

# *Ultra-estrutura do Músculo Vocal Denervado Mecanicamente em Suínos (Sus Scrofa Domestica)*

## *Ultra Structure of the Denervated Vocal Muscle Mechanically in Hogs (Sus Scrofa Domestica)*

**Henrique Zaquia Leão\***, **Paulo Augusto de Lima Pontes\*\***, **Jose Rafael Rosito Coiro (In Memoriam)\*\*\***, **Mariane Lamberts\*\*\*\***.

\* Mestre em Ciências Otorrinolaringológicas pela Unifesp. Professor Adjunto de Anatomia Humana da ULBRA.

\*\* Livre Docente em Otorrinolaringologia pela Unifesp-EPM. Professor Titular de Otorrinolaringologia da Unifesp-EPM.

\*\*\* Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo. Professor Adjunto do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS.

\*\*\*\* Graduada em Medicina Veterinária. Médica Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinária da UFRGS.

Instituição: Universidade Luterana do Brasil.  
Canoas / RS – Brasil.

Endereço para correspondência: Henrique Zaquia Leão – Avenida Farroupilha 8001, Bairro São Luis. Canoas / RS – Brasil – CEP: 92425-900 – Telefone: (+55 51) 9973-3356 – E-mail: anato.leao@gmail.com

Artigo recebido em 13 de Setembro de 2009. Artigo aprovado em 6 de Março de 2010.

### RESUMO

**Introdução:**

A literatura não é clara nas manifestações ultra-estruturais das pregas vocais após lesão neural.

**Objetivo:**

Verificar as alterações que ocorrem numa prega vocal mecanicamente denervada.

**Método:**

Neste estudo prospectivo, foram utilizados 15 suínos de raça comercial (*Sus scrofa domestica*), com idade de 4 a 12 semanas. Os animais foram distribuídos em três grupos, escolhidos aleatoriamente. Todos foram submetidos à denervação da prega vocal direita, com remoção cirúrgica de um segmento com três centímetros do nervo laríngeo recorrente direito. Após 45, 90 e 180 dias das operações, procedeu-se a biópsia dos músculos vocais, processaram-se as amostras para microscopia eletrônica de transmissão e, para o estudo ultra-estrutural, utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão Philips, modelo EM208S.

**Resultado:**

Os grupos biopsiados com 45 e 90 dias após a operação de denervação mecânica, apresentaram desorganização miofibrilar, linhas Z somente vestigiais em muitas amostras, bem como mitocôndrias alteradas apresentando tamanhos reduzidos, e matriz mitocondrial rarefeita com raras cristas mitocondriais presentes. O grupo biopsiado com 180 dias após a operação de denervação, apresentou sarcômeros regulares, mitocôndrias com tamanhos e número regulares com posicionamento correto entre as unidades sarcoméricas.

**Conclusão:**

Os achados na ultra-estrutura dos músculos vocais sugerem a reinervação do músculo sendo que as mitocôndrias musculares foram as estruturas mais sensíveis à condição denervada, seguidas pela citoarquitetura das miofibrilas; os achados na ultra-estrutura dos músculos vocais sugere a reinervação do músculo no período de aproximadamente seis meses.

**Palavras-chave:**

denervação muscular, microscopia eletrônica de transmissão, atrofia muscular, laringe, *sus scrofa*.

### SUMMARY

**Introduction:**

The literature is not clear in the ultra-structural manifestations of the vocal wrinkles after neural wound.

**Objective:**

To verify the alterations that occur in a vocal fold mechanically denervated.

**Method:**

In this prospective study, it were utilized 15 hogs of commercial race (*Sus scrofa domesticates*), with age of 4 to 12 weeks. The animals were distributed in three groups, chosen at random. Everybody was submitted to the denervation of the right vocal fold, with surgical removal of a segment with three centimeters of the recurring right laryngeal nerve. After 45, 90 and 180 days of the operations, it was proceeded the biopsy of the vocal muscles, it was prosecuted the samples for transmission electron microscopy and, for the ultra-structural study, utilized the transmission electron microscopy Philips, model EM208S.

**Results:**

The biopsied groups with 45 and 90 days after operation of mechanical denervation, presented disorganization miofibrilar, only vestigial lines Z in many samples, as well like altered mithochondrions presenting limited sizes, and matrix mithochondrial rarefied with rare mithochondrial cristae present. The biopsied group with 180 days after operation of denervation, presented regular sarcomeres, mithochondrions with sizes and regular number with correct positioning between the sarcomerical units.

**Conclusion:**

The finds in the ultra-structure of the vocal muscles suggest to re enervation of the muscle being that the muscular mithochondrions were the most sensible structures to the denervated condition, successions by the cytoarchitecture of the miofibrilas; the finds in the ultra-structure of the vocal muscles suggests to reinervation of the muscle in the period of approximately six months.

**Keywords:**

muscle denervation, transmission electron microscopy, muscle atrophy, larynx, *sus scrofa*.

## INTRODUÇÃO

É importante para este trabalho, uma descrição, mesmo breve, do nervo laríngeo recorrente ou nervo laríngeo inferior. Este nervo tem sua origem no nervo vago com um trajeto no interior da bainha carotídea, entre a artéria carótida e a veia jugular interna. Na altura do arco aórtico, na região mediastínica, o nervo vago esquerdo se ramifica para formar o nervo laríngeo recorrente esquerdo que, contornando o arco aórtico inferiormente, alcança o sulco entre a traqueia e o esôfago e depois, ascende para penetrar na laringe, entre a cartilagem cricoide e a cartilagem tireoide. Este nervo penetra o músculo cricoaritenóideo látero-posteriormente. No lado direito, na altura da artéria subclávia, o nervo vago dá origem ao nervo laríngeo recorrente direito que, do mesmo modo que o nervo laríngeo recorrente esquerdo, percorre o sulco traqueoesofágico, alcança a laringe e penetra látero-posteriormente, o músculo cricoaritenóideo posterior.

Os nervos laríngeos recorrentes inervam todos os músculos intrínsecos da laringe, exceto o músculo cricotireóideo; este recebe um ramo externo do nervo laríngeo superior. É importante dizer que os músculos com fixação na laringe podem ser classificados como extrínsecos ou intrínsecos. Os músculos extrínsecos possuem um ponto de fixação externa e outra inserção nas cartilagens laríngeas. Este grupo muscular constitui um sistema suspensório da própria laringe. Os músculos intrínsecos possuem todas as suas inserções localizadas nas estruturas próprias da laringe. Estes, são responsáveis pelos movimentos articulatorios entre as cartilagens. Incluem, na parede externa da laringe, o músculo cricotireóideo e, nos espaços internos, os músculos interaritenóideo, tireoaritenóideo, vocal, cricoaritenóideo posterior e lateral. Formando o corpo de cada prega vocal, segundo Hirano (1), encontraremos o músculo vocal.

O músculo vocal foi considerado, antes da *Nomina Anatômica* de 1998, como a porção interna do músculo tireoaritenóideo, estando hoje, categorizado como um músculo independente.

