

Histologia da camada superficial da lâmina própria da prega vocal ao se aplicar retalho pediculado de mucosa: estudo experimental em cães

Vocal fold superficial layer of lamina propria histology after the position of mucosa pediculated flap: canine experimental study

David Greco Varela¹, Marcos Grellet²

Palavras-chave: prega vocal, colágeno, sulco vocal, cirurgia.
Key words: vocal fold, collagen, sulci, surgery.

Resumo / Summary

Os resultados conseguidos até hoje para a correção de sulcos vocais e lesões cicatriciais não são universalmente aceitos. A Técnica do Retalho Pediculado de Mucosa de Prega Vocal consiste na colocação de um retalho de mucosa de prega vocal com pedículo anterior na camada superficial da lâmina própria, abaixo da borda livre. **Objetivo:** Descrever os achados histológicos pós-operatórios ocorridos na camada superficial da lâmina própria de cães ao se aplicar a técnica em questão, tomando-se como parâmetro a variação dos colágenos total, tipo I, tipo III e número de núcleos celulares. **Forma de estudo:** experimental. **Material e método:** Foram utilizados 15 cães. Numa das pregas foi realizada a intervenção e a contralateral foi deixada como controle. Cada grupo de três cães foi sacrificado em 10, 30, 90, 180 e 360 dias após a cirurgia. As colorações utilizadas foram: H.E. e Syrius Red. **Resultados:** Os níveis de colágeno total e tipo I apresentaram uma tendência a aumento nos grupos de intervenção nos 90^o e 180^o dias de pós-operatório, contudo só houve significância estatística no 180^o dia ($p < 0,05$). A área do colágeno tipo III alcançou níveis inferiores ao do grupo controle no 180^o dia ($p < 0,05$). O número de núcleos atingiu maiores níveis no grupo teste no 10^o dia de pós-operatório, seguido de decréscimo após o 30^o dia. **Discussão:** Os resultados encontrados quanto ao colágeno total, tipo I e tipo III e número de núcleos sugerem semelhanças ao processo cicatricial pós-operatório em laringe encontrado em outros estudos experimentais. Os presentes achados deverão ser complementados por experimentos.

Many techniques were applied to treat patients with sulcus vocalis and scarred vocal folds. Their results were not good enough. In the Technique of Vocal Fold Pediculated Mucosa Flap, an anterior pediculated flap of vocal fold is positioned on the superficial layer of the lamina propria, below the free margin. **Aim:** To describe histological postoperative findings on the superficial layer of lamina propria during the application of the technique Vocal Fold Pediculated Mucosa Flap. The following parameters were compared between tested and control groups: total, type I and type III collagen and number of cellular nucleus. **Study design:** experimental. **Material and Method:** Fifteen dogs were used. One vocal fold was submitted to the intervention and the other was left as control. Each group of three dogs was sacrificed on 10, 30, 90, 180 and 360 days after the experimental surgery. Hematoxylin and eosin (H.E.) and Syrius Red were the staining techniques used. **Results:** Type I and total collagen suggested increased results in the tested group on postoperative days 90 and 180, nevertheless there was statistical significance only on postoperative day 180 ($p < 0.05$). Type III collagen group area was less significant than the control group on postoperative day 180 ($p < 0.05$). The number of cellular nucleus was increased on the 10th postoperative day, but decreased after the 30th day. **Discussion:** The findings about total and type I collagen and the amount of cellular nucleus on the superficial layer of lamina propria were similar to laryngeal postoperative studies in dogs. More complex studies would contribute with new data about the present subject.

¹ Mestre em ORL, preceptor - Residência Hospital Santa Izabel.

² Doutor, Professor Associado do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Endereço para correspondência: David Greco Varela - Rua Magno Valente 110 ap. 102B Pituba 41810-620 Salvador BA.

Artigo recebido em 11 de março de 2005. Artigo aceito em 24 de maio de 2005.

INTRODUÇÃO

A lâmina própria tem papel fundamental na viscosidade, contratilidade e formação de onda mucosa da prega vocal. Seu bom funcionamento é determinante para o início e manutenção da vibração sustentada pelo fenômeno de Bernoulli¹.

