

Avaliação da deposição de colágeno após implante de fâscia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico

Assessment of collagen deposits after implant of fascia lata and fat in the vocal folds of rabbits: histomorphometric study

Christiano de Giacomo Carneiro¹, Luiz Ubirajara Senes², Paulo Hilário Nascimento Saldiva³, Domingos Hiroshi Tsuji, João Aragão Ximenes Filho⁴

Palavras-chave: laringe/anatomia & histologia, coelho/cirurgia, transplante autólogo/efeitos adversos.
Keywords: larynx/anatomy & histology, rabbits/surgery, transplatation, autologous/side effects.

Resumo / Summary

Vários materiais têm sido injetados ou inseridos em pregas vocais na tentativa de solucionar a incompetência glótica. Contudo, poucos são os estudos que avaliam o processo cicatricial decorrente da enxertia destes materiais. **Objetivo:** O objetivo desta pesquisa foi avaliar a concentração de colágeno após enxerto microcirúrgico de fâscia muscular e gordura na prega vocal de coelho. **Forma de estudo:** experimental. **Material e Método:** Dezenove coelhos foram submetidos à inserção de enxerto na prega vocal direita, sendo nove de fâscia e dez de gordura. A prega vocal esquerda foi submetida ao mesmo procedimento, sem enxertia. Os coelhos foram sacrificados após 90 e 180 dias. O colágeno foi analisado morfometricamente através do método da Picrosírius-polarização com a utilização do software Image Pro Plus. **Resultados:** Houve aumento do colágeno em todos grupos enxertados quando comparados com o grupo controle. A concentração do colágeno encontrada nos coelhos submetidos a enxerto de gordura foi significativamente maior quando comparados à concentração do colágeno nos coelhos submetidos a enxerto de fâscia muscular, tanto com 90 quanto com 180 dias. **Conclusão:** A enxertia de gordura e fâscia lata na prega vocal de coelho promoveu maior deposição de colágeno do que no grupo controle, sendo mais exuberante na inserção de gordura.

Several materials have been injected or introduced in the vocal folds in attempt of solving the glottic insufficiency. However, few studies have evaluated the cicatricial process due to the implantation of these materials. **Aim:** The objective of this research was to evaluate the concentration of collagen after microsurgery graft of muscular fascia and fat in the vocal folds of rabbit. **Study design:** experimental. **Material and Method:** Nineteen rabbits were submitted to the graft insert in the right vocal fold, being nine of fascia and ten of fat. The left vocal fold was submitted to the same process, except for the insertion of fat or fascial graft. The rabbits were sacrificed after 90 and 180 days. The collagen was analyzed through the method of the Picrosirius-polarization using the Image Pro Plus software. **Results:** There was prevalence of the collagen in all grafted groups when compared with the group control. The concentration of the collagen found in the rabbits submitted to fat graft was significantly larger when compared to the concentration of the rabbits submitted to graft of muscular fascia, either with 90 as with 180 days. **Conclusion:** The fat and muscular fascia implantation in the vocal folds of rabbit promoted production of collagen, being more intense with fat.

¹ Doutorando em ORL pela FMUSP, Otorrinolaringologista.

² Livre-docente pela em Otorrinolaringologia FMUSP, Professor Associado.

³ Professor Titular do Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP.

⁴ Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da USP (Prof. Convidado da Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFC. Artigo recebido em 05 de março de 2005. Artigo aceito em 13 de junho de 2005.

INTRODUÇÃO

A versatilidade da voz humana permite variações em intensidade, *pitch* e qualidade, viabilizando assim a capacidade que temos em expressar emoções e pensamentos¹. Entre as alterações que desafiam os laringologistas, a incompetência ou insuficiência glótica figura entre as mais importantes. É um problema que leva à disфонia e pode ser causada por: alterações da mobilidade, cicatrizes, atrofia ou “arqueamento” das pregas vocais². Entre as causas citadas, a cicatriz ou fibrose talvez seja a que mais se caracteriza pelo impacto social negativo e pela carência de tratamentos efetivos³.