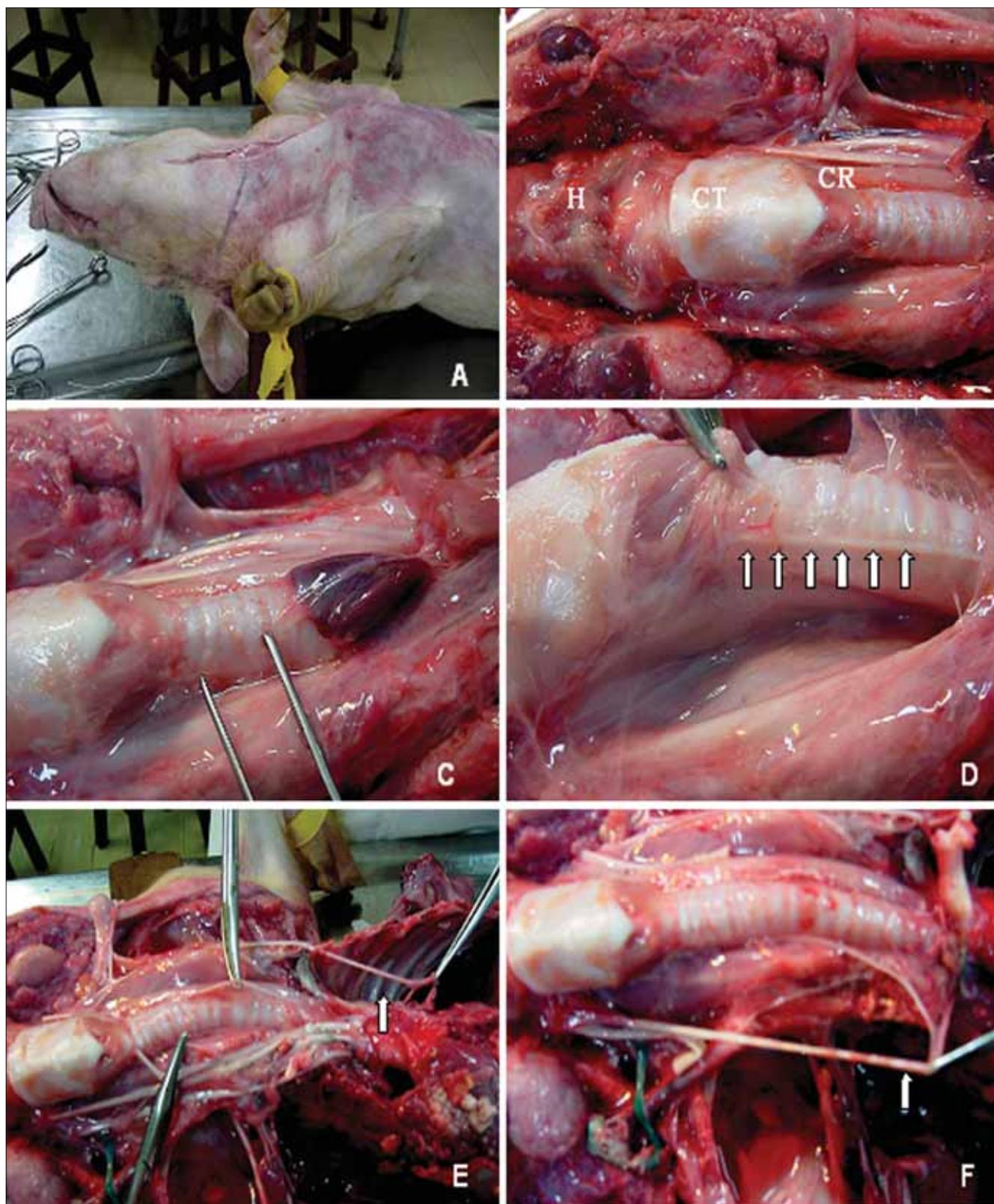
Os nervos laríngeos do porco doméstico (*Sus scrofa domestica*), apresentam, em aspecto geral, a mesma origem, ramificação e distribuição apresentada pela inervação laríngea humana (ALAJMO e SALIMBENI (2)). O nervo laríngeo superior (NLS) origina-se a partir do nervo vago, no gânglio nodoso, dividindo-se em dois ramos: o nervo laríngeo externo (NLE) e o nervo laríngeo interno (NLI). O ramo interno é uma continuidade do nervo laríngeo superior que, na região látero-posterior da membrana tireoideia, penetra a laringe para garantir a sensibilidade supraglótica. O ramo externo é mais fino e percorre externamente para

alcançar o músculo cricotireóideo (CT). O nervo laríngeo recorrente (NLR), origina-se no nervo vago, penetrando como um nervo inferior na laringe, através da região látero-posterior da membrana cricotireoideia, por entre o arco cricoide e a lâmina da cartilagem tireoideia. O nervo laríngeo recorrente é o responsável pela motricidade de todos os músculos intrínsecos da laringe, com exceção do músculo cricotireóideo. Também é importante referir que o nervo laríngeo recorrente provê a porção caudal da mucosa da prega vocal, com fibras sensitivas de acordo com STAVROULAKI & BIRCHALL (3).

Assim como acontece no homem, o NLR esquerdo, logo depois de ramificar a partir do nervo vago, passa sob o arco aórtico (Figura 1E) e alcança o espaço da junção tráqueo-esofágica, por onde ascende. O NLR direito, ramifica em ponto mais alto e cursa por baixo da artéria subclávia direita (Figura 1F), também ascendendo na junção tráqueo-esofágica (Figura 1D).

KURITA et al (4) estudou as pregas vocais de dez espécies animais, usando as pregas vocais humanas como padrão referencial para comparações morfológicas. O autor mostra que os porcos têm pregas vocais com dimensões similares às dos humanos e, na comparação com outras espécies, as propriedades mecânicas das pregas vocais dos suínos constituem aquelas que podem ser melhor avaliadas e comparadas com as pregas vocais dos seres humanos, embora o referido autor tenha cuidado em não destacar que tal fato permita inferir que os porcos possam ser modelos experimentais definitivos e adequados para a fonação. O comprimento da porção membranácea da glote, em porco macho adulto mediu dezoito milímetros comparados aos quinze milímetros encontrados, em média, na porção membranácea da glote humana masculina. Juntando-se o epitélio mais a lâmina própria da mucosa glótica, o porco mostrou uma espessura de 0,9mm e o homem apresenta 1,1mm. Na estratigrafia da lâmina própria do homem adulto, de acordo com HIRANO (1), encontramos três camadas: camada superficial, conhecida também como espaço de Reinke, composta de tecido conjuntivo frouxo; camada intermediária, com predominância de fibras elásticas e camada profunda, com predominância de fibras colágenas. Na lâmina própria da mucosa glótica do porco adulto (KURITA (4)), encontramos duas camadas pouco distinguíveis, classificadas como camada superficial, onde predominam as fibras elásticas, e camada profunda, onde predominam as fibras colágenas.

De acordo com GORTI et al (5), a laringe porcina é uma estrutura cilíndrica, constituída por paredes de natureza cartilaginosa, pericôndrio, músculo esquelético, tecido conjuntivo e mucosa. É possível observar que os espaços endolaríngeos podem ser compartimentalizados como se faz com a laringe humana: região glótica, incluindo as



**Figura 1.** Aspectos anatômicos de referência na região cérvico-ventral do porco. A, incisão mediosagital na região cérvico-ventral, para acesso ao conteúdo. B, pontos de referência: H, osso hioide; CT, cartilagem tireoide; CR, cartilagem cricoide. C, a pinça mostra a região junto à traqueia, onde o nervo laríngeo recorrente é buscado. D, nervo laríngeo recorrente direito (setas). E, a imagem mostra o nervo laríngeo recorrente esquerdo originando-se no mediastino e cursando por baixo do arco aórtico (seta). F, o nervo laríngeo recorrente direito cursa por baixo da artéria subclávia direita (seta).

**Quadro I. Comparação entre a laringe do porco e a laringe humana.**

Estrutura morfológica	Porcina	Humana
Forma da cartilagem Cricoide	- elíptica	- aneliforme
Cartilagem tireoide	- comprimida lateralmente - alongada verticalmente - não possui cornos superiores.	- lâminas planas - porção ventral em carena
Ligamento vocal	- irradiado lateralmente e projetado anteriormente - não possui comissura anterior	- introduzido na comissura anterior
Membrana mucosa		
- epitélio supraglótico	- estratificado escamoso	- pseudoestratificado, cilíndrico ciliado
- espessura	- 0,9mm.	- 1,1mm
- cone elástico	- não possui	- contínuo com o ligamento vocal
- lâmina própria	- duas camadas pouco distintas (superficial e profunda)	- três camadas (superficial - espaço de Reinke, intermediária e profunda)
Glote membranácea (em machos, adultos)	- 18mm de comprimento - epitélio escamoso no bordo livre	- 15mm de comprimento - epitélio escamoso no bordo livre
Vasos sanguíneos	- uma artéria e uma veia de cada lado	- duas artérias e duas veias de cada lado

pregas vocais e sua rima; região supraglótica, incluindo ventrículo, pregas vestibulares e vestibulo; região infraglótica, inferior e posterior à glote, até alcançar a base da cartilagem cricóidea.

O esqueleto laríngeo do porco é muito similar ao esqueleto laríngeo humano. Observam-se três cartilagens únicas que são a epiglote, a tireoide e a cricoide, além de outras duas cartilagens pares, ditas corniculadas e aritenoides.

Deve-se enfatizar que os músculos intrínsecos são similares aos músculos laríngeos humanos. A única diferença está no músculo interaritenóideo que é mais volumoso no porco (GORTI et al (5)). Assim como acontece com o cavalo, o cachorro, o macaco e o coelho, o porco está entre os animais, usados na experimentação, que possuem ventrículo laríngeo, caráter que define a presença da prega vestibular (KURITA et al (4)).

O quadro, segundo GORTI et al (5) associando com as informações de KURITA et al (4), modificado por nós, apresenta semelhanças e diferenças entre a laringe porcina e a laringe humana.

