geralmente lesões pequenas provocadas por procedimentos cirúrgicos refinados nas microfonocirurgias. Recentemente percebe-se uma preocupação em simular as técnicas fonocirúrgicas, mesmo nos modelos experimentais (2).

No presente estudo, após tentativa de exposição trans-oral das pregas vocais por laringoscópio de suspensão, concluiu-se que a realização de sutura por esta via seria tecnicamente muito difícil e aumentaria o tempo cirúrgico com risco de óbito do animal. Optou-se, portanto, por acesso externo, via cervicotomia e laringofissura. A laringofissura permitiu acesso rápido às pregas vocais. Acreditamos que a dificuldade técnica de realizar sutura por via endoscópica em um animal de dimensões tão pequenas poderia tornar-se um procedimento com grande variabilidade de execução. Este fato poderia introduzir um viés de reprodutibilidade no experimento.

Hertegard *et al.*, em 2006 (53) descreveram a prega vocal normal de seu grupo controle de coelhos como sendo constituída de LP bastante amorfa, sem aglomerados longitudinais de fibras colágenas. Descreveram, ainda, as medidas da LP como variando entre 200 e 250 μ m. O grupo controle do atual estudo apresentou espessura de LP de pregas vocais relativamente maior variando entre 337,28 e 480,59 μ m. Acreditamos que esta variação possa ser normal nestes animais, reforçando a importância em estudos animais da presença de grupo controle de referência.

Por orientação do Departamento de Anatomia Patológica da FCM da UNICAMP optou-se pela coloração tricrômico de Masson. Entre os profissionais deste departamento existe grande familiaridade com esta coloração no estudo de processos cicatriciais e em particular no estudo de fibras colágenas. O escaneamento das lâminas de histologia tornou o processo de análise e documentação extremamente prático e sua análise menos subjetiva, com imagens acessíveis e bem visualizadas por todos na tela do computador.

A fibrose, resultado do processo cicatricial, decorre do aumento da deposição de colágeno. Nas pregas vocais normais de coelhos, neste estudo e em concordância com outras descrições (53), a

concentração de colágeno foi baixa (média de 0,15%), compatível com a avaliação subjetiva dos cortes histológicos destas pregas vocais. Todas as três técnicas cirúrgicas levaram a aumento na deposição de colágeno na LP em todos os tempos cirúrgicos. Este resultado é discordante dos achados de Thibeault *et al.* (22). Estes autores realizaram, sob laringoscopia direta, biópsias unilaterais em pregas vocais de 11 coelhos. Analisaram histologicamente os espécimes com a coloração tricrômio de Masson, 60 dias após as intervenções. Avaliaram ainda a presença de elastina com coloração de Van Gieson e pró colágeno com imunohistoquímica. Suas análises avaliaram fotografias das lâminas com software que capturava a quantidade de corante por área em toda a LP. Dez amostras de imagens não sobrepostas foram avaliadas para cada animal e a média da concentração de colágeno foi obtida. Estes autores concluíram que após 60 dias a concentração de colágeno na LP das pregas vocais de coelhos estava significativamente reduzida em comparação com o lado contralateral normal. O pró colágeno encontrava-se significativamente aumentado no lado operado. Hertegard *et al.* (53), por outro lado, em seu estudo com seis coelhos, avaliaram a concentração de colágeno presente na prega vocal de animais submetidos a biópsias de pregas vocais quando comparadas a um grupo controle normal e a outro grupo tratado com injeção de células tronco mesenquimais. A concentração de colágeno foi determinada por estes autores utilizando anticorpos monoclonais de camundongos para colágeno tipo I. Estes autores, após quatro semanas, relataram resultados semelhantes aos do atual trabalho, ou seja, um aumento na concentração do colágeno nas pregas vocais com cicatrizes comparadas ao grupo de pregas vocais normais. Estudos semelhantes em cães e ratos apresentam relatos diferentes. Em cães há relatos de níveis inalterados de colágeno 60 dias após intervenções e níveis aumentados em seis meses (52), enquanto que, em ratos, os níveis de colágeno encontram-se elevados em 60 e 90 dias (86). Acredita-se que estas discrepâncias ocorram pela variação metodológica dos estudos e também pelo número restrito das amostras. Rousseau *et al.*, 2004 (59), encontraram em seis meses o que ocorreu em menor tempo no atual estudo. Talvez o estágio crônico de cicatriz na LP de coelhos seja mais precoce. A presença de depósitos densos e/ou desorganizados de colágeno tem sido estabelecida como marco de cicatrizes crônicas ou maduras. O tempo que cada animal leva para atingir esta maturação também varia de espécie para espécie. Em humanos, Kishimoto *et al.* (87) definiram este tempo em aproximadamente seis meses. Rousseau *et al.* (52) descreveram este mesmo tempo aproximado para maturação cicatricial em cães e coelhos, enquanto que Tateya *et al.* (86) definiram o tempo de dois meses para ratos e Yamashita *et al.* (58) de quatro a seis semanas para camundongos. De acordo com

a literatura, neste estudo, os achados vistos três meses após a injúria cirúrgica não corresponderiam, portanto a uma cicatriz madura ou crônica. No entanto, o presente estudo não avaliou a organização da deposição do colágeno para caracterizar o grau de maturidade da cicatriz. Talvez esta seja uma análise a ser perseguida no futuro. Ao se avaliar a LP neste estudo, apenas um dos elementos da matriz extracelular foi estudado, a deposição de colágeno.

Não seria possível, no momento atual, com base na literatura disponível, estabelecer relação temporal da deposição de colágeno no processo cicatricial das pregas vocais nestes animais. No atual estudo, ao final dos 90 dias, observou-se que o grupo com menor deposição de colágeno foi aquele submetido apenas a realização do microflap, seguido pelo grupo submetido à aplicação da cola. O grupo com maior deposição de colágeno foi aquele submetido à sutura do microflap. Outros autores brasileiros já reportaram resultados semelhantes com o uso da cola de fibrina em microcirurgia, ou seja, maior deposição de colágeno relacionado ao uso da cola de fibrina (81,82). Estes estudos, no entanto, não reportaram os níveis de colágeno em grupo controle, não operado.