A matriz extracelular da camada superficial da lâmina própria é composta por fibras protéicas e por proteínas intersticiais². Em humanos, as fibras protéicas distribuem-se paralelamente à borda livre. Dentre elas, as fibras colágenas são as responsáveis pela manutenção da arquitetura local, regulação osmótica e viscosidade³. As fibras colágenas tipo I são maiores, melhor visualizadas e mais rígidas; Já as do tipo III são mais finas, flexíveis e detectadas nos processos cicatriciais iniciais⁴.

Entre as causas orgânicas de fechamento glótico incompleto, os sulcos vocais e as lesões cicatriciais⁵ compõem um grupo de afecções que necessita de abordagem especial^{6,7}. Nelas, a composição da lâmina própria sofre alterações patológicas, cuja solução ainda não é totalmente dominada pelos otorrinolaringologistas.

Técnicas cirúrgicas utilizando implantes tais como os de gordura^{8,9}, de fâscia temporalis intacta ou solubilizada¹⁰, de colágeno autólogo^{11,12} e de ácido hialurônico foram tentados, porém os resultados obtidos até o presente momento não foram universalmente aceitos. Pontes et al.¹³ conseguiram sucesso na recomposição da área subepitelial através da técnica do franjeamento de mucosa, a qual não necessita do uso de enxertos ou implantes.

Gray et al., em 2003, vislumbra uma nova era na Laringologia ao desenvolverem estudos com células pluripotentes para recomposição da matriz extracelular, entretanto, trata-se de uma opção ainda em desenvolvimento e com custos elevados^{14,15}.

Grellet¹⁶ propõe uma nova técnica cirúrgica para abordagem dos sulcos vocais. Ela consiste na rotação de um retalho pediculado de mucosa da superfície superior da prega vocal, posicionando-o sob a superfície cruenta da região subepitelial descolada junto à borda livre. Trata-se de uma técnica alternativa que tenta melhorar o fechamento glótico e a reconstrução da onda mucosa.

OBJETIVO

Descrever os achados histológicos ocorridos na camada superficial da lâmina própria de cães ao se aplicar o retalho pediculado de mucosa de prega vocal nos 10^o, 30^o, 90^o, 180^o e 360^o dias após a intervenção cirúrgica. Verificar as alterações cronológicas ocorridas em cada período de observação dos grupos testes em comparação ao grupo controle, analisando-se os níveis dos seguintes elementos: colágeno total, tipo I, tipo III e núcleos celulares.

MATERIAL E MÉTODO

Realizado estudo experimental em cães, o qual foi avaliado e aprovado pelo Conselho de Ética para Utilização de Animais do Campus da USP - Ribeirão Preto (Protocolo 03.1.324.53.6).

Foram selecionados quinze cães adultos, com peso variando entre 12 e 17 kg, saudáveis, não apresentando lesões laringeas à inspeção ao microscópio cirúrgico e à laringoscopia de contato (Hamou I, Karl Storz 26156B). Todos foram oriundos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. As intervenções cirúrgicas foram realizadas entre os meses de abril de 2002 e maio de 2003. A prega vocal direita foi tomada como teste e a esquerda como controle em todos os cães.

Os cães estudados foram submetidos à anestesia geral venosa, intubação orotraqueal e ventilação por pressão assistida. A indução anestésica foi realizada com 50mg/kg de quetamina, associada a 1ml de xilazina. Após intubação, a anestesia foi mantida com tiopental sódico 40mg/kg. A ventilação por pressão foi ditada pelo aparelho Takaoka (K. TAKAOKA, modelo 850-10) com ciclos de 15 segundos. Foi realizada profilaxia antibiótica com Kefazol, 30 a 40mg/kg.

Para intervenção cirúrgica foram necessários: micro bisturis reto e em ângulo de 90^o, micro tesoura, microdescoladores curvo e reto e aspiradores (Karl Storz, Tuttlingen, 1999). O microscópio utilizado foi o M-900 (DF Vasconcellos, São Paulo) com lente de 400mm, MC-A400. A técnica consistiu na confecção de um retalho pediculado de mucosa de prega vocal com irrigação anterior (2cm x 0,2cm) e posicionamento do mesmo em camada superficial de lâmina própria, na região da borda livre (Figuras 1, 2 e 3).

Ao final da cirurgia houve o posicionamento de: 1) Superfície superior de mucosa de retalho pediculado em contato com superfície inferior e cruenta de região subepitelial, junto à borda livre e 2) Superfície inferior de retalho pediculado em contato com superfície cruenta do leito descolado em lâmina própria.