STAVROULAKI & BIRCHALL (3) afirmam que informações detalhadas sobre a anatomia do porco estão cada vez mais importantes. Vários fatores interagem para aumentar a importância deste conhecimento. Em laringologia, é possível classificar tais fatores sob diferentes prismas, como por exemplo, na pesquisa em transplante da laringe, na pesquisa fonatória e na pesquisa das doenças laríngeas.

Os porcos são facilmente disponíveis, têm capacidade de vocalização, o comportamento dócil, morfologia

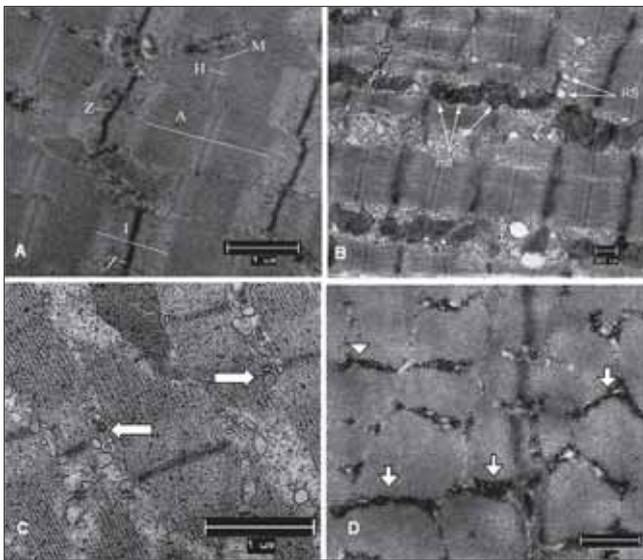
robusta e são fáceis de higienizar. A desvantagem em usar o porco como modelo, aparece nas pesquisas em que é preciso mantê-lo por alguns meses. Nestes casos, os porcos podem alcançar massa corpórea difícil de manusear e administrar medicamentos ou alimentação.

Na pesquisa fonatória, as laringes de cães têm sido utilizadas como modelo animal há mais de dois séculos. Entretanto, de uma perspectiva estrutural, a laringe suína é modelo fonatório vantajoso sobre a laringe canina (JIANG et al (6)).

STAVROULAKI e BIRCHALL (3), em estudo comparativo da inervação laríngea em humanos, porcos, cães, gatos e ratos, concluíram que a inervação geral do porco lembra a inervação humana em origem, ramificação e distribuição geral.

Na microscopia eletrônica de transmissão, usando-se a técnica de fixação com glutaraldeído e contrastação com citrato de chumbo mais tetróxido de ósmio, a organização sarcomérica clássica da musculatura esquelética é bem visível e definida. Cada banda clara ou isotropa (banda I) é atravessada por uma linha ou disco chamado Z. A banda escura ou anisótropa (banda A), apresenta a banda H que, por sua vez, possui a linha M (Figura 2A). Entre os campos de miofibrilas, observam-se acúmulos de grânulos de glicogênio (Figura 2D).

Nos mamíferos, as mitocôndrias localizam-se preferencialmente na região da banda I, enrolando-se na periferia da miofibrila (Figura 2B). Aparecem em grande número e entremeadas com os miofilamentos. Isto é visível nos cortes longitudinais e, principalmente, nos



**Figura 2.** Ultra-estrutura normal do músculo vocal do suíno (*Sus scrofa domestica*). A, ultra-estrutura da fibra muscular esquelética normal do suíno, mostrando as bandas isotrópicas (I) com a presença central da linha Z e bandas anisótropas (A) com a presença da banda central H, atravessada pela linha M; B, as mitocôndrias ocupam os espaços intersarcoméricos (mit). C, nos mamíferos, as tríades (setas) se localizam nas junções das bandas A e I. D, entre os campos de miofibrilas, é frequente uma grande quantidade de grânulos de glicogênio (cabeças de setas). Aumentos: 10000x nas imagens A e D; 13000x nas imagens B e C.

cortes transversais, nos quais se observa, nitidamente, a distribuição das mitocôndrias em íntima relação com os miofilamentos. As mitocôndrias do músculo esquelético normal apresentam-se com cristas bem visíveis.

As cisternas do retículo sarcoplasmático - RS e os túbulos do sarcolema, que formam as tríades, são bem visíveis e diferenciáveis, localizando-se na junção das bandas A com as bandas I (Figura 2C). O glicogênio apresenta-se em grânulos escuros e em quantidade suficiente, principalmente em íntima relação com os miofilamentos (Figura 2D). Os núcleos, sempre múltiplos e periféricos, mostram uma cromatina com distribuição característica e com um nucléolo que, quando visível, apresenta uma relação núcleo/nucléolo que corresponde a 2,5:1,0. Nos espaços entre as fibras musculares, observa-se um tecido de sustentação denominado endomísio. Neste, muitas vezes, são visíveis os fibroblastos, bem como, delicadas fibrilas colágenas que são diferenciáveis pela estrutura característica de bandas transversais. Em alguns cortes aparecem pequenos capilares contínuos circundados pelo tecido de sustentação endomisial.

Com a utilização da microscopia eletrônica de transmissão, podemos estudar o comportamento das mitocôn-

drias; uma das organelas que permitem diagnosticar o estado de atividade metabólica da célula. As mitocôndrias costumam apresentar uma distribuição definida de acordo com o tipo celular. Localizam-se muito próximas das estruturas que exigem trifosfato de adenosina (ATP) para exercer sua função normal. A contração muscular depende da transferência de energia a partir das mitocôndrias. A associação íntima entre mitocôndrias e os sarcômeros, minimiza a distância de difusão e facilita a conversão de energia química em energia mecânica.

SHINDO et al (7) estudou as alterações funcionais e histomorfométricas de músculos laríngeos denervados em 14 cães adultos, realizando remoção cirúrgica de 2,5cm do nervo laríngeo recorrente direito. Observou atrofia em aproximadamente três meses e, depois deste período, constatou a reinervação dos músculos.

KAWAKITA et al (8) promoveu a denervação unilateral do músculo interaritenóideo em *Cavia porcellus*, seccionando NLS e NLR. Cinco semanas depois da denervação, todo o músculo interaritenóideo estava recuperado, confirmando que, embora o músculo tenha uma inervação bilateral, é neurologicamente suprido como um todo.

Temos poucos trabalhos nesta linha de pesquisa e não encontramos estudo sobre efeitos da denervação unilateral, cronologicamente acompanhado, que tenha sido realizado em porcos.

O objetivo deste trabalho propõe verificar quais estruturas musculares das pregas vocais, sofrem alterações quando há denervação com a manutenção circulatória; verificar a possibilidade de reinervação de uma prega vocal mecanicamente denervada, mantendo a prega contralateral neurologicamente suprida; verificar se, havendo recuperação muscular, quanto tempo após a denervação, pode se observar as manifestações ultra-estruturais indicadoras de restabelecimento estrutural.

## MÉTODOS

O uso de pregas vocais de laringes animais para investigação, ocorre em razão da impossibilidade ética de trabalharmos com pregas vocais humanas. Além disso, para estudos na microscopia eletrônica, a peça deve ser coletada *in vivo*, antes que possa ocorrer autólise que tem seu início, segundo RHODIN (1954) apud SANTANDER (9), após três minutos de suspensão da circulação sanguínea.

Utilizaram-se suínos de raça comercial (*Sus scrofa domestica*), com idade de 4 a 12 semanas. O peso inicial médio (PIM), dos animais, no momento da denervação



**Figura 3.** Denervação da prega vocal direita. A, visualização e pinçamento do nervo laríngeo recorrente. B, segmento excisado do nervo laríngeo.

(primeira fase - PF), foi de 24,66kgf. O peso final médio (PFM), no momento da biópsia, foi de 57,2kgf para os animais operados após 45 dias de denervação; 97,8kgf para os animais após 90 dias e, 149,8kgf, para os animais operados após 180 dias.

Os animais foram distribuídos em três grupos, escolhidos aleatoriamente. Todos foram submetidos a denervação do nervo laríngeo recorrente direito, com remoção cirúrgica de um segmento com três centímetros. A escolha do nervo laríngeo recorrente direito está baseada na constatação de que o esquerdo transita pelo mediastino e pode, durante a vida do animal, sinalizar alterações nos órgãos deste espaço.