O principal componente do tecido cicatricial ou fibrótico é o colágeno. Após a instalação do dano tecidual, sua síntese inicia-se logo no terceiro dia⁴ e atinge seu pico máximo entre 3 e 6 semanas seguindo-se a um período de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo substituído por tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial⁵.

Vários enxertos sintéticos ou biológicos foram utilizados na tentativa de restaurar a relação corpo-cobertura da prega vocal, quando a lâmina própria está alterada. A injeção de Teflon, muito utilizada no passado, foi abandonada pelo risco de reações imunológicas, formação de granuloma e extrusão⁶; atualmente é utilizado somente para tratamentos em que a expectativa de vida é limitada⁷. A longevidade limitada do gelfoam restringe seu uso como tratamento definitivo⁸, porém, sua aplicabilidade surge enquanto se define a modalidade definitiva a ser proposta. Mais recentemente o colágeno, inicialmente bovino¹, depois autólogo⁹, seguido pelo homólogo¹⁰ também foi utilizado. O custo elevado e o alto índice de reabsorção restringiram seu uso.

Os enxertos autólogos como a gordura e a fásia muscular mostraram resultados promissores e sua segurança e risco mínimo de reações indesejadas ao enxerto estimularam seu uso. A gordura é altamente biodisponível¹¹ além de apresentar viscosidade similar à da camada superficial da lâmina própria sugerindo que a sua consistência pode ser próxima da ideal para injeção em prega vocal¹². A longevidade do enxerto gorduroso é questionável e dependente de alguns fatores como: tamanho e grau de manipulação do enxerto, região anatômica de coleta e região anatômica a ser implantada¹³.

A fásia muscular figura desde entre as possibilidades cirúrgicas também autólogas para uso em laringologia. Previamente teve seu uso amplamente difundido na cirurgia plástica reparadora. A fásia muscular pode ser usada por apresentar algumas vantagens: é um tecido delicado, que suporta tensão, é composto por fibroblastos (colágeno) e apresenta grande biodisponibilidade. A principal desvantagem está relacionada com a maior adaptação em preencher espaços bidimensionais como na cirurgia cosmética e não tridimensionais como as pregas vocais¹³.

Em relação aos materiais utilizados, a literatura encontra-se repleta de trabalhos¹⁴⁻¹⁸ referentes à distribuição do enxerto, processo inflamatório, tipo e quantificação celular, porém são raros os estudos que priorizam o estudo do tecido cicatricial gerado após o enxerto desses materiais¹⁹. O objetivo desta pesquisa é descrever, comparar e quantificar o colágeno resultante da enxertia de fásia muscular e de gordura na prega vocal do coelho, bem como compará-los às pregas vocais não enxertadas, utilizando o método da picrossírius-polarização.

MATERIAL E MÉTODO

Material

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa 200/02).

Foram utilizados 19 coelhos albinos da raça New Zealand, todos do sexo masculino, sadios, pesando entre 2,5 e 3,5kg. Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos. Nos dois primeiros (Grupos F1 e F2), os coelhos foram submetidos à inserção de enxerto de fásia lata na prega vocal direita. Nos outros dois grupos (Grupos G1 e G2), os coelhos foram submetidos a implante de gordura autóloga “em bloco” também na prega vocal direita. Nos coelhos dos quatro grupos citados, o grupo controle é composto pela prega vocal esquerda, pois foi submetida ao mesmo procedimento com exceção da colocação do enxerto. Todos os animais operados foram mantidos vivos, com cuidados diários e controle do processo de cicatrização. Todos foram sacrificados pelo mesmo método de injeção endovenosa de 2,0 ml de KCl 20%, sendo que:

- As pregas vocais direitas dos animais sacrificados após um período de 90 dias do procedimento cirúrgico formaram os **grupos Fásia (F1) e Gordura (G1)** e as pregas vocais esquerdas o **grupo controle (C1)**;
- As pregas vocais direitas dos animais sacrificados após um período de 180 dias do procedimento cirúrgico formaram os **grupos Fásia (F2) e Gordura (G2)** e as pregas vocais esquerdas o **grupo controle (C2)**.

