

Análise quantitativa das fibras mielínicas dos nervos laríngeos em humanos de acordo com a idade

Quantitative analysis of myelinic fibers in human laryngeal nerves according to age

Romualdo Suzano Louzeiro Tiago ¹, Paulo Augusto de Lima Pontes ², Osiris de Oliveira Camponês do Brasil ³

Palavras-chave: disfagia, disfonia, envelhecimento, nervos laríngeos.

Keywords: dysphagia, dysphonia, aging, laryngeal nerves.

Resumo / Summary

Introdução e Objetivo: Realizar análise morfométrica das fibras mielínicas dos nervos laríngeos com a finalidade de verificar modificações quantitativas decorrentes do processo de envelhecimento. **Forma de Estudo:** Clínico e experimental. **Material e Método:** Foi coletado fragmento de 1cm dos nervos laríngeos superiores e nervos laríngeos recorrentes de 12 cadáveres do sexo masculino. A amostra foi dividida em dois grupos: idade inferior a 60 anos (Adulto) e idade igual ou superior a 60 anos (Idoso). O material foi avaliado em microscópio de luz acoplado a sistema analisador de imagem. **Resultados:** O número total de fibras mielínicas do nervo laríngeo superior foi semelhante nos dois grupos etários, mas com tendência para o maior número de fibras de 1µm no grupo adulto ($p=0,0744$). O grupo adulto apresentou maior número total de fibras mielínicas no nervo laríngeo recorrente ($p=0,0006$), e esta diferença ocorreu nas fibras com diâmetros de 1-3µm ($p<0,007$). O grupo adulto apresentou maior número total de fibras mielínicas nos nervos laríngeos (soma das fibras dos nervos laríngeos superiores e dos nervos laríngeos recorrentes) que o grupo idoso ($p<0,0091$). **Conclusão:** O número total de fibras mielínicas dos nervos laríngeos é maior no grupo com idade inferior a 60 anos.

Introduction and aim: To carry out a morphometric analysis of myelinic fibers in laryngeal nerves aiming to identify quantitative changes as a result of aging. **Study design:** Clinical and experimental. **Material and Method:** A 1cm fragment was collected from the superior laryngeal nerves and recurrent laryngeal nerves taken from twelve male cadavers. The sample was divided into two groups: those aged below 60 years (Adult) and those aged 60 years or more (Elderly). The material was evaluated under light microscopy coupled with an image analysis system. **Results:** The total number of myelinic fibers from the superior laryngeal nerve was similar in both age groups; there was, however, a trend for a higher number of 1-3µm fibers in the adult group ($p=0.0744$). The adult group had a higher total number of myelinic fibers in the recurrent laryngeal nerve ($p=0.0006$), and this difference was seen in fibers with diameters between 1-3µm ($p<0.007$). The adult group had a higher total number of myelinic fibers in the laryngeal nerves (sum of superior laryngeal nerves and recurrent laryngeal nerves fibers) compared to the elderly group ($p<0.0091$). **Conclusion:** The total number of myelinic fibers in laryngeal nerves is higher for the group aged below 60 years.

¹ Doutor em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Médico Pesquisador do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

² Livre-Docente pelo Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

³ Doutor em Medicina pela Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Professor do Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Endereço para correspondência: Romualdo Suzano Louzeiro Tiago - Rua Pio XII 439 apto 122 Bela Vista São Paulo SP 01322-030.

Tel.: (0xx11) 3285-6824 - E-mail: romualdotiago@uol.com.br

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 19 de julho de 2006. cod. 3280.

Artigo aceito em 26 de agosto de 2006.

INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento determina modificações no organismo, sendo que diversas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de caracterizar estas modificações no trato aéreo digestivo superior, sendo a laringe um dos órgãos mais pesquisados. A maioria dos trabalhos a respeito da laringe está relacionada ao estudo da camada mucosa que reveste a prega vocal, e descreve modificações como: redução numérica das fibras elásticas da camada intermediária da lâmina própria;¹ redução da densidade de células epiteliais e da espessura da lâmina própria;^{2,3} aumento na quantidade do colágeno na lâmina própria;⁴ alteração morfológica das fibras elásticas da camada superficial da lâmina própria;⁵ e o desarranjo da arquitetura das fibras colágenas da lâmina própria.⁶

Estudos sobre o sistema muscular da laringe apresentam resultados que sugerem: redução numérica das fibras musculares do músculo tireoaritenóideo, principalmente as fibras musculares de contração lenta⁷ e redução das proteínas responsáveis pela contração muscular.⁸ Outros autores, baseados em estudos de eletromiografia, apresentam resultados sugestivos de desnervação ou lesão axonal envolvendo o controle motor da laringe em idosos, com conseqüente alteração na contração dos músculos laríngenos.⁹

Essas modificações na camada de revestimento da prega vocal e nos músculos laríngenos são responsáveis pelas características presentes na voz do idoso como certos graus de sopro, rouquidão, quebras de sonoridade e alteração na frequência fundamental, que se eleva no sexo masculino e se reduz no sexo feminino.^{10,11}

Além da modificação na voz, o processo de envelhecimento está relacionado à redução da sensibilidade faríngea e supraglótica,¹² sendo considerada um dos fatores responsáveis pelo aparecimento da disfagia, aspiração e pneumonia de repetição em idosos, devido à diminuição dos reflexos que protegem as vias aéreas inferiores. Outras modificações observadas em idosos são o retardo na abertura do esfíncter esofágico superior^{13,14} e a redução do tônus do músculo cricofaríngeo.¹⁴

Sendo as funções primordiais da laringe a proteção das vias aéreas inferiores durante a deglutição e a redução da resistência glótica na inspiração, o controle de todas essas funções está na dependência da perfeita integração entre o sistema sensorial e motor, que incluem os receptores laríngenos, as vias aferentes viscerais gerais, os núcleos do sistema nervoso central ao nível do tronco cerebral, as vias eferentes viscerais especiais e os músculos intrínsecos da laringe.¹⁵

Pouco tem sido estudado sobre a ação do envelhecimento nos nervos laríngenos,¹⁶⁻²⁰ sendo quase a totalidade dos trabalhos publicados sobre a inervação da laringe relacionados a aspectos puramente anatômicos.²¹

²⁴ De modo geral, esses trabalhos citam que a inervação da laringe é realizada pelo nervo vago, através dos seus ramos: nervo laríngeo superior (NLS) e nervo laríngeo recorrente (NLR).

O NLS é composto predominantemente por fibras mielínicas aferentes de menor diâmetro, que trafegam pelo ramo interno e são responsáveis pela sensibilidade da supraglote e hipofaringe;^{17,18,20,25,26} e por fibras mielínicas eferentes de médio diâmetro que, pelo ramo externo, innervam o músculo cricotireóideo e parte do músculo tireoaritenóideo.^{23,25,26} O NLR é composto tanto por fibras mielínicas aferentes quanto eferentes, sendo responsável pela sensibilidade da subglote e pela inervação dos músculos intrínsecos da laringe,^{25,27,28} porção superior do esôfago e parte do músculo cricofaríngeo.^{29,30}

Como não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado quantitativamente as fibras mielínicas dos nervos laríngenos, superior e recorrente, correlacionando com o processo de envelhecimento, propusemos-nos a realizar esta pesquisa.

O objetivo desta pesquisa é realizar análise morfo-métrica das fibras mielínicas dos nervos laríngenos com a finalidade de verificar modificações quantitativas decorrentes do processo de envelhecimento.

MÉTODO

O projeto de pesquisa deste estudo, sob o número 0409/03, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. Foram coletados fragmentos de 1cm do NLS (direito e esquerdo) e do NLR (direito e esquerdo) de 12 cadáveres submetidos a autópsia no período de junho de 2003 a novembro de 2004.

Foram avaliados cadáveres do sexo masculino e sem antecedentes para doenças como: diabetes, alcoolismo, neoplasia maligna e emagrecimento súbito.³¹⁻³³ A amostra foi dividida em dois grupos: grupo com idade inferior a 60 anos (Adulto), composto por seis cadáveres; grupo com idade igual ou superior a 60 anos (Idoso), composto por seis cadáveres.