Um grupo, constituído de 5 animais (dois machos orquiectomizados, um macho não orquiectomizado e duas fêmeas), foi mantido por 45 dias após a denervação (Grupo I); outro grupo, de 5 suínos (dois machos orquiectomizados, um macho não orquiectomizado e duas fêmeas), foi mantido por 90 dias após a denervação (Grupo II) e, um terceiro grupo, também com 5 suínos (dois machos orquiectomizados, um macho não orquiectomizado e duas fêmeas), foi mantido por 180 dias após a denervação (Grupo III). Os três suínos não orquiectomizados foram incluídos como controle morfológico do músculo vocal sob influência dos hormônios testiculares.

O estudo foi dividido em duas fases. Na primeira fase da denervação, realizou-se a cervicotomia frontal para remoção cirúrgica de um segmento de três centímetros do nervo laríngeo recorrente direito, na altura da traqueia cervical. Na segunda fase, desenvolveram-se três procedimentos: biópsia, ressecção laríngea e morte do animal. Realizada aos 45, 90 e 180 dias depois da fase de denervação, procedeu-se outra cervicotomia para biópsia do músculo vocal das pregas direita e esquerda.

Fragments do músculo vocal foram coletados e mergulhados em fixador "S" 2% para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Posteriormente, a laringe foi removida e fixada em formaldeído a 10%. Removida a laringe, os animais foram mortos com injeção de KCl, na veia jugular. Todos os animais foram pesados com o fim precípua de preparação da solução anestésica adequada.

### Denervação

Nesta fase, todos os animais receberam uma aplicação IM de flunixin meglumina (Flumegam®50mg), calculando-se 1,1mg/kgf. Após intervenção, receberam uma dose de antibiótico (Pentabiótico®), com fins profiláticos. A flunixin meglumina é um analgésico não narcótico, não esteroide (AINEs), com propriedades antiinflamatória, analgésica e antipirética.

### Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

**Fixação:** o material biopsiado, foi imediatamente colocado em solução fixadora contendo glutaraldeído a 25% em tampão Millonig, (Millonig (10) - 2X concentrado pH 7,3 - mais H<sub>2</sub>O Milli - Q® em temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens, em tampão Millonig isotônico, por trinta minutos cada. **Pós-fixação em tetróxido de ósmio:** para a pós-fixação com tetróxido de ósmio, o material permaneceu mergulhado durante 45min e após foi submetido a três lavagens em solução salina a 0,85%, por trinta minutos cada. **Contrastação:** o material foi contrastado, *en bloc*, com acetato de uranila em solução aquosa a 2%, por 30min, seguido de três lavagens em solução salina a 0,85%, por 30min em cada passagem. **Desidratação:** a desidratação processou-se em série alco-

ólica de 30%, 50%, 70%, 95% e 100%. Todas as passagens com duração de 10 minutos, com exceção das duas últimas que tem duração de 30 minutos. **Pré-embebição, embebição, inclusão:** a pré-embebição dos materiais (Figura 06) foi feita em uma mistura de EMBED 812 (*Epon substitute*) com acetona pura. Todo o processo de pré-embebição foi executado no equipamento denominado *Rotator (Roto-torque*, da Cole-Parmer Instrument Company), garantindo movimento circular, regular e contínuo, para infiltrar a resina por todas as faces da amostra. A embebição foi feita com EMBED 812 (*Epon substitute*) puro durante 24 horas, no *Rotator*. Para a inclusão foram usados moldes de plástico e a polimerização foi efetuada em estufa, com temperatura constante de 60°C, por 72 horas. Os cortes semifinos foram feitos no ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) sendo utilizada navalha de diamante *Drukker type bisto with trough 8mm* (Figura 6d), com uma espessura de 800nm e corados com solução aquosa de azul de toluidina a 1% e, na proporção de 1:1, tetraborato de sódio a 0,065% e fucsina básica a 0,1%. Para a contrastação final dos cortes ultrafinos sobre tela suporte, utilizamos o citrato de chumbo (REYNOLDS (11)). Para o estudo ultra-estrutural, utilizamos um Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips, modelo EM208S.

As amostras, em telas suporte de cobre com 300 mesh, foram avaliadas e documentadas com aumentos de 4.000, 6.000, 8.000, 10.000 e 13.000 e 40.000 vezes. Durante a observação, selecionamos áreas para registro eletromicrográfico em negativos, marca Kodak®So603, com dimensões de 6,5cm por 9,0cm.

### **Análise quantitativa e qualitativa da ultra-estrutura do músculo vocal**

Os procedimentos de análise foram realizados com reversão, para o positivo, dos negativos eletromicrográficos. Optamos pelo aumento de 10.000x para realizar as medidas ultra-estruturais. Estas medidas foram realizadas com o programa Carnoy, desenvolvido pelo *Lab of Plant Systematics* da *Katholieke Universiteit Leuven* da Bélgica (disponível em <http://www.carnoy.org/>).

Produzimos 247 eletromicrografias para avaliar o músculo vocal denervado e o músculo vocal controle (inervado), nos grupos biopsiados em 45 dias, 90 dias e 180 dias após a operação que removeu um segmento do nervo laríngeo recorrente direito. Procedemos 1027 medidas dos menores diâmetros mitocondriais para avaliar as respostas à denervação mecânica. No grupo de pregas vocais biopsiadas em noventa dias após a denervação, em animais não orquiectomizados, poucas mitocôndrias foram encontradas para mensuração. Realizamos uma descrição para cada eletromicrografia, nos grupos denervados e nos gru-

pos controle, para então avaliar, em conjunto, as morfologias apresentadas.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada pelo Professor Mestre Brasília Ricardo Cirillo da Silva, professor de Estatística dos cursos de Graduação e Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC-RS, Centro Universitário Ritter dos Reis - UNIRITTER e Instituto Porto Alegre da Rede Metodista de Educação - IPA, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. As análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 11, para Windows. A análise de variâncias, ANOVA, foi realizada para comparar os músculos das pregas vocais esquerdas (PVE) e pregas vocais direitas (PVD), nos três períodos de pós-denervação (45, 90 e 180 dias). O teste t, de *student*, foi realizado para comparar dois grupos de músculos das pregas vocais.

### **Bioética**

Seguindo as orientações do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, sob inscrição CEP N° 0426/02, que analisou e aprovou em 21 de junho de 2002.

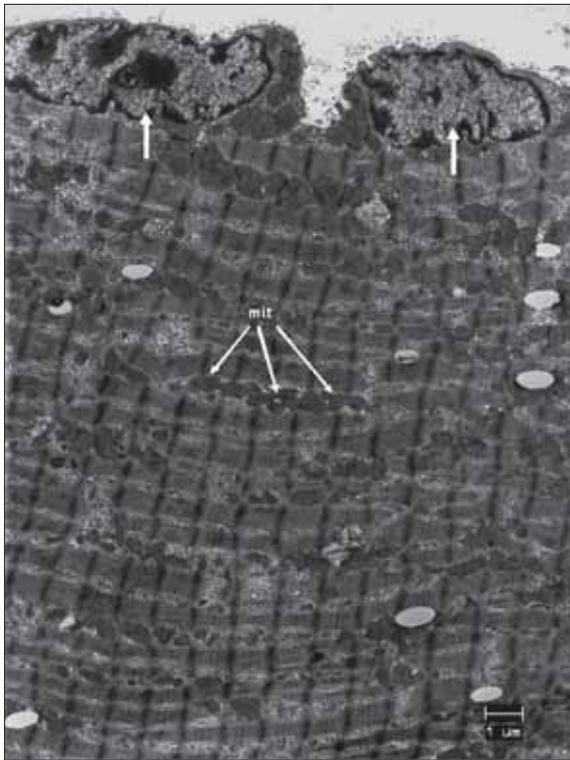
## **RESULTADO**

### **Ultra-estrutura do músculo vocal**

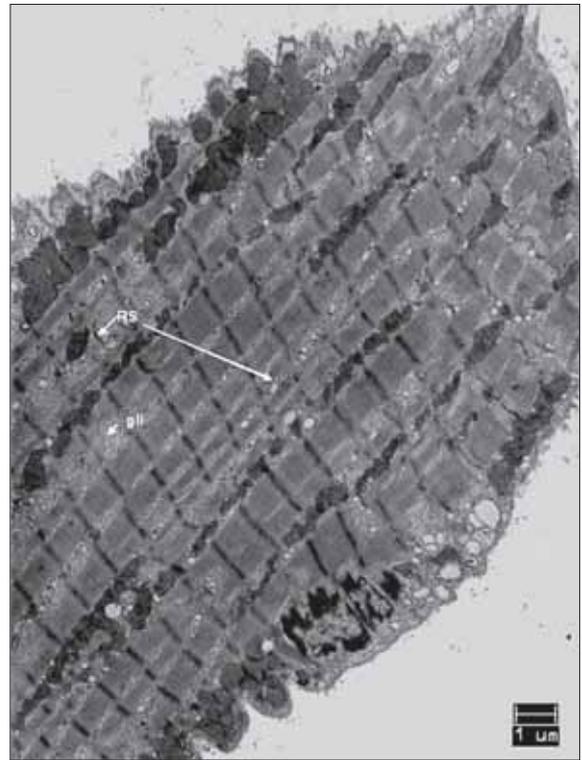
As eletromicrografias do material investigado sob microscopia eletrônica de transmissão - MET foram classificadas em três grupos, usando como critério o tempo decorrido desde a denervação mecânica até o dia da biópsia.