Nas primeiras 72 horas de pós-operatórios, foi prescrita dieta líquida na tentativa de auxiliar o repouso vocal e cicatrização. Os cães foram sacrificados em períodos de 10, 30, 90, 180 e 360 dias após a cirurgia, com o intuito de avaliar o comportamento do retalho pediculado e o processo cicatricial da camada superficial da lâmina própria a curtos e longos prazos. Foi utilizada superdosagem de tiopental sódico intravenoso, seguida de 10 ml de cloreto de potássio a 19,1% para o sacrifício. A obtenção das pregas vocais foi realizada através de uma incisão cervical longitudinal mediana e exposição da laringe por laringofissura.

As pregas vocais foram imersas em parafina no sentido de seu maior eixo e, em seguida, cortes transversais foram realizados entre terços anterior e médio de sua extensão. O corante Syrius Red¹⁷ foi utilizado para a análise dos colágenos total, tipo I e tipo III, sob luz polarizada. A Hematoxilina e Eosina visaram a identificação dos núcleos celulares.



Figura 1. Incisão realizada em superfície superior de prega vocal e descolamento subepitelial



Figura 2. Incisão em superfície superior de prega vocal, 2 milímetros lateralmente à primeira incisão e descolamento sob região delimitada pelas duas incisões



Figura 3. Realização de retalho pediculado, posicionamento em região subepitelial e fixação com cola de fibrina

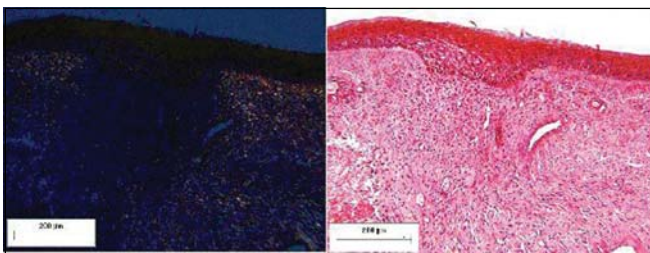


Figura 4. Retalho pediculado colocado em leito submucoso de cão teste (décimo dia pós-operatório). Colorações: Syrius Red sob luz polarizada e H.E.

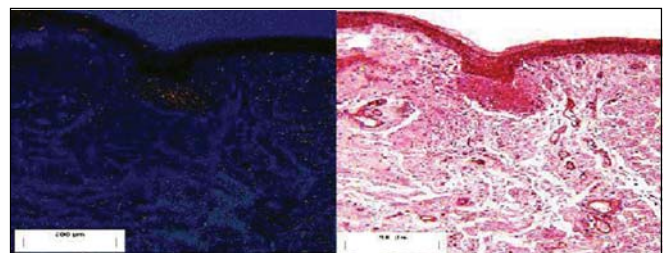


Figura 5. Retalho pediculado colocado em leito submucoso de cão teste (trigésimo dia de pós-operatório). Colorações: Syrius Red sob luz polarizada e H.E.

As lâminas foram analisadas através do microscópio óptico Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan), sendo as imagens digitalizadas através da câmera Nikon DXM 1200 (Nikon, Melville, New York) e transferidas para o computador Pentium IV, utilizando-se o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5.1.22 para Windows Media Cybernetics.

Após a preparação histológica obtiveram-se lâminas coradas por Syrius Red e H.E. de 3 pregas vocais testes em 5 períodos diferentes de pós-operatório, além de 15 pregas vocais controle. Os valores das áreas de colágeno total, tipo I e tipo III e do número de núcleos celulares de cada grupo teste de três cães correspondente ao 10º, 30º, 90º, 180º e 360º dias de pós-operatório foram analisados de forma descritiva e analítica. As medidas de média e desvio padrão foram usadas para a descrição da amostra. Para comparação de grupos teste e grupo controle utilizou-se o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney para a análise de pequenas amostras, estabelecendo-se um $\alpha = 0,05$ como parâmetro de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Nas lâminas correspondentes ao décimo dia de pós-operatório do grupo teste, o retalho pediculado pôde ser identificado na área correspondente à região superficial da lâmina própria. Após este período apenas a área de seu pedículo pôde ser identificada no 30º dia (3/3), no 90º dia (2/3), no 180º dia (2/3) e no 360º dia (2/3).