MÉTODO

Técnica Cirúrgica

Os animais foram anestesiados com Xilazina (5 mg/Kg) associado à Quetamina (50 mg/Kg) por via intramuscular. Foram mantidos em ventilação espontânea, através da incisão laríngea, sem necessidade de cânula traqueal e fixos à mesa cirúrgica pelas patas. Os coelhos foram submetidos à incisão na linha média, a partir da margem superior da cartilagem tireóideia até a borda inferior da cartilagem cricóideia,

utilizando-se bisturi lâmina 15, na pele e subcutâneo, permitindo a exposição das cartilagens tireóidea e cricóidea. A gordura foi captada para posterior inserção através da incisão na região cervical para acesso à laringe. A fásia muscular foi obtida após incisão na pele da região anterior e lateral da coxa, seguida de controle da hemostasia e delicada dissecação (10 x 10mm).

A membrana cricotireóidea foi incisada na linha média, com bisturi lâmina 15, permitindo a visualização da subglote. A cartilagem tireóidea, aberta anteriormente, permitiu a exposição das pregas vocais. Ambas as pregas vocais foram submetidas à incisão de 0,3mm em sua margem superior seguindo-se de minucioso descolamento da mucosa ao longo da margem medial. O procedimento realizado com estilete Hollemback 3s utilizado em dentística permitindo a confecção de uma bolsa para receber o enxerto. Foi necessário todo cuidado no sentido de evitar a penetração do músculo tireoaritenóideo. O enxerto (fásia muscular ou gordura medidos compaquímetro), com aproximadamente 3mm de diâmetro e 1mm de altura, foi implantado na bolsa entre a musculatura e a mucosa da prega vocal direita. A prega vocal esquerda não recebeu enxerto.

Os coelhos receberam antibioticoterapia com Benzilpenicilina procaína 300000 UI, Benzilpenicilina potássica UI, diluída em 3ml de água destilada, sendo aplicado 0,4ml intramuscular por dose. A primeira dose foi aplicada durante o procedimento, e duas outras, a cada 24 horas.

Estudo histológico e morfológico

Após o sacrifício do animal, foi removida a laringe através de incisão cervical seguido de remoção do fragmento mediano da prega vocal direita e esquerda. Todas as peças medindo cerca de 3 x 5mm foram fixadas em formalina a 10%, sendo então encaminhadas para processamento: desidratadas com álcool etílico a 95%, clareadas em xilol, impregnadas pela parafina fundida em estufa a 60°C, incluídas e a seguir cortadas no micrótomo com espessura de 3/4mm. Os cortes corados pelo método da picrossírius-polarização foram utilizados para a visualização e análise das fibras colágenas. Este método consiste na coloração pelo Sírius-red dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. A análise das lâminas foi realizada sob microscopia de Luz utilizando polarização óptica.

Foi realizada análise descritiva dos quatro grupos, detendo-se na identificação do colágeno, classificação em Tipo I e III determinada pela sua birrefringência, bem como a presença do enxerto e estado do mesmo em relação com a estrutura muscular adjacente. Em cada um dos grupos de estudo, foi analisada também amostras da prega vocal esquerda onde foi realizada a dissecação porém sem a implantação do enxerto.

Foi efetuado também estudo morfológico, com a quantificação das fibras colágenas através de um sistema digital de análise de imagens usando o software Image Pro Plus versão 4.0, determinando-se a concentração das fibras colágenas por unidade de área medida. Foram analisadas amostras de ambas as pregas vocais para obtenção dos valores da concentração do colágeno.

Análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, tendo mostrado distribuição normal. Na comparação dos grupos, foi utilizado o teste T de Student.