O fragmento do NLS, antes da divisão em ramo interno e externo, foi obtido a 3cm de distância da membrana tireohióide;^{18,34} e o fragmento do NLR foi obtido a 4cm de distância da borda inferior da cartilagem cricóide. Este local foi o escolhido para a obtenção do fragmento do NLR devido à maior chance de coletar todos os ramos que se direcionam à laringe.^{22,35} Durante a obtenção, os fragmentos foram cortados transversalmente (perpendicular ao eixo de comprimento do nervo) para possibilitar a quantificação dos seguintes dados morfométricos: área de secção transversal intraperineural (área representativa do número de fibras mielínicas), número e diâmetro das fibras mielínicas. Os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (modificado de Kar-

novsky, 1965),³⁶ pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em resina tipo Araldite 502a.

O material foi cortado em ultramicrotomo com navalhas de vidro para obtenção de cortes semifinos de 0,3mm de espessura e corado com azul de toluidina a 1%. Os cortes foram avaliados em microscópio de luz, acoplado a sistema analisador de imagens.

A avaliação morfométrica foi dividida em duas etapas:

A. Quantificação da área intraperineural: para obter as medidas da área, as imagens do nervo foram digitalizadas a partir da objetiva de 5x, o que representou o aumento final de 120x na tela do monitor do computador. A obtenção da área intraperineural foi importante para o cálculo do número total de fibras do nervo a partir de amostragem representativa.

B. Quantificação do número e do diâmetro externo das fibras mielínicas: as imagens do nervo foram digitalizadas a partir da objetiva de 40x, o que representou o aumento final de 1920x na tela do monitor. Foram avaliados quatro campos aleatórios por lâmina,³⁷ sendo que além da contagem das fibras e medida dos seus diâmetros, foi medida a área representativa do campo; o que significou a exclusão das áreas de perineuro. Desta forma, em cada lâmina, foi avaliada a área que variou de 6,1% a 25,9%. O número total de fibras mielínicas foi estimado a partir da área intraperineural total (obtida na primeira etapa) e do número de fibras e da área dos campos avaliados (obtidos na segunda etapa).

Para evitar erro de amostragem foram excluídas as fibras mielínicas projetadas sobre as linhas inferior e esquerda que delimitam o campo.³⁸ O menor diâmetro da fibra (maior distância perpendicular ao maior eixo da fibra mielínica) foi o escolhido para a medida das fibras mielínicas com perímetro elíptico ou irregular.³⁹

O método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) foi usado para a comparação das médias (área intraperineural, densidade de fibras mielínicas/mm² e número de fibras mielínicas) entre os grupos. Adotamos o nível de significância a de 0,05. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como significante.

RESULTADOS

A média de idade do grupo Adulto foi de 46,3 anos e do Idoso foi de 78,2 anos. Os dados descritivos (média e desvio-padrão) dos grupos etários com relação à área intraperineural e densidade de fibras mielínicas/mm² são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 3 apresentamos os dados descritivos das fibras mielínicas do NLS e na Tabela 4 do NLR, com os lados direito e esquerdo agrupados. Para melhor visibilizar a análise morfométrica dos nervos laríngeos apresentamos as Figuras de 1 a 5.

Tabela 1. Dados descritivos da área intraperineural (μm^2) dos nervos laríngeos, de acordo com os grupos etários.

Grupo		Area (μm^2)			
		NLS Dir	NLS Esq	NLR Dir	NLR Esq
<60 anos	Média	450503	428805	232117	255281
	DP	88764	210044	43130	81333
	n	6	6	6	6
≥60 anos	Média	434537	453259	195831	204816
	DP	156010	69006	38885	79591
	n	6	6	6	6

Legenda: NLS Dir = Nervo Laríngeo Superior Direito; NLS Esq = Nervo Laríngeo Superior Esquerdo; NLR Dir = Nervo Laríngeo Recorrente Direito; NLR Esq = Nervo Laríngeo Recorrente Esquerdo; DP = Desvio padrão; n = número de nervos

Tabela 2. Dados descritivos da densidade de fibras mielínicas/mm² dos nervos laríngeos, de acordo com os grupos etários.