A área de colágeno total medida nas quinze pregas vocais dos grupos teste variou entre $688,58\mu^2$ e $4097,22\mu^2$; desvio padrão de 1155,31 e mediana $1715,62\mu^2$; no grupo controle a área variou entre $1002,21\mu^2$ e $3395,33\mu^2$, com desvio padrão de 734,33 e mediana $2054,87\mu^2$. A área de colágeno tipo III nas quinze pregas vocais dos grupos teste variou entre $58,05\mu^2$ e $1479,38\mu^2$, desvio padrão de 241,98 e mediana $261,62\mu^2$; a área do grupo controle variou entre $58,27\mu^2$ e $1028,38\mu^2$, desvio padrão de 248,48 e mediana $475,94\mu^2$.

A área de colágeno tipo I dos grupos teste ficou entre $595,17\mu^2$ e $3958,30\mu^2$, desvio padrão foi 1229,64 e mediana $1113,28\mu^2$; a área do grupo controle variou entre $286,23\mu^2$ e $2695,80\mu^2$, o desvio padrão foi 1229,64 e mediana $1491,46\mu^2$.

O número de núcleos celulares nos grupos teste variou entre 21 e 79 núcleos, desvio padrão de 17,51 e mediana 39. No grupo controle a variação de núcleos foi de 8 a 89, desvio padrão foi 23,88 e mediana 27.

A variação da média do colágeno total e tipo I durante o período de observação sugere uma tendência de aumento nos grupos teste dos 90º e o 180º dias de pós-operatório, seguida de queda no 360º dia (Gráfico 1, Tabela 1 e 2). No 30º dia de pós-operatório, as médias do colágeno total e tipo I no grupo teste foram inferiores em relação ao

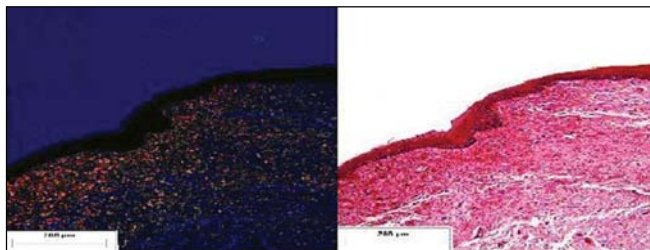


Figura 6. Retalho pediculado colocado em leito submucoso de cão teste (12 meses de pós-operatório). Colorações: Syrius Red sob luz polarizada e H.E.

controle (Tabela 1 e 2). Contudo, dos subgrupos ($n=3$) analisados quanto à área de colágeno total e tipo I, apenas aqueles relativos ao 180º DPO apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($n=15$), aplicando-se o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

As médias da área de colágeno tipo III nos grupos teste foram sempre inferiores aos outros grupos de colágeno (Gráfico 1) e alcançaram níveis sempre inferiores aos do grupo controle (Tabela 1 e 2) durante todo o período de observação. Dos períodos de pós-operatório, somente o do 180º dia apresentou níveis reduzidos significativamente ($p < 0,05$).

Não houve correlação estatística nos diferentes períodos de observação pós-operatória quanto ao número de núcleos na camada superficial de lâmina própria entre grupos teste e controle. Houve apenas um aumento inicial da média do número de núcleos no grupo teste no 10º dia de pós-operatório, seguido de queda após este período (Tabela 1 e 2).

DISCUSSÃO

Autores como Duke e Shaw consideram que ainda não há uma substância implantável ideal para a aplicação em lâmina própria de pregas vocais^{18,19}. Em estudos conduzidos por Mikus et al.²⁰, constatou-se que houve uma absorção bastante heterogênea de gordura, havendo variação entre 2,3% e 70%, além de piora da qualidade vocal nos 3 a 6 meses de pós-operatório. Duke et al.¹⁸ sugeriram viabilidade do enxerto de fâscia até um ano. Entretanto, o resultado pós-operatório pode ser influenciado por extrusão ou absorção precoce. Courey¹² sugeriu que a implantação de colágeno na camada superficial de lâmina própria tem potenciais efeitos quanto à redução local da viscosidade.