No primeiro tempo avaliado neste estudo, após sete dias do procedimento, quando comparadas pregas vocais nos mesmos animais, a variação das técnicas não determinou variação na deposição de colágeno. No entanto, quando comparadas apenas as pregas vocais submetidas à realização da sutura ou ao uso da cola, verificou-se deposição de colágeno significativamente maior nas pregas vocais submetidas ao uso de cola de fibrina. Apesar de clinicamente alguns autores relatarem o uso rotineiro de cola em microfonocirurgia com bons resultados (80,88) esta utilização continua empírica. Okamura *et al.*, já em 1987 (16) relataram, em estudo em cães uma proliferação de fibras colágenas na LP das pregas vocais submetidas a elevação de microflap com uso de cola de fibrina. Esta avaliação foi subjetiva. Não há relato do tamanho da amostra nem do tempo de seguimento avaliado. Scapini *et al.*, em 2010 (81), em estudo comparativo da aplicação de cola de fibrina em pregas vocais enxertadas com fâscia, relataram maior deposição de colágeno na pregas vocais enxertadas em que foi aplicada cola de fibrina após 90 dias do procedimento mas não na primeira semana. Relataram, ainda, redução progressiva na deposição de colágeno nas pregas vocais submetidas ao microflap e enxertia de fâscia sem cola. O mesmo ocorreu no presente estudo, no grupo de pregas vocais submetidas apenas à confecção do microflap sem uso de cola de fibrina ou de sutura. No presente estudo, o grupo em que foi utilizado cola de fibrina apresentou redução progressiva na deposição de colágeno, diferente do estudo de Scapini *et al.* (81), talvez uma evidência dos efeitos da presença do enxerto de fâscia que estes autores realizaram. Neste estudo,

após 90 dias, o grupo submetido à realização de sutura do microflap apresentou maior deposição de colágeno quando comparado com a realização do microflap apenas, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Recentemente, em 2012, Portes *et al.* (82) em estudo experimental com seis suínos, compararam os efeitos da cola de fibrina quando aplicada em microflap com a confecção isolada do microflap após três meses. Estes autores descreveram aumento significativo na concentração de colágeno nas pregas vocais submetidas ao uso da cola de fibrina quando comparada às pregas vocais submetidas apenas ao microflap. Nesta amostra, apesar do aumento na concentração de colágeno nas pregas vocais submetidas ao uso da cola em comparação com as pregas vocais contralaterais, esta diferença não foi significativa.

No atual estudo, o grupo de pregas vocais submetidas à confecção de microflap apresentou redução estatisticamente significativa na deposição de colágeno ao longo do tempo. Apenas o grupo submetido à sutura do microflap apresentou deposição crescente de colágeno. As avaliações temporais neste estudo, no entanto, são limitadas, visto que foram avaliadas pregas vocais em animais diferentes. Apesar do uso disseminado de suturas em microfonocirurgia, não há estudos experimentais que comprovem o processo cicatricial resultante desta técnica. Os resultados do atual estudo diferem daqueles encontrados por Fleming *et al.* em 2001 (18), o único trabalho experimental comparando o processo cicatricial em pregas vocais submetidas a microflap seguido ou não de sutura. Este foi realizado em quatro cães e o tempo de avaliação variou de 39 a 49 dias. Os autores descreveram, em três dos quatro cães, área cicatricial 75% maior no lado em que o microflap não foi suturado. O método de avaliação foi subjetivo segundo descrição às cegas de um patologista que definia o que seria considerado área cicatricial. A coloração utilizada foi o tricrômico de Massom.

Da mesma forma que a cola, o uso de suturas em microfonocirurgia tem sido empírico, sem qualquer evidência que corrobore o seu uso, exceto os relatos clínicos (14,62,63). Por um lado, a confecção de microsuturas em microfonocirurgia não é tecnicamente simples. O cirurgião entusiasta desta técnica possivelmente possui habilidades, tanto para a confecção da sutura quanto para a execução da microfonocirurgia em si, e talvez, isto por si só justifique seus bons resultados.

Duprat *et al.*, em 2004 (20), estudando as alterações teciduais provocadas pela confecção de microflap, comparada com a confecção de microflap e enxertia de gordura não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas e descreveram fibrose ou fibrinogênese ausente ou leve nos dois grupos. Sugeriram, ainda, que a fibrinogênese seria decorrente da própria manipulação cirúrgica e não da presença do enxerto de gordura. No presente estudo, o fato de não

haver diferenças estatisticamente significativas quando analisando pregas vocais contralaterais após sete e 30 dias, mostra concordância com estes autores. No entanto, com 90 dias no atual estudo, o grupo submetido a sutura mostrou aumento significativo da fibrinogênese, quando comparado com as pregas vocais contralaterais, submetidas apenas à confecção do microflap.

Quando se observou a espessura epitelial verificou-se que houve diferença significativa entre as técnicas no grupo B (microflap versus microflap com sutura) avaliado após sete dias. O grupo submetido à sutura apresentou ao longo do tempo diminuição significativa da espessura epitelial. Ao final de 90 dias a espessura epitelial deste grupo foi a que mais se aproximou do grupo controle. Suehiro *et al.* (2), seu recente estudo com coelhos, não relataram diferença significativa na espessura epitelial entre pregas vocais submetidas a confecção de microflap e pregas vocais controles, descrevendo espessura epitelial de 13.84 μ m e 12.37 μ m, respectivamente. Estes autores realizaram microcirurgias por via endolaríngea em 10 animais e as avaliações histológicas foram realizadas duas semanas após os procedimentos. No presente estudo, quando comparadas as espessuras do epitélio nas pregas vocais submetidas apenas à confecção do microflap com as pregas vocais controles, houve diferença significativa, tanto na fase mais aguda de sete dias quanto aos 90 dias.