#### **Unidades de controle**

As pregas vocais esquerdas que foram mantidas inervadas, embora tenham sido biopsiadas de acordo com os tempos determinados para os diferentes grupos, apresentaram as mesmas características entre si e também correspondentes à ultra-estrutura esperada para um músculo esquelético normal. Encontramos núcleos excêntricos e organizados com cromatina apresentando áreas granulares densas junto a periferia e envolvendo o nucléolo (Figura 4). Os sarcômeros são regulares com apresentação bem definida das estrias Z e das bandas I, A e H. As cisternas do retículo sarcoplasmático, assim como as tríades, mos-



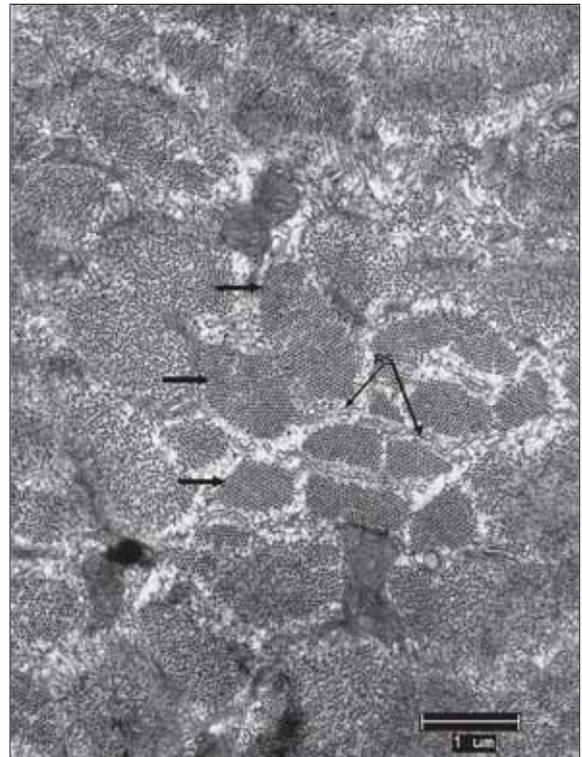
**Figura 4.** Músculo da prega vocal esquerda. Organização regular dos sarcômeros. Dois núcleos bem organizados em posição periférica (setas). Abundante número de mitocôndrias (mit), linearmente ordenadas. Aumento: 4000x. RS



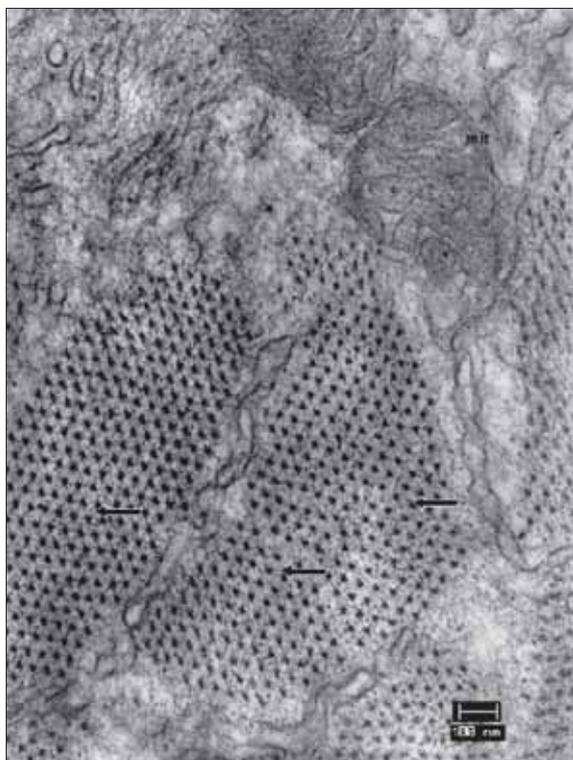
**Figura 5.** Músculo da prega vocal esquerda. Sarcômeros bem visíveis e organizados. Linhas ordenadas com abundante número de mitocôndrias. Glicogênio (gli), acompanhando os espaços do RS. Aumento: 4000x. RS



**Figura 6.** Músculo da prega vocal esquerda. Sarcômeros bem organizados. Abundante número de mitocôndrias (mit) e de grânulos de glicogênio (gli). Cisternas do RS cortadas transversalmente. Aumento: 13000x.



**Figura 7.** Músculo da prega vocal esquerda. Corte transversal dos miofilamentos (setas). Feixes perfeitamente organizados e separados por retículo sarcoplasmático - RS. Aumento: 10.000X



**Figura 8.** Músculo da prega vocal esquerda. Detalhe das miofibrilas em corte transversal, mostrando arranjo cristalino das miosinas e actinas (setas). O retículo sarcoplasmático (RS) envolve os campos miofibrilares (campos de Cohnheim). No alto, duas mitocôndrias (mit) apresentando cristas bem desenvolvidas. Aumento: 40000x.



**Figura 9.** Músculo da prega vocal após 45 dias de denervação. Forte desagregação das miofibrilas (setas). Linhas Z regulares. Bandas H pouco visíveis. Aumento: 10000x.

tram-se íntegras. Juntamente com as cisternas dos retículos e com as mitocôndrias, encontra-se abundante grânulos de glicogênio (Figuras 5 e 6). Em cortes transversais, são nítidos os campos de miofibrilas envolvidos por retículo sarcoplasmático - antigos campos de COHNHEIM (Figuras 7 e 8). Os animais não orquiectomizados, também biopsiados nos períodos de 45, 90 e 180 dias após a denervação da prega vocal direita, também apresentaram uma ultra-estrutura normal no músculo vocal da prega que foi mantida com o nervo laríngeo recorrente, ou seja, a prega vocal esquerda.

### **Unidades testadas**

As pregas vocais direitas - unidades testadas, mecanicamente denervadas, também foram biopsiadas para obter músculo vocal, aos 45, 90 e 180 dias após a operação, definidos como Grupo I, II e III.

### **Grupo I (45 dias pós-denervação)**

O grupo I, biopsiado com quarenta e cinco dias após a operação de denervação muscular, apresentou desorga-

nização miofibrilar que desagregou a arquitetura sarcomérica, deixando indistintas as bandas anisótropas e as bandas isotrópicas (Figura 9). Em muitas amostras, as linhas Z mostraram-se vestigiais. As mitocôndrias mostraram-se alteradas em relação ao controle, apresentando tamanhos reduzidos, menor número e conteúdo interno com raras cristas mitocondriais (Figuras 10 e 11). A organização simétrica entre miosinas e actinas mostra-se ausente (Figura 12).

Os núcleos aparecem morfologicamente normais (Figuras 13). As estruturas do tecido de sustentação não sofreram alterações visíveis. O colágeno presente no tecido de sustentação, mostrou-se bem preservado (Figura 14).

### **Grupo II (90 dias pós-denervação)**

O grupo II, biopsiado com noventa dias após a operação de denervação muscular, apresentou sarcômeros desorganizados ou apresentando orientações diferentes das relações esperadas com as linhas Z. O retículo sarcoplasmático aparece de modo abundante. As

mitocôndrias apareceram reduzidas em tamanho e número (Figuras 15 e 16). A desintegração miofibrilar favoreceu o surgimento de zonas eletrolúcidas (Figura 17).