O retalho desenvolvido na presente técnica seguiu o delineamento vascular paralelo à borda livre. Análises realizadas por Bardach²¹ estabeleceram que para a viabilidade de um retalho de pele é necessário o fluxo de cerca de 1 a 2ml por minuto para 100cc de tecido. O retalho proposto no presente estudo precisaria de 0,004ml/minuto. Entretanto, esta medida não foi mensurada.

A observação da distribuição cronológica do colágeno total e do tipo I no grupo teste sugeriu um aumento de seus níveis no 90º e o 180º dias de pós-operatório, porém só houve significância estatística no 180º DPO. Rosseau e Thibeault^{22,23} estudaram o processo cicatricial da lâmina própria e verificaram que o procolágeno era mais presente no 2º mês de pós-operatório, com estabilização de seus níveis no 6º mês, mesmo período em que surgiam, na ferida cirúrgica, colágenos de maior densidade.

Após o 180º dia pós-operatório houve diminuição da média do colágeno total e tipo I, com níveis semelhantes ao do grupo controle. Poucos trabalhos experimentais em laringe estenderam-se por mais que 6 meses, sendo necessários mais estudos para obtenção de melhores conclusões para este último período de observação.

A comparação das médias obtidas pelo grupo no qual foi aplicado o retalho pediculado com os dois grupos teste do trabalho de Cervantes et al.²⁴ é sugestiva de que o pre-

Tabela 1. Área de colágeno total, tipo III e tipo I e número de núcleos celulares. Cálculo de média de cada período pós-operatório

		Colágeno (μ^2)			Núcleos Celulares
		Total	Tipo III	Tipo I	
10º DPO	CÃO 1	3907,85	83,44	3824,41	44
	CÃO 2	688,58	93,4	595,18	79
	CÃO 3	1330,73	718,78	611,95	51
	MD 10 DIAS	1975,72	298,53	1677,18	58
30º DPO	CÃO 4	1741,01	58,05	1682,96	53
	CÃO 5	1348,96	478,29	870,67	24
	CÃO 6	2396,14	591,93	1804,21	36
	MD 30 DIAS	1828,7	376,09	1452,61	38
90º DPO	CÃO 7	1715,62	602,34	1113,29	64
	CÃO 8	1027,49	82,77	944,72	21
	CÃO 9	3794,55	294,4	3500,15	29
	MD 90 DIAS	2179,22	326,5	1852,72	38
180º DPO	CÃO 10	4097,22	138,92	3958,3	29
	CÃO 11	3303,84	136,69	3167,16	47
	CÃO	2590,43	335,9	2254,54	27
	MD 180 DIAS	3330,49	203,83	3126,66	34
360º DPO	CÃO 13	1080,18	261,63	818,55	21
	CÃO 14	1214,96	124,94	1090,02	39
	CÃO 15	1479,39	696,52	782,87	62
	MD 360 DIAS	1258,17	361,02	897,15	41

** MD= média, DPO: dia de pós-operatório, μ^2 = micrômetro quadrado

Tabela 2. Área de colágeno total, tipo III e tipo I e número de núcleos celulares em grupo controle. Cálculo de média e mediana

		Colágeno (μ^2)			Núcleos Celulares
		Total	Tipo III	Tipo I	
CÃO 1	2187,31	58,28	2129,04	15	
CÃO 2	2151,52	660,05	1491,47	27	
CÃO 3	1407,8	394,73	1013,06	20	
CÃO 4	1932,06	368,22	1563,84	8	
CÃO 5	3395,34	699,54	2695,8	18	
CÃO 6	2532,83	657,59	1875,24	52	
CÃO 7	2054,88	843,72	1211,16	13	
CÃO 8	1002,21	463,19	539,03	15	
CÃO 9	1890,67	609,38	1281,29	69	
CÃO 10	2301,4	432,88	1868,53	28	
CÃO 11	2027,92	774,03	1253,89	35	
CÃO 12	2469,86	475,94	1993,92	63	
CÃO 13	828,28	363,75	464,53	43	
CÃO 14	834,32	248,09	286,24	23	
CÃO 15	2922,42	1028,39	1894,03	89	
MÉDIA	1995,92	538,52	1437,4	34,5	
MEDIANA	2054,87	475,94	1491,46	27	