Observou-se redução da espessura da LP que foi estatisticamente significativa, no grupo submetido ao fechamento do microflap com sutura, quando comparada ao grupo submetido ao uso da cola. Na evolução ao longo do tempo, as três técnicas apresentaram redução da espessura da LP. Esta variação foi significativa apenas nos grupos que utilizaram cola ou sutura. A comparação presente da espessura da LP em cada técnica com o controle normal na fase aguda, de sete dias, todas as técnicas mostraram valores próximos dos normais (sem diferença estatisticamente significativa). No entanto, com o passar do tempo, apenas a técnica com utilização de cola manteve-se assim. Inferiu-se, então, que, dentre as três técnicas, neste modelo experimental, o uso da cola promoveu uma menor retração da LP. Hertegard *et al.*, 2006 (53) em estudo com 15 coelhos submeteram 22 pregas vocais a lesões do tipo biópsias de pregas vocais. Metade das pregas vocais foram tratadas com injeções de ácido hialurônico e a outra metade com injeção de solução salina, oito semanas após as biópsias. Oito pregas vocais foram usadas como controle. Onze semanas após as injeções, as pregas vocais foram coradas com HE e van Gieson, onde foi observado espessamento da LP nas pregas vocais lesadas, quando comparadas com as do grupo controle, independente da injeção de ácido hialurônico. Estes resultados divergem do atual estudo. As lesões provocadas, no entanto,

foram bastante diferentes assim como o tempo de análise. Acredita-se que o número das amostras, tanto do atual estudo quanto dos estudos existentes na literatura, assim como a grande heterogeneidade dos grupos, que pode ser vista na observação dos valores mínimos e máximos, seja fator limitante para análises comparativas entre os estudos. Thibeault et al., em 2002 (22), em estudo com coelhos submetidos à biópsias de pregas vocais observaram grande variabilidade na espessura de LP mas não mensuraram objetivamente este parâmetro. Quanto à densidade celular, observou-se aumento significativo na celularidade da LP em todas as técnicas quando comparadas com o controle normal, exceto no grupo submetido ao uso de cola após 30 dias e no grupo submetido a sutura após 90 dias. A comparação entre as técnicas não mostrou diferença.

Suehiro *et al.* (2) através de estudo imunohistoquímico, demonstraram não haver diferenças significativas na expressão de marcadores de reação inflamatória recente, quando realizaram microflap por via endolaríngea na prega vocal de coelhos. Avaliaram a expressão de CD45 positivo nas células inflamatórias das pregas vocais de coelhos submetidas a confecção de microflap quando comparadas com controles normais. Utilizando técnica do PCR (*polymerase chain reaction*) também não encontraram diferenças significativas na expressão genética dos agentes pró fibrinóticos, interleucina-1b, fator de crescimento b-1 e ciclo-oxigenase-2, entre estes mesmos grupos. Concluíram não haver diferenças entre os grupos quanto à resposta inflamatória aguda, que neste caso foi de duas semanas. Resultados similares foram encontrados por Duprat *et al.* (20), em uma semana, três semanas e três meses após confecção de microflap e microflap com enxerto de gordura na avaliação subjetiva da intensidade da reação inflamatória destes grupos. No presente estudo também não se encontraram diferenças significativas na presença de infiltrado inflamatório entre as técnicas. Possivelmente a reação inflamatória seja resultado da manipulação cirúrgica e da resposta individual de cada animal e não de pequenas variações na técnica operatória. A atual amostra não encontrou, nos mesmos animais, diferença entre as técnicas quanto ao infiltrado inflamatório. Também não foi possível traçar um paralelo entre a reação inflamatória e a presença de fibrose ou deposição de colágeno, visto que os grupos que não apresentaram diferença significativa do grupo controle quanto à infiltração inflamatória revelaram níveis significativamente elevados de colágeno, quando comparadas ao grupo controle.

A migração de células inflamatórias tem sido descrita como a primeira alteração aguda ou imediata em resposta à injúria das pregas vocais (57). Ling *et al.* (57), em seu estudo do processo cicatricial em ratos após decorticação de pregas vocais observaram cinco dias após as intervenções

um pico no afluxo de células inflamatórias. Descreveram o afluxo de células epiteliais, neutrófilo *like* e fibroblasto *like*. O presente estudo esteve em concordância com estes achados, visto que, independente da técnica, maior número de células inflamatórias linfomononucleares foi sempre observado no primeiro tempo analisado, de sete dias. Não se observou neste material a presença de outras células inflamatórias polimorfonucleares. Isto pode ser atribuído ao fato de a primeira avaliação ter ocorrido já sete dias após a intervenção. Tateya *et al.*, em 2005 (86), já observaram que a progressão temporal de cicatrização dos tecidos e remodelamento da matriz extracelular difere muito entre roedores e animais maiores.

A diminuição da espessura da LP presente em todos os tempos e em todas as técnicas cirúrgicas está em concordância com a descrição de Lawrence em 1998 (89) que relatou que a contração tecidual ocorre já desde os primeiros quatro e cinco dias após a injúria. No presente estudo foi observado que, ao final de todos os tempos estudados, houve redução na espessura da LP, possivelmente traduzindo a retração cicatricial que foi mais intensa no final dos 90 dias no grupo submetido a sutura. Branski *et al.* em 2005 (15) afirmaram que os pontos finais do processo cicatricial seriam a reepitelização e o reestabelecimento de um tecido funcional. A reepitelização em coelhos e roedores menores ocorre muito precocemente. No presente estudo, mesmo após sete dias, nenhum dos animais apresentou qualquer descontinuidade epitelial. Pelo contrário, espessamento epitelial foi observado em todos os grupos, para todos os tempos estudados. O estabelecimento de um tecido funcional não pôde ser definido neste estudo pois a função fonatória não foi explorada.

Como os parâmetros escolhidos para avaliar o processo cicatricial foram parâmetros histológicos, no atual estudo partiu-se do princípio que o melhor resultado seria aquele em que histologicamente a prega vocal estivesse mais semelhante à prega vocal normal, não operada. O pior resultado cicatricial, sob o aspecto histológico, aos 90 dias foi aquele ocorrido com a sutura do microflap: menor espessura da LP apesar da maior concentração de colágeno. Possivelmente, houve também importante redução na concentração de outros elementos da LP, contribuindo para esta suposta retração da LP. Outros autores ao estudarem outros componentes da LP no processo cicatricial descreveram redução na quantidade de elastina, decorina e fibromodulina após dois meses em coelhos. Em coelhos existem relatos ainda de aumento apenas nos níveis da fibronectina após dois meses, enquanto que o ácido hialurônico mantém níveis de concentração estáveis neste mesmo período (41,60).