RESULTADOS

A análise microscópica das pregas vocais coradas pelo método da picrossírius polarização mostrou diferenças com relação à distribuição do colágeno cicatricial. A fásia lata dos grupos F1 e F2 apresentam aspecto fusiforme (Fotos 1 e 2) enquanto a gordura (G1 e G2) apresenta aspecto difuso, formando focos encapsulados por colágeno espesso (Fotos 3 e 4). Há predomínio do colágeno tipo I (maior birrefringência) em todos os grupos, porém em G1 e G2 o colágeno tipo III é mais identificado quando comparado ao grupo da fásia muscular, independente do tempo.

A Tabela 1 resume a concentração média de colágeno e seu desvio padrão em todos os grupos estudados, em ambas as pregas vocais. A análise estatística da concentração de colágeno por área demonstrou aumento do colágeno em todos grupos enxertados quando comparados com os grupos controle ($p < 0,001$).

Houve maior concentração de colágeno no grupo da gordura quando comparado à fásia tanto na análise aos 90 dias ($p < 0,001$), quanto aos 180 dias ($p < 0,001$), respectivamente Gráficos 1 e 2.

Tabela 1. Concentração de Colágeno nos grupos estudados

Grupos Sítio	G1		G2		F1		F2	
	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE	PVD	PVE
Média	0,363	0,066	0,273	0,061	0,185	0,074	0,174	0,067
Desvio padrão	0,021	0,004	0,018	0,001	0,007	0,005	0,007	0,004

PVD: prega vocal direita; PVE: prega vocal esquerda

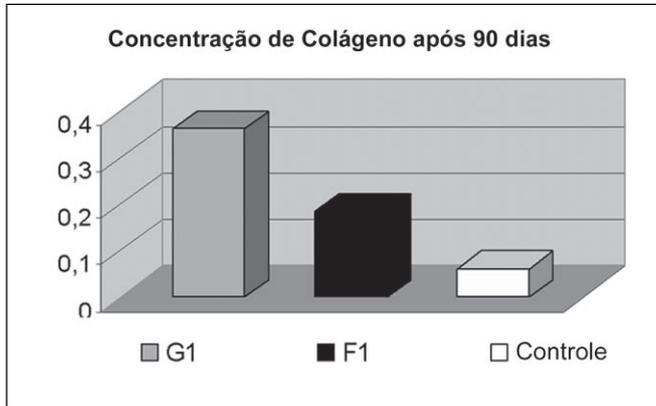


Gráfico 1. Comparação da Concentração de Colágeno após 90 dias, demonstrando maior concentração no grupo enxertado com gordura ($p < 0,001$).

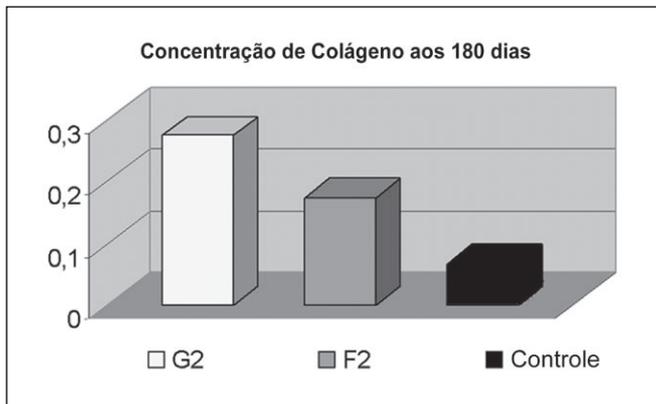


Gráfico 2. Comparação da Concentração de Colágeno após 180 dias, demonstrando maior concentração no grupo enxertado com gordura ($p < 0,001$).