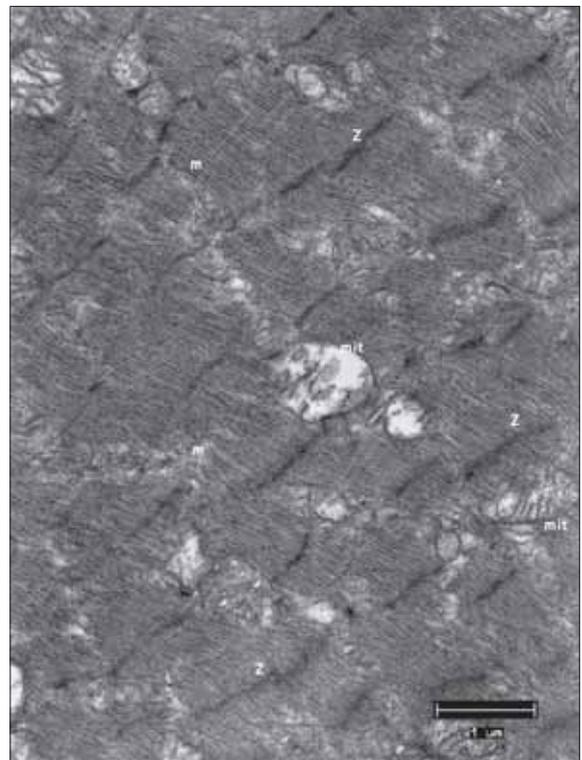
A desorganização não se apresenta do mesmo modo nos diferentes materiais de um mesmo grupo. Os graus de desorganização são variáveis ao longo do músculo vocal.

### Grupo III (180 dias pós-denervação)

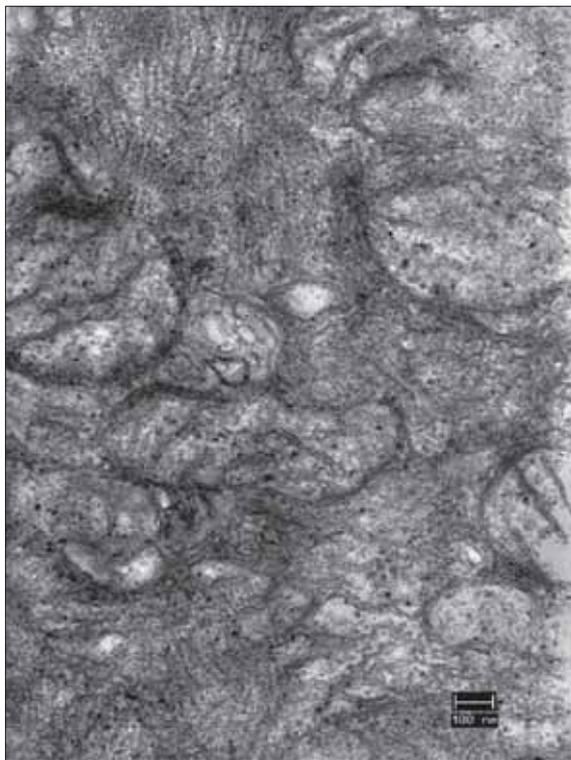
O grupo III, biopsiado com cento e oitenta dias após a operação de denervação muscular, apresentou sarcômeros regulares com bandas isotropas e anisótropas identificáveis. As mitocôndrias, com tamanhos e número regulares quando comparadas aos controles, apresentaram-se alinhadas entre os sarcômeros. As cristas mitocondriais são visíveis e abundantes (Figuras 18 e 19). O glicogênio aparece em grande quantidade junto às mitocôndrias e ao retículo sarcoplasmático (Figura 20 e 21).

A estatística descritiva foi realizada através da média, desvio padrão, mínimo e máximo. Os resultados estão representados na Tabela 1.

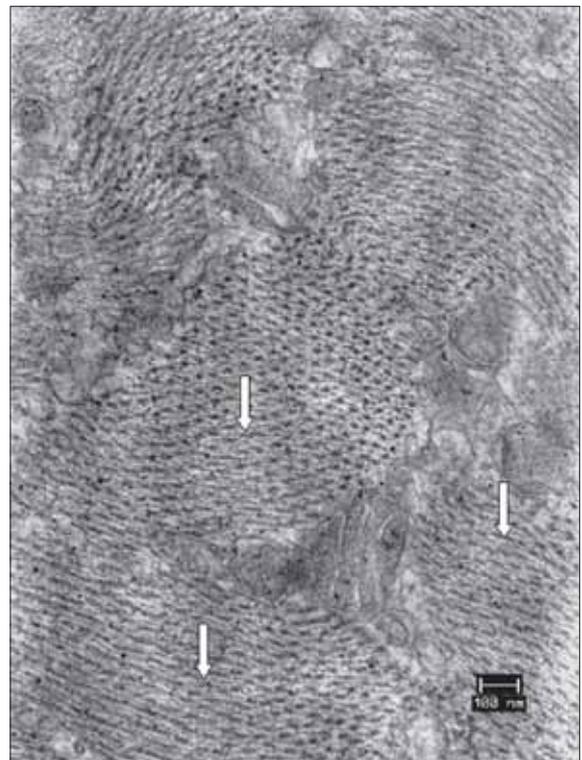
A comparação dos diâmetros mitocondriais entre os diferentes grupos-controle obteve o seguinte resultado demonstrado nas Tabelas 2 e 3.



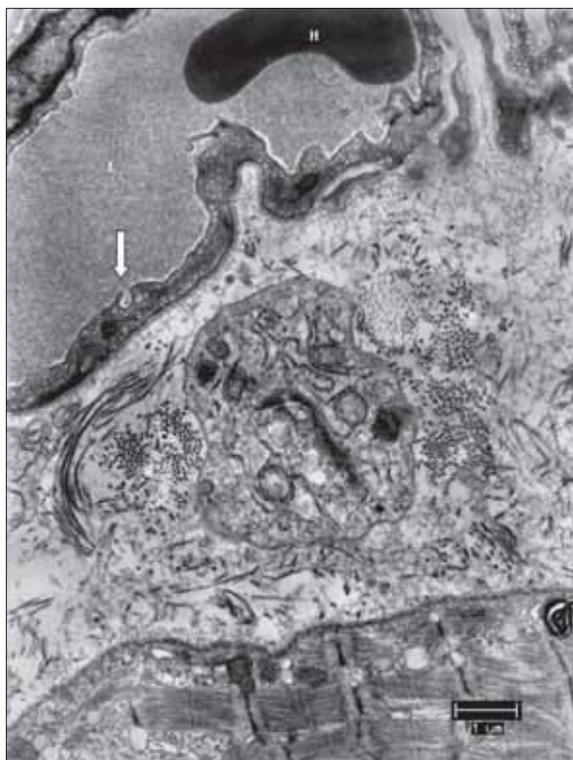
**Figura 10.** Músculo da prega vocal direita, após 45 dias de denervação mecânica. Mitocôndrias em número reduzido, com raras cristas mitocondriais, quando comparadas com o material controle. mit, mitocôndrias; Z, linhas Z; mf, miofibrilas. Aumento: 10000x.



**Figura 11.** Detalhe do músculo da prega vocal direita, após 45 dias de denervação. A eletromicrografia mostra as mitocôndrias translúcidas (mit) em função da perda de cristas e matriz. Aumento: 40000x.



**Figura 12.** Detalhe do músculo da prega vocal após 45 dias de denervação. As miofibrilas, em corte transversal, perderam a organização simétrica (setas). Aumento: 40000x.



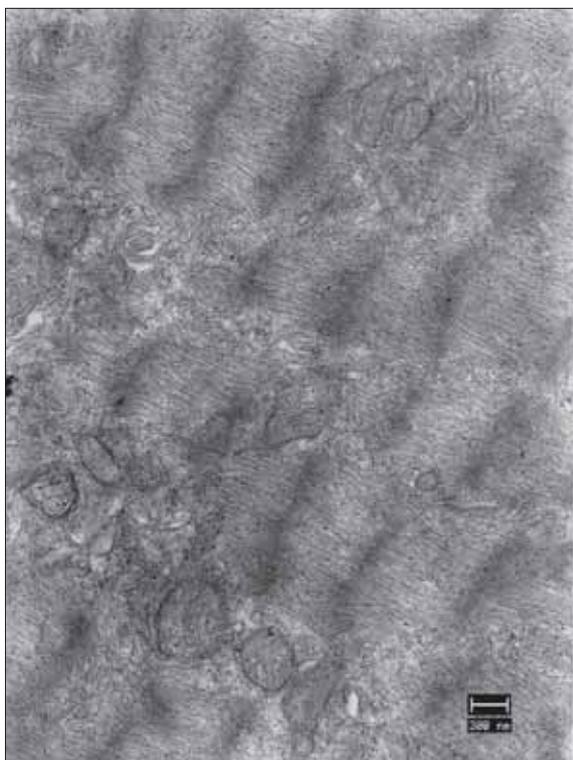
**Figura 13.** De cima para baixo, capilar sanguíneo, tecido de sustentação e fibra muscular. Esta imagem permite sugerir que diversos componentes do músculo da prega vocal, não sofrem modificações significativas, como é o caso da hemácia na luz do capilar, formado por célula endotelial que mostra função de captação de líquidos, por intermédio da vesícula pinocitótica (a seta indica a vesícula de pinocitose, característica dos capilares não fenestrados). L, lúmen capilar; H, hemácia; Co, colágeno. Aumento: 6.300 vezes.