A variabilidade dos parâmetros histológicos estudados não permitiu identificar vantagens do uso da cola de fibrina ou de sutura em relação à cicatrização por segunda intenção do microflap.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste estudo, as técnicas de microflap com cicatrização por segunda intenção, microflap com cola de fibrina e microflap com sutura determinaram maior concentração de colágeno na lâmina própria quando comparadas às pregas vocais normais. O grupo que cicatrizou por segunda intenção apresentou concentração de colágeno mais próxima do normal 90 dias após as intervenções.

As três técnicas cirúrgicas determinaram aumento na celularidade da lâmina própria exceto o grupo submetido à confecção do microflap e cola após 30 dias e o grupo submetido à confecção do microflap e sutura após 90 dias.

Nas três técnicas cirúrgicas a espessura do epitélio foi maior do que no grupo controle exceto no grupo submetido à microflap com sutura que após 90 dias apresentou espessura epitelial semelhante às pregas vocais normais.

A espessura da lâmina própria permaneceu inalterada nas três técnicas sete dias após os procedimentos, no entanto, após 90 dias o grupo que cicatrizou por segunda intenção e o grupo submetido ao microflap com sutura apresentou contração da lâmina própria. O grupo submetido à confecção do microflap e uso de cola de fibrina manteve espessura epitelial inalterada após 90 dias.

A ampla variabilidade dos resultados não permitiu identificar vantagens da utilização de sutura ou cola em comparação à cicatrização do microflap por segunda intenção, considerando a semelhança com os parâmetros histológicos de pregas vocais normais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Courey MS, Gardner GM, Stone RE, Ossoff RH. Endoscopic vocal fold microflap: a three-year experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995 Apr. 1;104(4 Pt 1):267–73.
2. Suehiro A, Bock JM, Hall JE, Garrett CG, Rousseau B. Feasibility and acute healing of vocal fold microflap incisions in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2012 Mar. 1;122(3):600–5.
3. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otologia (Fukuoka)*. 1975 Mar. 28;21:239–442.
4. Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Danillof R, editor. *Speech science: recent advances*. San Diego: San Diego: College-Hill Press; 1985. p. 1–46.
5. Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, et al. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1996 Nov. 1;115(5):474–82.
6. Rosen CA. Vocal fold scar: evaluation and treatment. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000 Oct. 1;33(5):1081–6.
7. Welham NV, Choi SH, Dailey SH, Ford CN, Jiang JJ, Bless DM. Prospective multi-arm evaluation of surgical treatments for vocal fold scar and pathologic sulcus vocalis. *Laryngoscope*. 2011 Jun. 1;121(6):1252–60.
8. Allen J. Cause of vocal fold scar. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Dec. 1;18(6):475–80.
9. Mortensen M. Laryngeal steroid injection for vocal fold scar. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Dec. 1;18(6):487–91.
10. Leden von H. The history of phonosurgery. CN F, DM B, editors. *Phonosurgery: assessment and surgical management of voice disorders*. New York: Raven Press; 1991. p. 3–24.
11. Bouchayer M, Cornut G. Microsurgical treatment of benign vocal fold lesions: indications, technique, results. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1992;44(3-4):155–84.
12. Sataloff RT, Spiegel JR, Heuer RJ, Baroody MM, Emerich KA, Hawkshaw MJ, et al. Laryngeal mini-microflap: a new technique and reassessment of the microflap saga. *J Voice*. 1995 Jun. 1;9(2):198–204.
13. Dailey S. Diagnostic and therapeutic pitfalls in phonosurgery. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006 Feb. 1;39(1):11–22.

14. Woo P, Casper J, Griffin B, Colton R, Brewer D. Endoscopic microsuture repair of vocal fold defects. *J Voice*. 1995 Sep. 1;9(3):332–9.
15. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(1 Pt 1):19–24.
16. Okamura H, Yumoto E, Okamoto K. Wound healing of canine vocal folds after phonosurgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1987;96(4):425–8.
17. Remacle M, Lawson G, Watelet JB. Carbon dioxide laser microsurgery of benign vocal fold lesions: indications, techniques, and results in 251 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999 Feb. 1;108(2):156–64.
18. Fleming DJ, McGuff S, Simpson CB. Comparison of microflap healing outcomes with traditional and microsuturing techniques: initial results in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001 Aug. 1;110(8):707–12.
19. Siedentop KH, Harris DM, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. *Laryngoscope*. 1985 Sep. 1;95(9 Pt 1):1074–6.
20. Duprat A de C, Costa HO, Lancelotti C, Ribeiro de Almeida R, Caron R. Histologic behavior of the inflammatory process in autologous fat implantation in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004 Aug. 1;113(8):636–40.
21. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr*. Basel; 1974 Mar. 28;:89–94.
22. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice*. 2002 Mar. 1;16(1):96–104.
23. Leden von H. Plastic surgery of the larynx. *Rev Panam Otorrinolaringol Broncoesofagol*. 1963 Mar. 29;1:7–11.
24. Leden von H. Surgery for the improvement of vocal function. *Rev Panam Otorrinolaringol Broncoesofagol*. 1969 Mar. 29;3:137–43.
25. Courey MS, Garrett CG, Ossoff RH. Medial microflap for excision of benign vocal fold lesions. *Laryngoscope*. 1997 Mar. 1;107(3):340–4.
26. Ford CN. Advances and refinements in phonosurgery. *Laryngoscope*. 1999 Dec. 1;109(12):1891–900.
27. Zeitels SM, Hillman RE, Bunting GW, Vaughn T. Reinke's edema: phonatory mechanisms and management strategies. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997 Jul. 1;106(7 Pt 1):533–43.