Grupo		Densidade de fibras mielínicas/mm ²			
		NLS Dir	NLS Esq	NLR Dir	NLR Esq
<60 anos	Média	21156	22335	14336	14129
	DP	4559	5698	3247	4780
	n	6	6	6	6
≥60 anos	Média	18628	19763	12692	11997
	DP	6104	4461	2772	3463
	n	6	6	6	6

Legenda: NLS Dir = Nervo Laríngeo Superior Direito; NLS Esq = Nervo Laríngeo Superior Esquerdo; NLR Dir = Nervo Laríngeo Recorrente Direito; NLR Esq = Nervo Laríngeo Recorrente Esquerdo; DP = Desvio padrão; n = número de nervos

Nas Figuras de 1 a 4 apresentamos fotomicrografias típicas da área de secção transversal (menor aumento) e de um campo (maior aumento) dos nervos laríngeos, representando cada grupo etário.

Na análise da área intraperineural do NLS (Tabela 1, Figuras 1 e 2) não foi observada diferença entre os lados direito e esquerdo ($p=0,9782$), bem como não houve diferença entre os grupos etários ($p=0,9474$). Na análise da área intraperineural do NLR não foi observada diferença entre os lados direito e esquerdo ($p=0,5322$), bem como não houve diferença entre os grupos etários ($p=0,1426$). No entanto, foi observado que o NLS apresentou área intraperineural maior que o NLR, em ambos os lados, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$).

Na análise da densidade de fibras mielínicas por mm² do NLS (Tabela 2, Figuras 3 e 4) não foi observada diferença entre os lados direito e esquerdo ($p=0,5935$), bem como não houve diferença entre os grupos etários ($p=0,2714$). Na análise da densidade de fibras mielínicas

Tabela 3. Dados descritivos do número de fibras mielínicas do Nervo Laríngeo Superior (NLS), com os lados direito e esquerdo agrupados, de acordo com o diâmetro da fibra e o grupo etário.

NLS Grupo		Diâmetro das fibras mielínicas (µm)															Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<60 anos	Média	1795	2652	1428	928	750	554	395	287	130	54	36	9	0	1	0	9017
	DP	948	765	599	427	216	207	180	201	116	64	43	15	0	5	0	1692
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
≥60 anos	Média	1387	2467	1205	701	580	485	417	278	191	110	50	29	9	7	2	7918
	DP	728	840	263	217	214	208	149	160	126	87	53	34	13	14	6	1624
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Legenda: DP = Desvio padrão; n = número de nervos

Tabela 4. Dados descritivos das fibras mielínicas do Nervo Laríngeo Recorrente (NLR), com os lados direito e esquerdo agrupados, de acordo com o diâmetro da fibra e o grupo etário.

NLR Grupo		Diâmetro das fibras mielínicas (µm)																		Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
<60 anos	Média	504	992	426	256	214	193	196	145	124	87	56	44	17	9	5	4	2	0	3276
	DP	208	248	127	99	93	104	102	81	86	82	52	42	21	15	10	9	4	0	383
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
≥60 anos	Média	361	587	301	214	201	173	135	126	92	68	52	31	24	10	3	1	1	1	2381
	DP	207	365	154	142	152	95	76	76	58	58	46	41	37	19	7	3	3	2	669
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Legenda: DP = Desvio padrão; n = número de nervos