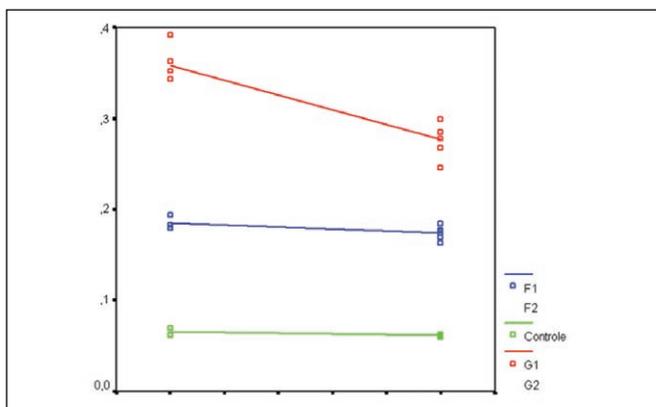


Gráfico 3. Comparação da Concentração de Colágeno aos 90 e 180 dias, demonstrando redução estatisticamente significativa apenas nos coelhos enxertados com gordura.

Comparando o grupo de gordura aos 90 e 180 dias, observamos uma redução estatisticamente significativa da concentração de colágeno ($p < 0,001$), havendo uma redução da ordem de 25% neste período. No grupo de fáschia, contudo, não houve diferença entre as amostras de 90 e 180 dias ($p = 0,08$), com variação da ordem de 6% da concentração de colágeno no período. No grupo controle, também não houve diferença entre 90 e 180 dias (Gráfico 3).

DISCUSSÃO

O método da picrossírius-polarização tem contribuído significativamente para a identificação e compreensão do colágeno e de suas funções. A especificidade do método é baseada na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante ácido (Sírius-red). Essa reação aumenta a birrefringência normal do colágeno, composto por moléculas agregadas. A diferenciação dos tipos do colágeno também é possível, sendo o tipo I fortemente birrefringente, fibras espessas amarelas ou vermelhas; tipo III pouco refringentes, esverdeados e o tipo II ainda menos refringentes^{20,21}.

A presença de um arranjo anormal das fibras do colágeno caracteriza o desenvolvimento de uma cicatriz ou fibrose³. Em nosso estudo foi freqüente esse desarranjo do colágeno quando comparado com a distribuição do colágeno do músculo vocal do coelho em todos os grupos. Essa alteração foi muito mais identificada nos grupos submetidos a enxerto de gordura, caracterizada por desarranjo em blocos envoltos por colágeno espesso. Nos grupos F1 e F2 (enxerto de fáschia), a distribuição é fusiforme e mais compacta.

A literatura é repleta de artigos que enfatizam o processo inflamatório conseqüente à enxertia de materiais nas pregas vocais, com qualificação e tipagem celular, na tentativa de corrigir defeitos pré-existentes ou mesmo voluntariamente causados na lâmina própria^{22,23}. No entanto, estudos que objetivam estudar o processo cicatricial causado pela manipulação e pelo enxerto são raros. Thibealt et al. (2002)²⁴, em estudo histológico e reológico da cicatriz produzida na lâmina própria após manipulação cirúrgica, encontraram menor densidade do colágeno associado à desorganização tecidual. O presente estudo faz uma avaliação do processo cicatricial quando comparado ao músculo vocal, sendo encontrado maior densidade além de desorganização tecidual. Esse fato sugere que a gordura é metabolicamente mais ativa do que a fáschia, estimulando uma maior deposição do colágeno cicatricial.

Acredita-se que a baixa taxa metabólica e a ultra-estrutura composta principalmente por fibrócitos e matriz extracelular de colágeno são as principais responsáveis pela longevidade do enxerto de fáschia muscular nas pregas vocais¹⁶. Reijonen et al. (2001)¹⁵, após injeção de fáschia lata na prega vocal paralisada de nove cães, identificaram que a fáschia muscular não promoveu reação inflamatória intensa e

a mesma foi identificado até após 12 meses da injeção. Duke et al. (2001)¹⁸ em estudo clínico em pacientes previamente submetidos à injeção de gordura obtiveram 95% de melhoria nos padrões de análise acústica da voz.