28. Woo P, Casper J, Colton R, Brewer D. Diagnosis and treatment of persistent dysphonia after laryngeal surgery: a retrospective analysis of 62 patients. *Laryngoscope*. 1994 Sep.;104(9):1084–91.
29. Spraycar M. *Stedman's Medical Dictionary*. 26th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995.
30. Guirao X, Lowry SF. Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late. *World J Surg*. 1996 May 1;20(4):437–46.
31. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*. 1993 Jul. 1;306(1):42–8.
32. Klein L, Rudolph R. 3 H-collagen turnover in skin grafts. *Surg Gynecol Obstet*. 1972 Jul. 1;135(1):49–57.
33. Ehrlich H. Collagen considerations in scarring and regenerative repair. Garg H, Longaker M, editors. *Scarless Wound Healing*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2000. p. 99–113.
34. Bless DM, Welham NV. Characterization of vocal fold scar formation, prophylaxis, and treatment using animal models. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Dec. 1;18(6):481–6.
35. Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states: an anatomical and physical studies. *ASHA Reports*. 1981 Mar. 28;11:11–30.
36. Ishii K, Zhai W, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1996 Apr. 2;116:778–82.
37. Bühler RB, Sennes LU, Tsuji DH, Mauad T, Ferraz da Silva L, Saldiva PN. Collagen type I, collagen type III, and versican in vocal fold lamina propria. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Jun. 1;137(6):604–8.
38. Gray S, Titze I. Histologic investigation of hyperphoned canine vocal cords. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988;97(4 Pt 1):381–8.
39. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett*. 1990 Mar. 28;268:386–93.
40. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999 Jun. 1;109(6):845–54.
41. Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope*. 2004 Apr. 1;114(4):760–4.

42. Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006 Mar. 1;115(3):225–32.
43. Catten M, Gray SD, Hammond TH, Zhou R, Hammond E. Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1998 May 1;118(5):663–7.
44. Lim X, Tateya I, Tateya T, Muñoz-Del-Río A, Bless DM. Immediate inflammatory response and scar formation in wounded vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006 Dec. 1;115(12):921–9.
45. Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006 Jun.;115(6):469–76.
46. Gray SD, Hammond E, Hanson DF. Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104(1):13–8.
47. Gray S, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. Titze I, editor. *Vocal fold physiology:frontiers of basic science*. San Diego: Singular Publishing Group; 1993. p. 1–34.
48. Madruga de Melo EC, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003 Dec. 1;113(12):2187–91.
49. Zapater E, Frías S, Pérez A, Basterra J. Comparative study on chronic tissue damage after cordectomies using either CO2 laser or microdissection electrodes. *Head Neck*. 2009 Nov. 1;31(11):1477–81.
50. Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M, Ohno T, Kanemaru S-I, Kitamura M. Histologic characterization of human scarred vocal folds. *J Voice*. 2009 Jul. 1;23(4):399–407.
51. Goldstein NA, Hebda PA, Klein EC, Dohar JE. Wound management of the airway mucosa: comparison with skin in a rabbit model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 1998 Oct. 15;45(3):223–35.
52. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope*. 2003 Apr. 1;113(4):620–7.
53. Hertegård S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FHJ, Vidovska D, et al. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope*. 2006 Jul. 1;116(7):1248–54.

54. Kurita S, Nagata K, Hirano M. A comparative study of the layer structure of the vocal fold. Bless D, Abbs J, editors. *Vocal Fold Physiology: Contemporary Research and clinical Issues*. San Diego: College-Hill Press; 1983. p. 3–21.
55. Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope*. 2000 May 1;110(5 Pt 1):814–24.
56. Hallén L, Johansson C, Laurent C, Dahlqvist A. Hyaluronan localization in the rabbit larynx. *Anat Rec*. 1996 Dec. 1;246(4):441–5.
57. Ling C, Yamashita M, Waselchuk EA, Raasch JL, Bless DM, Welham NV. Alteration in cellular morphology, density and distribution in rat vocal fold mucosa following injury. *Wound Repair Regen*. 2010;18(1):89–97.
58. Yamashita M, Bless DM, Welham NV. Morphological and extracellular matrix changes following vocal fold injury in mice. *Cells Tissues Organs (Print)*. 2010;192(4):262–71.
59. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice*. 2004 Mar.;18(1):116–24.
60. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope*. 2003 Jun. 1;113(6):966–72.
61. Tsunoda K, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold. *Laryngoscope*. 2000 Apr. 1;110(4):680–2.
62. Nishiyama K, Hirose H, Iguchi Y, Yamamoto K, Suzuki T, Yamanaka J, et al. [A new surgical technique combining autologous intracordal transplantation of fat and fascia for sulcus vocalis]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 2001 Dec. 1;104(12):1151–5.
63. Wang J, Ma L, Ye J, Xu W, Yang Q. [The application of micro-suture technology in laryngeal microsurgery]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008 Nov. 1;22(21):965–7.
64. Tsuji DH, Nita LM, Hachiya A, Imamura R, Sennes LU. T-shaped microsuture: a new suture technique for laryngeal microsurgery. *J Voice*. 2009 Nov. 1;23(6):739–42.
65. Bergel S. Ueber wirkungen des fibrins. *Dtsch med Wochenschr*. 1909 Mar. 29;35:663–5.
66. Grey E. Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynecol Obstet*. 1915 Mar. 29;21:452–4.
67. Young J, Medawar P. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet*. 1940 Mar. 29;275:126–32.