MD= média, μ^2 = micrômetro quadrado

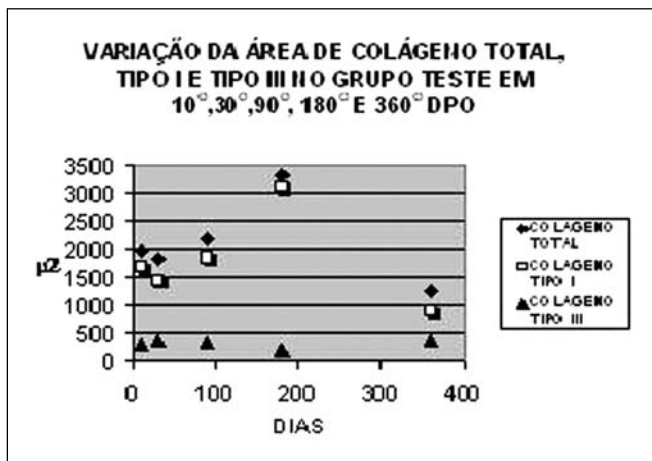


Gráfico 1. Variação da média da área de colágeno total, tipo I e tipo III no período pós-operatório (n=3 para cada período de observação)

sente estudo apresentou níveis inferiores de colágeno total no 30º dia de pós-operatório. Este dado pode ser compatível com menor presença de fibrose local, contudo, devido ao reduzido número de cães teste do atual estudo (n=3) nada pode ser afirmado até o presente momento.

A média da área do colágeno tipo III no grupo teste manteve-se sempre abaixo do grupo controle, contudo só houve diferença estatisticamente significativa no 180º dia de pós-operatório.

Os achados relativos à análise do colágeno tipo III diferem parcialmente de outros trabalhos^{22,23} que notaram que o procolágeno (forma imatura do colágeno) mantinha-se em níveis mais elevados que os mensurados no grupo controle até o 2º mês, além de que no 6º mês havia um simultâneo decréscimo do procolágeno e ascensão do colágeno mais denso.

A análise do comportamento da matriz extracelular após a aplicação da técnica cirúrgica do retalho pediculado revelou que houve alterações significantes quanto ao aumento da área de colágeno mais denso (tipo I), associada à diminuição da área de colágeno imaturo ou menos denso (tipo III) no 180º dia de pós-operatório. Isto pode sugerir semelhanças com os achados pós-operatórios de outros estudos experimentais em laringe, exceto os persistentes baixos níveis do colágeno tipo III durante todo o período de observação.

Estudos mais amplos que contemplem um grupo controle em que tenha sido realizada uma simples incisão e a utilização de anticorpos específicos para identificação dos diferentes subtipos de fibras colágenas, fibras elásticas, fibronectina, ácido hialurônico, outras glicosaminoglicanas, proteoglicanas, lipídios e carboidratos são necessários para o melhor esclarecimento do impacto do retalho pediculado sobre a camada superficial da lâmina própria.

As médias do número de núcleos nos grupos teste alcançaram níveis altos no décimo dia de pós-operatório, evoluindo com decréscimo após o trigésimo dia. Pode-se tratar de um dado compatível com o processo cicatricial na transição da fase proliferativa para a fase de remodelação²⁵, contudo não foram achados resultados estatisticamente significantes em quaisquer períodos observados.

Observações realizadas com laringoscópio de contato no pós-operatório não detectaram surgimento de lesões compatíveis com cistos vocais, bem como alterações significantes na vascularidade do local onde o retalho foi posicionado. Vale a pena ressaltar que o presente estudo foi realizado em cães e a lâmina própria deles possui uma maior quantidade percentual de colágeno que a humana, principalmente na camada superficial¹⁷. A análise de colágeno, portanto, pode ser mais acurada para a regeneração no cão do que no homem.

O presente estudo foi inédito quanto ao tempo prolongado de observação pós-operatória em cães (10 dias a 1 ano) e quanto à introdução de uma nova técnica cirúrgica. Algumas questões não puderam ser totalmente respondidas com os resultados obtidos, porém suscitaram novas perspectivas de pesquisas para checar respostas mais completas e complexas.

CONCLUSÕES

O estudo mostrou que no grupo de cães no qual foi realizada a técnica do retalho pediculado de prega vocal houve uma tendência de aumento dos níveis de colágeno total e tipo I na camada superficial da lâmina própria no 90º e 180º dias de pós-operatório, seguido de queda no 360º dia, entretanto, só foi encontrada significância estatística no 180º dia de pós-operatório.