A prega vocal do coelho é similar à prega vocal humana demonstrando divisão por camadas e presença de células da matriz extracelular como o colágeno. Uma limitação para o presente estudo deve-se ao fato das pregas vocais dos coelhos não apresentarem as mesmas forças mecânicas de vibração da prega vocal humana. Tem sido mostrado que essas forças podem estimular o "turn-over" do colágeno com conseqüente alteração na deposição das fibras²⁵. De qualquer forma esses achados sugerem que embora a enxertia promova maior deposição de colágeno no processo cicatricial, esse processo é mais exuberante com gordura do que com a fásia. Entretanto, ainda são necessários estudos das propriedades reológicas das pregas vocais enxertadas com gordura e fásia para melhor definição do melhor enxerto.

CONCLUSÃO

O estudo permite concluir que a enxertia de gordura e fásia lata na prega vocal de coelho promoveu maior deposição de colágeno do que no grupo controle, sendo mais exuberante na inserção de gordura. Houve alteração na distribuição das fibras colagênicas após enxerto de fásia e de gordura, também mais alterado no grupo gordura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ford CN, Bless DM. Clinical experience with injectable collagen for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 1986; 96: 863-9.
2. Benninger MS, Crumley RL, Ford CN, Gould WJ, Hanson DG, Ossoff RH, Sataloff RT. Evaluation and treatment of the unilateral paralyzed vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 497-598.
3. Kriesel KJ, Thibealt SL, Vangroll PJ, Chan RW, Bless DM, Suzuki T, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111:884-9.
4. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4^{ed}. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara-Koogan; 1991.
5. Peacock EE. *Wound Repair*. 3^{ed} ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1984.
6. Rubin HJ. Misadventure with injectable polytetrafluoroethylene (Teflon). *Arch Otolaryngol* 1975; 101:238-46.
7. Rosen CA. Phonosurgical vocal fold injection: indications and techniques. *Operat Techniq Otolaryngology Head Neck Surg* 1998; 9:203-9.
8. Schramm VL, May M, Lavorato AS. Gelfoam paste injections for vocal fold paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence. *Laryngoscope* 1978; 88:1268-73.
9. Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: A Preliminary Clinical Study. *Laryngoscope* 1995; 105:944-8.
10. Courey MS. Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 2001; 111:747-58.
11. Shindo ML, Zaretsky LS, Rice DH. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Laryngol* 1996; 105:602-6.
12. Chan RW, Titze IR. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. *Laryngoscope* 1998; 108:725-31.
13. Boyce RG, Nuss DW, Kluka EA. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27:39-68.
14. Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long-term results of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Laryngol* 1995; 104:871-4.
15. Reijonen P, Leivo I, Nevalainen T, Rihkanen H. Histology of injected autologous fascia in paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2001; 111:1068-74.
16. Rihkanen H, Soderlund-Lehikoinen, S, Reijonen P. Voice acoustics after autologous fascia injection for vocal fold paralysis. *Laryngoscope* 1999; 109:1854-7.
17. Imamura R, Sennes LU, Chung D, Bohadana S, Tsuji DH. Injeção de gordura na prega vocal: efeitos do local de injeção sobre a configuração glótica e a distribuição espacial da gordura injetada. *Rev Bras Otolaryngol* 2003; 69:445-50.
18. Duke SG, Salmon S, Blalock D, Postma GN, Koufman JA. Fascia augmentation of the vocal fold: graft yield in the canine and preliminary clinical experience. *Laryngoscope* 2001; 111:759-64.
19. Duprat AC, Costa HO, Eckley CA, Pupo DB, Rossi HH. Implante de gordura no espaço de Reinke para correção de alterações histoestruturais das pregas vocais. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2001; 67:78-83.
20. Montes GS, Junqueira LCU. The use of picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86 (suppl III): 1-11.
21. Melo ECM, 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; 113:2187-91.
22. Rodgers BJ, Abdul-Karim FW, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. *Laryngoscope* 2000; 110:2012-5.
23. Woo P, Rahbar R, Wang Z. Fat implantation into Reinke space: A histological and stroboscopic study in the canine. *Ann Otol Laryngol* 1999; 108:738-44.
24. Thibealt SL, Gray SD, Bless DM, Chan, RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002; 16:96-104.
25. Bishop, JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today* 1998; 4(2):69-75.