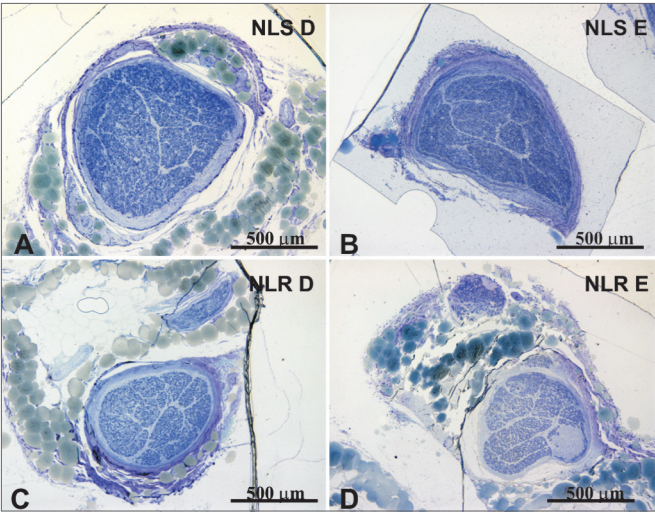


Figura 1. Fotomicrografia típica do corte transversal dos nervos laríngeos superior direito (A), superior esquerdo (B), recorrente direito (C) e recorrente esquerdo (D); de indivíduo com 45 anos de idade. NLS D = Nervo laríngeo superior direito, NLS E = Nervo laríngeo superior esquerdo, NLR D = Nervo laríngeo recorrente direito, NLR E = Nervo laríngeo recorrente esquerdo. Corado com azul de toluidina.

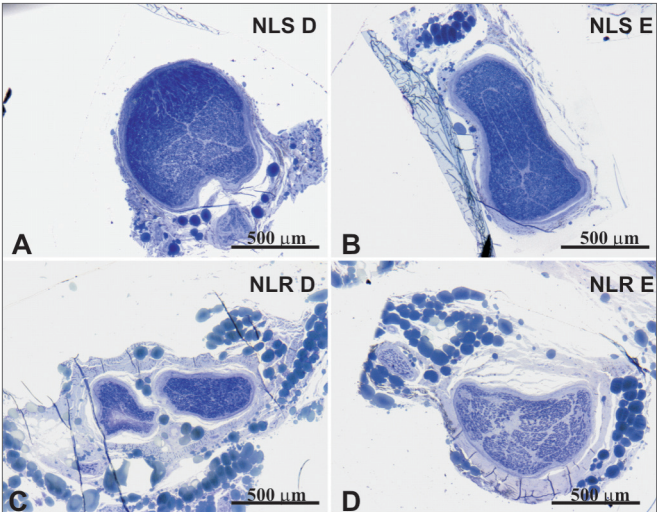


Figura 2. Fotomicrografia típica do corte transversal dos nervos laríngeos superior direito (A), superior esquerdo (B), recorrente direito (C) e recorrente esquerdo (D); de indivíduo com 77 anos de idade. NLS D = Nervo laríngeo superior direito, NLS E = Nervo laríngeo superior esquerdo, NLR D = Nervo laríngeo recorrente direito, NLR E = Nervo laríngeo recorrente esquerdo. Corado com azul de toluidina.

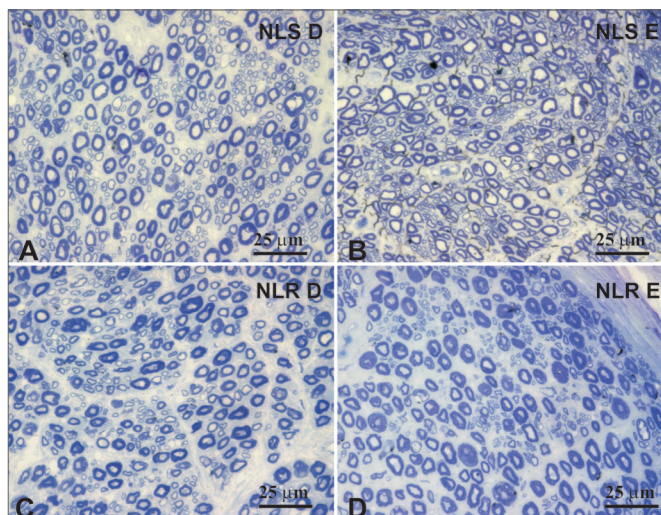


Figura 3. Fotomicrografia típica de um campo dos nervos laríngenos superior direito (A), superior esquerdo (B), recorrente direito (C) e recorrente esquerdo (D); de indivíduo com 45 anos de idade. NLS D = Nervo laríngeno superior direito, NLS E = Nervo laríngeno superior esquerdo, NLR D = Nervo laríngeno recorrente direito, NLR E = Nervo laríngeno recorrente esquerdo. Corado com azul de toluidina.