A média de colágeno tipo III do grupo teste foi inferior ao do grupo controle em todos os períodos de observação, contudo, só houve diferença estatística no 180º dia de pós-operatório.

O número de núcleos celulares no grupo teste foi maior no 10º dia de pós-operatório, cursando com diminuição dos seus níveis após o 30º dia, porém não foram achados resultados estatisticamente significantes em quaisquer períodos observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ishiki N, Tsuji DH, Sennes U. Tireoplastia. 1ª edição. São Paulo: Bios Comunicação e Editora Ltda.; 1999. 1-49.
- Ford CN. Advances and Refinements in Phonosurgery. Laryngoscope 1999; 109: 1891-900.
- Fisher KV, Telser A, Phillips JE, Yeates DB. Regulation of vocal fold transepithelial water fluxes. J Appl Physiol 2001; 91: 1401-11.
- Junqueira LCU, Montes GS, Martins JEC. Dermal Collagen Distribution. A Histochemical and Ultrastructural Study. Histochemistry 1983; 79: 397-403.

5. Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, Sataloff RT, Spiegel JR, Woo P. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 1996; 115(5): 474-82.
6. Ford CN, Inagi K, Khidr A, Bless DM, Gilchrist KW. Sulcus vocalis: a rational analytical approach to diagnosis and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 189-200.
7. Hirano M, Tanaka S, Yoshida T, Hibi S. Sulcus vocalis: functional aspects. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99: 679-83.
8. Saccogna PW, Werning JW, Setrakian S, Strauss M. Lipoinjection in the paralyzed feline vocal fold: Study of graft survival. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1997; 117(5): 465-70.
9. Woo P, Rahbar R, Wang Z. Fat implantation into reinke space a histologic and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 77-85.
10. Tsunoda K, Takanosawa M, Niimi S. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: a new phonosurgical technique for glottal incompetence. *Laryngoscope* 1999; 109: 504-8.
11. Courey MS. Homologous Collagen Substances for Vocal Fold Augmentation. *Laryngoscope* 2001; 111: 747-58.
12. Kriesel KJ, Thibeault SL, Chan RW, Suzuki T, Vangroll PJ, Bless DM, Ford DB, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111: 884-8.
13. Pontes P, Behlau M. Treatment of sulcus vocalis: auditory perceptual and acoustical analysis of the slicing mucosa surgical technique. *J Voice* 1993; 7(4): 365-76.
14. Gray S, Thibeault S, Tresco P. Witnessing a revolution in voice research: genomics, tissue engineering, biochips and what's next! *Logoped Phoniatr Vocol* 2003; 28(1): 7-13.
15. Glatz FR, Kalkanis J, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Mowlawi A. Volume analysis of preadipocyte injection for vocal cord medialization. *Laryngoscope* 2003; 113(7): 1113-7.
16. Grellet M, Carneiro CG, Aguiar LN, Rosa MO, Pereira JC. Técnica do retalho pediculado para correção do sulco vocal. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2002; 68(1): 75-9.
17. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal ASI. Sirius Red F3BA as a Stain for Connective Tissue. *Archives of Pathology* 1964; 78: 69-72.
18. Duke SG, Salomon J, Blalock D, Postma GN. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope* 2001; 111: 759-64.
19. Shaw GY, Szewczyk MA, Searle J, Woodroof J. Autologous fat injection into the vocal folds: technical considerations and long-term follow-up. *Laryngoscope* 1997; 107: 177-86.
20. Mikus JL, Koufman JA, Kilpatrick SE. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope* 1995; 105: 17-22.
21. Bardach J, Voots RJ, McCabe BF, Hsu MM. Photoplethysmography in the prediction of experimental flap survival. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979; 88(5Pt1): 673-41.
22. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, Bless DM. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope* 2003; 113: 620-7.
23. Thibeault SL, Gray SD, Li W, Chen Z. Instability of extracellular matrix gene expression in primary cell culture of fibroblasts from human vocal fold lamina propria and tracheal scar. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111: 8-14.
24. Cervantes FCC. Estudo comparativo Histológico na Prega Vocal após incisão com instrumental a Frio e a Laser de CO₂ em Modelo Animal. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2003.
25. Goffi FS. Técnica cirúrgica: Bases anatômicas, fisiopatológicas e técnicas da cirurgia, 4ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2001; 285-95.