68. Cronkite E, Lozner E, Deaver J. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA*. 1944 Mar. 29;124:976–8.
69. Giannini G, Mauro V, Agostino T, Gianfranco B. Use of autologous fibrin-platelet glue and bone fragments in maxillofacial surgery. *Transfus. Apher. Sci.* 2004 Apr.;30(2):139–44.
70. Mobley S, Hilinski J, Toriumi D. Surgical tissue adhesives. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2002 Mar. 29;10:147–54.
71. Wang G-J, Goldthwaite CA, Burks SG, Spotnitz WD, Orthopaedic Research Group. Experience improves successful use of fibrin sealant in total knee arthroplasty: implications for surgical education. *J Long Term Eff Med Implants*. 2003;13(5):389–97.
72. Kavanagh M, Ohr M, Czyz C, Cahill K, Perry J, Holck D, et al. Comparison of fibrin sealant versus suture for wound closure in Muller muscle-conjunctiva resection ptosis repair. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg*. 2009 Mar. 29;25(2):99–102.
73. Conboy P, Brown DH. Use of tissue sealant for day surgery parotidectomy. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008 Apr.;37(2):208–11.
74. Detweiler MB, Detweiler JG, Fenton J. Sutureless and reduced suture anastomosis of hollow vessels with fibrin glue: a review. *J Invest Surg*. 1999 Aug.;12(5):245–62.
75. Silecchia G, Boru CE, Mouiel J, Rossi M, Anselmino M, Morino M, et al. The use of fibrin sealant to prevent major complications following laparoscopic gastric bypass: results of a multicenter, randomized trial. *Surg Endosc*. 2008 Nov.;22(11):2492–7.
76. Evans L, Morey A. Hemostatic agents and tissue glues in urologic injuries and wound healing. *Urol Clin N Am*. 2006 Mar. 29;33:1–12.
77. Staindl O. Tissue adhesion with highly concentrated human fibrinogen in otolaryngology. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979 Apr.;88(3 Pt 1):413–8.
78. Pryor, SG, Moore, EJ, Maragos, al NE. Abstracts of the Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc. September 19-22, 2004. Pryor, S.G., Moore, E.J., Maragos,N.E. et al. Mucosal flap approximation in microlaryngeal surgery: fibrin glue as a viable alternative *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2004. p. P49–312.
79. Martin F, Spitzer H, Gastpar H. [Endolaryngeal surgery using highly concentrated human fibrinogen as tissue adhesive. Further trials with fibrin glue]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1981 Jul. 1;60(7):369–72.
80. Remacle M, Lawson G, Degols JC, Evrard I, Jamart J. Microsurgery of sulcus vergeture with carbon dioxide laser and injectable collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000 Feb. 1;109(2):141–8.

81. Scapini F, Ferraz da Silva LF, Tsuji DH, Dolhnikoff M, Sennes LU. Effect of fibrin glue on collagen deposition after autologous fascia grafting in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2011 Oct. 1;120(10):663–8.
82. Portes KP, Duprat A de C, Lancellotti CLP, Silva L, Souza FC de. Influence of selant fibrin on the wound healing of the pigs vocal folds. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012 Feb. 1;78(1):51–6.
83. Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Tateya I, Rousseau B, Ito J. Effects of basic fibroblast growth factor on rat vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010 Oct. 1;119(10):690–6.
84. Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PHN. Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010 Feb. 1;119(2):133–9.
85. de Giacomo Carneiro C, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH, Ximenes Filho JA. Assessment of collagen deposits after implant of fascia lata and fat in the vocal folds of rabbits: histomorphometric study. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005;71(6):798–802.
86. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histologic characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005 Mar. 1;114(3):183–91.
87. Kishimoto Y, Hirano S, Tateya I, Kanemaru S, Ito J. Temporal changes in vocal functions of human scarred vocal folds after cordectomy. *Laryngoscope*. 2010 May 6;120(8):1597–601.
88. Finck CL, Harmegnies B, Remacle A, Lefebvre P. Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected Reinke's space after vocal fold microsurgery: short- and long-term results. *J Voice*. 2010 Sep.;24(5):626–35.
89. Lawrence W. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*. 1998 May 6;25:321–40.

ANEXOS

Anexo 1

Análise comparativa entre as áreas superficiais e profundas para cada grupo em todos os tempos

Grupo A – 7 dias :

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1° quartil	3° quartil	Máximo	Mínimo
D Superficial	5	9,84	6,68	7,01	5,43	10,70	4,97	21,08
Profundo	5	13,04	11,18	10,63	8,56	11,72	2,35	31,95
p = 0,2249								
E Superficial	5	10,74	7,09	8,24	5,22	15,00	4,27	20,95
Profundo	5	14,16	8,55	15,32	7,12	18,30	4,48	25,58
p = 0,0796								

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1° quartil	3° quartil	Máximo	Mínimo
Superficial (S) D	5	9,84	6,68	7,01	5,43	10,70	4,97	21,08
E	5	10,74	7,09	8,24	5,22	15,00	4,27	20,95
p = 0,5002								
Profundo (P) D	5	13,04	11,18	10,63	8,56	11,72	2,35	31,95
E	5	14,16	8,55	15,32	7,12	18,30	4,48	25,58
p = 0,5002								
S + P D	5	11,49	8,78	9,37	6,99	10,66	3,92	26,52
E	5	12,29	7,83	11,78	5,11	16,47	4,84	23,27
p = 0,8927								

Grupo A – 30 dias

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	
D	Superficial	7	7,92	7,20	4,60	2,30	17,37	,16	17,80
	Profundo	7	11,36	8,55	12,78	2,28	14,82	1,40	24,12
P = 0,1730									
E	Superficial	7	4,78	2,84	4,57	2,25	7,31	,50	8,03
	Profundo	6	7,47	5,25	7,26	3,20	10,15	1,14	15,80
P = 0,0277									

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	
Superficial (S)	D	7	7,92	7,20	4,60	2,30	17,37	,16	17,80
	E	7	4,78	2,84	4,57	2,25	7,31	,50	8,03
p = 0,3980									
Profundo (P)	D	7	11,36	8,55	12,78	2,28	14,82	1,40	24,12
	E	6	7,47	5,25	7,26	3,20	10,15	1,14	15,80
p = 0,1380									
Total (S+P)	D	7	8,80	7,87	5,54	2,29	16,62	,34	20,96
	E	7	5,63	3,61	4,57	2,73	8,38	,82	11,14
p = 0,4990									