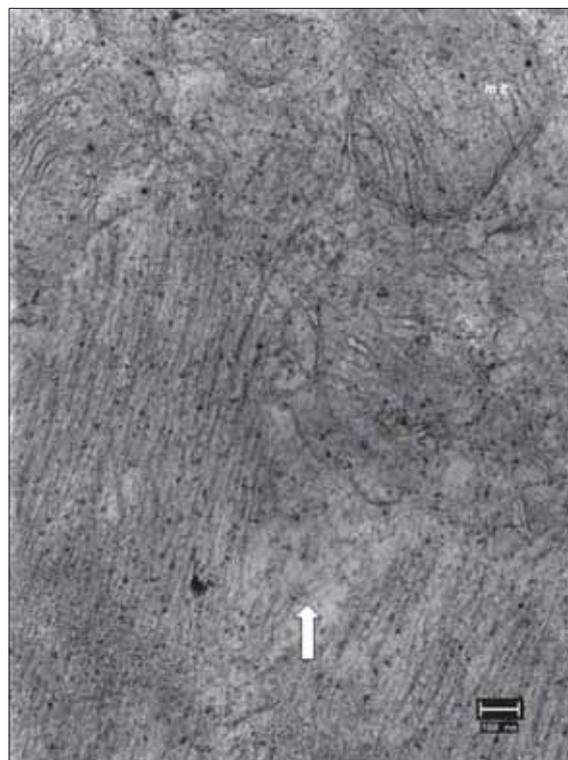
**Figura 14.** As fibras colágenas mantêm a integridade em todos os períodos após a denervação. Aumento: 10000x.



**Figura 15.** Músculo da prega vocal após 90 dias de denervação. Completa desorganização miofibrilar com algumas mitocôndrias eletrodensas (mit). Aumento: 10000x.



**Figura 16.** Músculo da prega vocal após 90 dias de denervação. Completa desorganização miofibrilar com algumas mitocôndrias apresentando poucas cristas (mit). Aumento: 13000x.



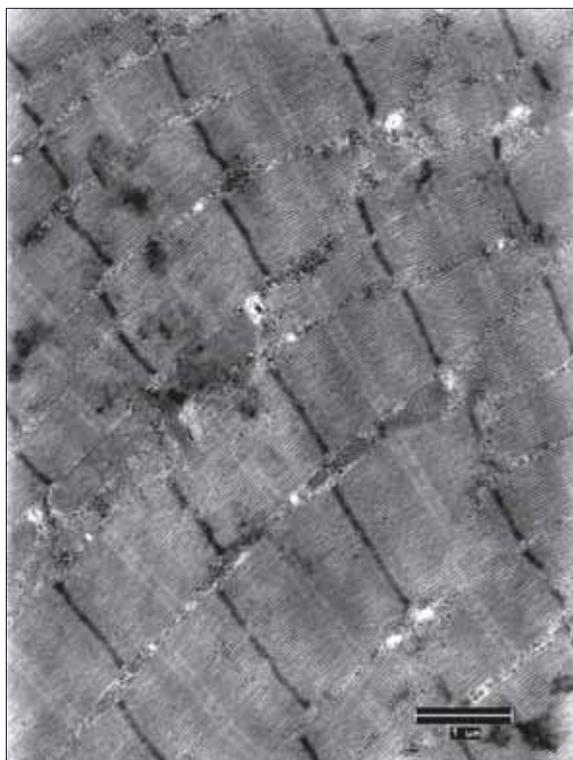
**Figura 17.** Músculo da prega vocal após 90 dias de denervação. Detalhe da desorganização miofibrilar (seta) e das mitocôndrias com poucas cristas (mit). Aumento: 40000x. Grânulos densos por precipitação ósmica.



**Figura 18.** Músculo da prega vocal direita, após 180 dias de denervação mecânica. Sarcômeros regulares. Linhas mitocondriais ocupando os espaços intersarcoméricos. Mitocôndrias com volume e número esperados para uma fibra normal. Cristas mitocondriais desenvolvidas. Reticulo sarcoplasmático normal. Aumento:10000x.



**Figura 19.** Músculo vocal da prega vocal direita, após 180 dias de denervação mecânica. As mitocôndrias ocupam linhas regulares entre os sarcômeros (mit); os sarcômeros apresentam linhas Z perfeitamente identificáveis, bandas claras e bandas escuras. No centro das bandas escuras identifica-se com facilidade a banda H. Aumento: 10000x.



**Figura 20.** Músculo vocal da prega vocal direita, após 180 dias de denervação mecânica. Os sarcômeros apresentam-se regulares e estruturalmente normais. Observa-se grande quantidade de grânulos de glicogênio e mitocôndrias entre as unidades sarcoméricas. Aumento: 10000x.



**Figura 21.** Músculo vocal da prega vocal direita, após 180 dias de denervação mecânica. Detalhe do acúmulo de grânulos de glicogênio em torno das mitocôndrias. Aumento: 40000x.

**Tabela I.** Estatística descritiva. Número de mitocôndrias com o diâmetro medido em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

Músculo	N	mínimo	máximo	média	DP
PVE45	139	0,0438	0,9741	0,4823	0,2043
PVD45	229	0,1355	0,983	0,3925	0,1482
PVE90	172	0,1946	0,8976	0,4503	0,1293
PVD90	68	0,1455	0,56	0,3144	0,0973
PVE180	176	0,2111	0,7653	0,4194	0,1106
PVD180	141	0,1464	0,8355	0,4078	0,1331
PVEH45	23	0,3307	0,7633	0,5564	0,1187
PVEH90	53	0,2165	0,5382	0,373	0,0753
PVEH180	16	0,1949	0,6922	0,386	0,1515
PVDH180	17	0,1908	0,3978	0,3248	0,0566
PVD180F	105	0,1464	0,8355	0,3973	0,1463
PVD180M	36	0,3005	0,6013	0,4385	0,0773
PVD45F	77	0,1855	0,8372	0,4478	0,1341
PVD45M	156	0,1355	0,983	0,3543	0,1372
PVD90F	22	0,1455	0,4746	0,2818	0,0812
PVD90M	46	0,1779	0,56	0,3299	0,1013
PVDH45	15	0,1392	0,4118	0,2568	0,0695
PVE180F	76	0,2111	0,7653	0,3744	0,0948
PVE180M	68	0,2527	0,7576	0,4721	0,1122
PVE45F	56	0,1424	0,7129	0,3671	0,1139
PVE45M	88	0,4382	0,9741	0,5445	0,2187
PVE90F	68	0,2422	0,6529	0,4586	0,1047
PVE90M	104	0,1946	0,8976	0,4449	0,1434

**Legenda:** PVE - prega vocal esquerda; PVD - prega vocal direita; PVEH, PVDH - a letra H representa animais não orquiectomizados; o número que acompanha a legenda (45, 90 ou 180) diz respeito ao período após a operação, para ocorrer a biópsia do músculo vocal.

**Tabela 2.** Número de mitocôndrias e média do diâmetro mitocondrial dos grupos I, II e III.

PVE	N	Média	DP
I 45 dias	139	0,4823	0,2043
II 90 dias	172	0,4503	0,1293
III 180 dias	176	0,4194	0,1106

PVE = prega vocal esquerda (unidade de controle).

**Tabela 3.** Diferença média do diâmetro mitocondrial dos grupos I, II e III.

PVE	Diferença Média	Significância
I 45 dias - 90 dias	0,0319	0,147
II 45 dias - 180 dias	-0,0628	0,001
III 90 dias - 180 dias	-0,0308	0,131

PVE = prega vocal esquerda (unidade de controle).

A comparação dos diâmetros mitocondriais entre os diferentes grupos operados para denervação mecânica da prega vocal obteve o seguinte resultado (Tabela 4 e 5).

O teste *t*, de *student*, realizado para comparar os diâmetros mitocondriais musculares dos dois grupos das pregas vocais, controle x denervada, apresentou os seguintes resultados (Tabela 6).