Grupo A – 90 dias

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	
D	Superficial	7	5,54	2,91	5,46	3,19	8,36	,94	8,57
	Profundo	6	5,02	3,80	3,46	2,82	9,24	,93	10,24
P = 0,7532									
E	Superficial	7	5,54	2,91	5,46	3,19	8,36	,94	8,57
	Profundo	7	5,35	3,33	5,22	2,30	8,07	,63	9,97
P = 0,0425									

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	
Superficial (S)	D	7	5,54	2,91	5,46	3,19	8,36	,94	8,57
	E	7	3,45	2,28	2,98	1,67	4,94	,60	7,29
p = 0,0630									
Profundo (P)	D	6	5,02	3,80	3,46	2,82	9,24	,93	10,24
	E	7	5,35	3,33	5,22	2,30	8,07	,63	9,97
p = 0,7532									
Total (S+P)	D	7	5,63	3,12	6,59	3,07	8,57	,94	9,30
	E	7	4,29	2,48	4,35	1,98	6,62	,61	7,78
p = 0,0630									

Grupo B – 7 dias

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	
D	Superficial	5	2,52	,98	2,14	1,97	3,34	1,39	3,74
	Profundo	5	3,74	2,13	4,21	2,02	4,96	1,15	6,35
P = 0,2249									
E	Superficial	5	2,17	2,05	1,77	1,24	2,03	,19	5,62
	Profundo	4	3,28	2,69	2,38	1,41	5,15	1,26	7,11
P = 0,2733									

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	
Superficial (S)	D	5	2,52	,98	2,14	1,97	3,34	1,39	3,74
	E	5	2,17	2,05	1,77	1,24	2,03	,19	5,62
p = 0,6858									
Profundo (P)	D	5	3,74	2,13	4,21	2,02	4,96	1,15	6,35
	E	4	3,28	2,69	2,38	1,41	5,15	1,26	7,11
p = 1,0000									
Total (S+P)	D	5	3,13	1,50	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84
	E	5	2,42	2,37	1,67	1,25	2,61	,19	6,37
p = 0,5002									

Grupo B – 30 dias

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
D Superficial	7	15,09	3,79	14,82	12,25	18,25	8,77	19,87
D Profundo	6	15,41	5,43	15,65	11,80	16,50	8,40	24,50
P = 0,6002								
E Superficial	7	11,44	5,65	12,82	8,25	16,98	1,29	17,17
E Profundo	7	15,37	7,40	16,51	10,46	20,43	1,62	24,32
P = 0,0180								

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
Superficial (S) D	7	15,09	3,79	14,82	12,25	18,25	8,77	19,87
Superficial (S) E	7	11,44	5,65	12,82	8,25	16,98	1,29	17,17
p = 0,4990								
Profundo (P) D	6	15,41	5,43	15,65	11,80	16,50	8,40	24,50
Profundo (P) E	7	11,44	5,65	12,82	8,25	16,98	1,29	17,17
p = 0,4631								
Total (S+P) D	7	15,68	3,65	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44
Total (S+P) E	7	13,16	6,04	14,87	9,81	18,05	1,44	18,26
p = 0,6121								

Grupo B – 90 dias

lado/profundidade	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
D Superficial	6	9,42	5,52	9,63	5,48	11,22	2,26	18,30
D Profundo	3	7,58	3,70	9,11	3,37	10,27	3,37	10,27
P = 1,0000								
E Superficial	6	1,63	1,48	1,11	,45	2,44	,40	4,24
E Profundo	4	2,12	1,31	2,13	1,16	3,08	,55	3,67
P = 0,1441								

Profundidade/ lado	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
Superficial (S) D	6	9,42	5,52	9,63	5,48	11,22	2,26	18,30
Superficial (S) E	6	1,63	1,48	1,11	,45	2,44	,40	4,24
p = 0,0464								
Profundo (P) D	3	7,58	3,70	9,11	3,37	10,27	3,37	10,27
Profundo (P) E	4	2,12	1,31	2,13	1,16	3,08	,55	3,67
p = 0,1797								
Total (S+P) D	6	9,48	5,39	9,80	5,48	10,97	2,53	18,30
Total (S+P) E	6	1,75	1,11	1,70	,90	2,44	,48	3,29
p = 0,0464								

Anexo 2

Evolução temporal da concentração de colágeno na LP das pregas vocais conforme a técnica cirúrgica.

Técnica	Período	n	Desvio		Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
			Média	padrão					
MF + sut	7 dias	5	3,13	1,50	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84
	30 dias	7	15,68	3,65	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44
	90 dias	6	9,48	5,39	9,80	5,48	10,97	2,53	18,30
p = 0,0053 ^a									
MF + cola	7 dias	5	11,49	8,78	9,37	6,99	10,66	3,92	26,52
	30 dias	7	8,80	7,87	5,54	2,29	16,62	,34	20,96
	90 dias	7	5,63	3,12	6,59	3,07	8,57	,94	9,30
p = 0,3326 ^a									
MF	7 dias	10	7,36	7,54	4,98	1,67	11,78	0,19	23,27
	30 dias	14	9,39	6,17	9,09	3,98	14,87	0,82	18,26
	90 dias	13	3,12	2,30	2,44	1,01	4,35	0,48	7,78
p = 0,0227 ^a									

^a Teste de Kruskal-Wallis

^{bc} Comparações dois a dois significativas (p<0,05, teste de Mann-Whitney)

Anexo 3

Evolução da variação da espessura do epitélio conforme a técnica aplicada:

Técnica	Período	n	Desvio		Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
			Média	padrão					
Cola	7 dias	5	59,08	34,24	50,69	35,95	59,84	31,99	116,96
	30 dias	7	22,27	15,91	27,44	6,71	31,95	5,94	47,89
	90 dias	7	37,85	42,49	16,42	10,12	81,56	4,53	114,35
p = 0,0627									
Sutura	7 dias ^b	5	78,89	50,27	73,00	40,21	121,78	21,69	137,76
	30 dias ^c	7	64,17	107,71	21,71	17,47	34,06	14,53	307,81
	90 dias ^{bc}	6	11,95	3,33	12,19	9,94	14,05	6,94	16,41
p = 0,0026 ^a									
MF	7 dias	10	42,78	38,49	24,98	13,93	55,52	10,37	115,15
MF	30 dias	14	22,37	13,25	19,02	12,04	27,78	6,93	49,61
MF	60 dias	13	27,66	53,95	13,00	10,17	13,36	6,52	206,36
p = 0,0553									