## DISCUSSÃO

### Ultra-estrutura do músculo vocal mecanicamente denervado

As observações em músculo vocal de *Sus scrofa domestica*, com 45 dias depois da denervação, permitiram observar que as diferenças são significativas no que se refere ao diâmetro médio das mitocôndrias ( $t = 8,34$ ;  $p = 0,000$ , nas pregas masculinas, e  $t = 3,34$ ;  $p = 0,001$ , nas pregas femininas). Diâmetro médio geral de  $0,48\mu\text{m}$  nas unidades de controle, e de  $0,39\mu\text{m}$ , nas unidades testadas - músculo vocal direito. Em músculo com 90 dias de denervação, as diferenças são significativas no que se refere ao diâmetro médio das mitocôndrias ( $t = 4,91$ ;  $p = 0,000$ , nas pregas masculinas, e  $t = 7,23$ ;  $p = 0,000$ , nas pregas femininas). O diâmetro médio geral foi de  $0,45\mu\text{m}$  nas unidades de controle, e de  $0,31\mu\text{m}$ , nas unidades testadas - músculo vocal direito. Em músculo com 180 dias de denervação, as diferenças não são significativas no que se refere ao diâmetro médio das mitocôndrias ( $t = 1,60$ ;  $p = 0,111$ , nas pregas masculinas e  $t = -1,19$ ;  $p = 0,234$ , nas pregas femininas). O diâmetro médio geral foi de  $0,41\mu\text{m}$  nas unidades de controle, e de  $0,40\mu\text{m}$ , nas unidades testadas - músculo vocal direito (Tabela 3).

**Tabela 4.** Número de mitocôndrias e média do diâmetro dos grupos I, II e III.

PVD	N	Média	Desvio Padrão
I 45 dias	229	0,3925	0,1482
II 90 dias	68	0,3144	0,0973
III 180 dias	141	0,4078	0,1331

PVD = prega vocal direita (unidade teste).

**Tabela 5.** Diferença média do diâmetro mitocondrial dos grupos I, II e III.

PVD	Diferença Média	Significância
I 45 dias - 90 dias	0,0781	0,000
II 45 dias - 180 dias	-0,0152	0,551
III 90 dias - 180 dias	-0,0934	0,000

PVD = prega vocal direita (unidade teste).

**Tabela 6.** Comparação dos diâmetros das mitocôndrias musculares entre PVE e PVD.

Grupos	t	p	conclusão (*)
PVE45M x PVD45M	8,34	0,000	S
PVE45F x PVD45F	-3,34	0,001	S
PVE90M x PVD90M	4,91	0,000	S
PVE90F x PVD90F	7,23	0,000	S
PVE180M x PVD180M	1,60	0,111	NS
PVE180F x PVD180F	-1,19	0,234	NS

PVE = prega vocal esquerda; PVD = prega vocal direita;

\*S = houve evidências de diferenças estatisticamente significativas;

NS = não houve evidências de diferenças estatisticamente significativas.

Os achados ultra-estruturais nas fibras musculares denervadas, depois de 45 e de 90 dias de denervação, mostraram claramente uma resposta de desorganização miofibrilar associada com alterações mitocondriais muito nítidas. Observamos uma redução de tamanho ( $t = 4,73$ ;  $p = 0,000$ ) das mitocôndrias, e também um número reduzido, facilmente verificável pela contagem de mitocôndrias observadas nas imagens das unidades de controle comparadas com as unidades testadas. As mitocôndrias também apresentaram uma perda considerável de suas cristas mitocondriais que, sendo eletrodensas, deixaram espaços eletrolúcidos nas imagens eletromicrográficas. As mitocôndrias apresentaram-se como as estruturas mais sensíveis à denervação.

Verificou-se, ainda, que a desorganização não aparece com o mesmo padrão em todas as eletromicrografias de um mesmo músculo vocal denervado, permitindo inferir que a desordem é progressiva - lembrando uma massa que primeiro perde calor nas áreas menos profun-

das, embora não tenhamos dados suficientes para afirmar que o processo de desestruturação da citoarquitetura do músculo evolua pelo mesmo método.

Não identificamos processos de necrose nem processos de fagocitose; fato esperado pois não houve interrupção nutritiva do músculo (o processo circulatório foi mantido). A denervação, como já sabemos, apenas impossibilitou a atividade motora da prega vocal. Os vasos sanguíneos e o tecido de sustentação - endomísio - mostraram-se íntegros. O colágeno também não mostrou sinais de alteração.

Como as mitocôndrias mostraram ser aquelas que respondem claramente ao processo de denervação, concentramo-nos na avaliação destas estruturas.

SHINDO et al (7) avaliou mudanças morfométricas e fisiológicas em músculos laríngeos denervados, em 14 cães que sofreram a excisão de 2,5cm do NLR direito, encontrando atrofia muscular após 90 dias de denervação. Também em nosso estudo com porcos, as unidades testadas com noventa dias depois da denervação, o quadro mostrou sarcômeros desorganizados, regiões eletrolúcidas, devido à perda de cristas mitocondriais e miofibrilas.

Nas amostras avaliadas com cento e oitenta dias depois da denervação, encontramos sarcômeros reorganizados, mitocôndrias com cristas abundantes, volume e número mitocondrial recuperado, glicogênio abundante junto ao retículo sarcoplasmático. Não observamos um mesmo padrão de recuperação no mesmo músculo vocal, fazendo-nos acreditar que também a reorganização é gradual. Estes achados concordam com o trabalho de SHINDO et al (7) que também observou a recuperação de músculos laríngeos denervados, após 90 dias.

A escolha da microscopia eletrônica de transmissão para acompanhamento do comportamento estrutural do músculo denervado, garantiu resultados confiáveis e uma investigação em um tempo razoavelmente curto. Reconhecendo que na espécie humana há situações em que ocorre reinervação de uma paralisia unilateral, no período entre seis e doze meses, buscamos no porco, um modelo que é reconhecido pela comunidade científica, como o mais próximo da nossa espécie - do ponto de vista morfológico, imunológico e metabólico.

O fato de, em seis meses, constatarmos uma franca recuperação do músculo que sofreu a perda do nervo laríngeo recorrente, permite-nos supor que houve reinervação de origem contralateral ou mesmo a partir do nervo laríngeo superior. O padrão de inervação da laringe porcina, embora repita de modo geral aquela encontrada na espécie humana, precisa ser detalhadamente investigada para que possamos continuar nossas pesquisas.

Os resultados obtidos no presente trabalho devem ser entendidos com alguma precaução. As suas conclusões são entendidas para o ambiente no qual foram coletados. Foi importante, entretanto, porque evidenciou novas realidades que poderão ser aprofundadas futuramente, tanto teórica como experimentalmente.

## CONCLUSÃO

Os achados na ultra-estrutura dos músculos vocais depois da operação de denervação mecânica da prega vocal direita dos animais, mantendo inervada a prega vocal esquerda, sugere a reinervação do músculo, sendo que as mitocôndrias musculares mostraram-se como as estruturas mais sensíveis à condição denervada, seguidas pela citoarquitetura das miofibrilas. Os achados na ultra-estrutura dos músculos vocais, sugerindo a reinervação, foram observados nos estudos realizados com 180 dias após a denervação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniat.* 1974, 26:89-94.
2. Alajmo E, Salimbeni C. The vocal muscle. *Arch Ital Anat Embriol.* 1983, 88(1):15-24.
3. Stavroulaki P, Birchall M. Comparative study of the laryngeal innervation in humans and animals employed in laryngeal transplantation research. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois, USA. *J Laryngol Otol.* 2001, 115(4):257-266.
4. Kurita S, Nagata K and Hirano M. A Comparative Study of the Layer Structure of the Vocal Fold in Bless DM and Abbs JH. San Diego: College Hill, 1983.
5. Gorti GK, Birchall Ma, Haverson K, Macchiarini P, Bailey M. A preclinical Model for Laryngeal Transplantation: Anatomy and Mucosal Immunology of the Porcine Larynx. *Transplantation.* 1999, 68(11):1638-42.
6. Jiang JJ, Raviv JR, Hanson DG. Comparison of the phonation-related structures among pig, dog, white-tailed deer, and human larynges. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001, 110(12):1120-1125.
7. Shindo ML, Herzon GD, Hanson DG, Cain DJ, Sahgal V. Effects of denervation on laryngeal muscles: a canine model. *Laryngoscope.* 1992, 102(6):663-669.
8. Kawakita S, Aibara R, Kawamura Y, Yumoto E, Desaki J.

Motor innervation of the guinea pig interarytenoid muscle: reinnervation process following unilateral denervation. *Laryngoscope*. 1998, 108(3):398-402.

9. Rhodin J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. In Santander RG. *Técnicas de Microscopia Electronica em Biologia*. Madri: Aguilar, 1968:11.

10. Millonig G. Advantages of phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solutions in fixation. *J Appl Phys*. 1961, 32:1637.

11. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biology*. 1963, 17:208-212.