^a Teste de Kruskal-Wallis^{bc} Comparações dois a dois significativas (p < 0,05, teste de Mann-Whitney)

Anexo 4

Evolução da espessura da LP nas três técnicas

Técnica	Período	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo
Cola	7 dias	5	348,12	322,25	215,33	187,87	239,68	174,88	922,83
	30 dias	7	132,97	46,91	140,79	91,77	169,32	78,98	209,34
	90 dias	7	267,35	174,13	190,73	147,09	372,06	119,75	610,77
p = 0,0264									
Sutura	7 dias ^b	5	304,90	176,74	282,05	158,73	451,99	114,40	517,35
	30 dias ^c	7	187,02	85,92	184,38	89,82	277,61	83,09	308,63
	90 dias ^{bc}	6	96,66	37,02	88,22	71,87	104,85	61,85	164,91
p = 0,0271 ^a									
MF	7 dias	10	165,47	63,54	170,09	109,36	203,29	84,82	278,00
	30 dias	14	140,82	50,93	139,55	108,62	154,82	49,99	248,39
	90 dias	13	175,06	66,25	184,96	125,04	208,38	67,97	277,56
p = 0,3548									

^a Teste de Kruskal-Wallis^{bc} Comparações dois a dois significativas (p<0,05, teste de Mann-Whitney)

Anexo 5

Avaliação da densidade celular com método computadorizado, comparação entre os grupos para cada tempo:

Técnica/ tempo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
MF + cola	5	6,68	7,02	4,42	3,33	5,13	1,52	19,00
MF	7 dias	5	5,86	4,15	4,87	4,53	1,99	12,96
p=1,0000								
MF + cola	7	7,89	4,54	5,88	4,49	14,15	4,36	14,75
MF	30 dias	7	7,17	1,71	7,02	5,66	5,12	10,39
p=1,0000								
MF + cola	7	7,52	6,08	5,86	2,55	11,82	2,40	18,82
MF	90 dias	7	6,50	5,20	5,71	3,39	1,73	17,41
p=0,2188								
MF + sut	5	6,22	5,25	4,88	3,18	5,10	2,52	15,41
MF	7 dias	5	8,54	11,21	3,59	3,26	4,32	28,57
p=1,0000								
MF + sut	7	6,76	5,01	4,36	3,28	10,88	3,21	16,28
MF	30 dias	7	10,67	7,40	10,68	4,31	15,44	24,40
p=0,1563								
MF + sut	6	3,77	2,04	3,49	2,75	3,78	1,71	7,13
MF	90 dias	6	1,37	,35	1,39	1,24	,86	1,73
p=0,0625								

Teste de Wilcoxon pareado

Avaliação computadorizada da densidade celular, o valor de p se refere à comparação entre cada grupo e o grupo controle:

Técnica	Dias	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Máximo	Mínimo	P*
Controle		6	0,36	0,26	0,30	0,13	0,48	0,12	0,80	
MF + cola	7	5	6,68	7,02	4,42	3,33	5,13	1,52	19,00	0,0062
MF + sut		5	3,13	1,50	3,09	2,09	4,35	1,27	4,84	0,0062
MF		10	7,20	8,09	4,42	3,26	4,96	1,99	28,57	0,0011
MF + cola	30	7	7,89	4,54	5,88	4,49	14,15	4,36	14,75	0,0027
MF + sut		7	15,68	3,65	17,17	13,55	18,25	8,59	19,44	0,0027
MF		14	8,92	5,47	7,15	5,12	10,68	4,01	24,40	<0,0001
MF + cola	90	7	7,52	6,08	5,86	2,55	11,82	2,40	18,82	0,0027
MF + sut		6	9,48	5,39	9,80	5,48	10,97	2,53	18,30	0,0035
MF		13	4,22	4,50	2,43	1,64	5,71	0,86	17,41	<0,0001

* Teste de Mann-Whitney

Anexo 6

Comparação do número de células inflamatórias contadas manualmente, entre os grupos para cada tempo:

Técnica	tempo dias	n	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo	Valor p
MF + cola	7	5	61.00	40,66	49.00	39.00	80,00	16.00	121.00	0,1172*
MF		5	25.00	5.24	23.00	22.00	30,00	19.00	31.00	
MF + cola	30	7	19.86	15.18	18.00	6.00	31.00	6.00	48.00	0,7001*
MF		7	26.43	25.05	19.00	15.00	28.00	5.00	81.00	
MF + cola	90	7	31.57	34.71	18.00	12.00	37.00	3.00	106.00	0,2238*
MF		7	34.43	13.26	37.00	22.00	44.00	12.00	50,00	
MF + sut	7	5	37.20	15.87	38.00	26.00	39.00	21.00	62.00	0,2506*
MF		5	21.40	15.57	22.00	14.00	27.00	1.00	43.00	
MF + sut	30	7	31.29	26.34	19.00	14.00	45.00	8.00	84.00	0,2248*
MF		7	46.57	32.17	31.00	26.00	66.00	25.00	112.00	
MF + sut	90	6	12.33	6.80	14.50	5.00	18.00	3.00	19.00	0,5218*
MF		6	10,50	7.71	10,00	6.00	12.00	1.00	24.00	
MF + col	7	5	61.00	40,66	49.00	39.00	80,00	16.00	121.00	0,2948§
MF + sut		5	37.20	15.87	38.00	26.00	39.00	21.00	62.00	
MF + col	30	7	19.86	15.18	18.00	6.00	31.00	6.00	48.00	0,3700§
MF + sut		7	31.29	26.34	19.00	14.00	45.00	8.00	84.00	
MF + col	90	7	31.57	34.71	18.00	12.00	37.00	3.00	106.00	0,3160§
MF + sut		6	12.33	6.80	14.50	5.00	18.00	3.00	19.00	

§Teste de Mann-Whitney