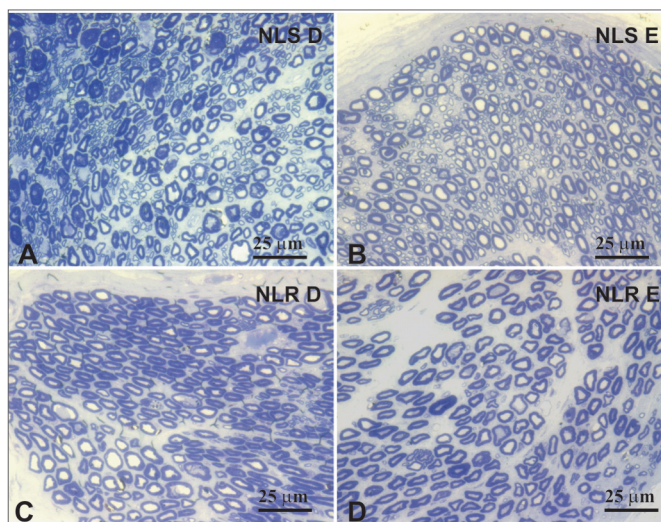


Figura 4. Fotomicrografia típica de um campo dos nervos laríngenos superior direito (A), superior esquerdo (B), recorrente direito (C) e recorrente esquerdo (D); de indivíduo com 77 anos de idade. NLS D = Nervo laríngeno superior direito, NLS E = Nervo laríngeno superior esquerdo, NLR D = Nervo laríngeno recorrente direito, NLR E = Nervo laríngeno recorrente esquerdo. Corado com azul de toluidina.

por mm² do NLR não foi observada diferença entre os lados direito e esquerdo ($p=0,7312$), bem como não houve diferença entre os grupos etários ($p=0,2852$). No entanto, foi observado que o NLS apresentou densidade de fibras mielínicas por mm² maior que o NLR, nos dois lados, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$).

Na análise do número de fibras mielínicas do NLS não foram encontradas diferenças entre os lados direito e esquerdo ($p=0,8710$). Os lados foram agrupados para

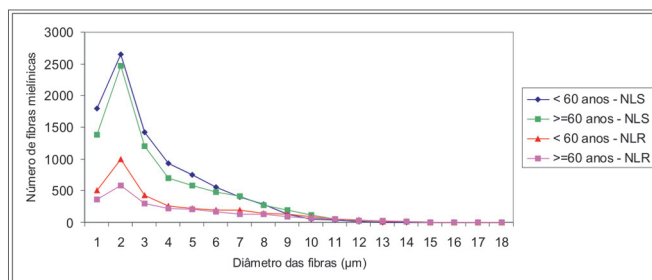


Figura 5. Perfis ajustados das médias do número de fibras mielínicas dos nervos laríngenos (nervo laríngeno superior-NLS e nervo laríngeno recorrente-NLR) nos grupos <60 anos e ≥60 anos, de acordo com o diâmetro das fibras.

maior precisão dos resultados, e foi realizada nova análise de variância comparando os grupos etários e os diâmetros das fibras (Tabela 3, Figura 5). Nesta análise não foi observada diferença no número total de fibras mielínicas entre os grupos etários ($p=0,1188$), mas na análise dos diâmetros foi observada tendência para o maior número de fibras de 1µm no grupo com idade inferior a 60 anos ($p=0,0744$).

Na análise do número de fibras mielínicas do NLR não foram encontradas diferenças entre os lados direito e esquerdo ($p=0,9180$). Os lados foram agrupados para maior precisão dos resultados, e foi realizada nova análise de variância comparando os grupos etários e os diâmetros das fibras (Tabela 4, Figura 5). Nesta análise foi observado que o número total de fibras no grupo com idade inferior a 60 anos foi maior que no grupo Idoso ($p=0,0006$), e por comparações múltiplas foi observada diferença significativa entre os grupos etários nas fibras mielínicas com diâmetros de 1-3mm ($p<0,007$); não houve diferença significativa no número e na distribuição das fibras mielínicas maiores que 4mm.

Na análise entre os nervos laríngenos (Figura 5) foi observado que os nervos laríngenos superiores apresentaram maior número de fibras mielínicas que os nervos laríngenos recorrentes ($p<0,0001$). Por comparações múltiplas foi observada diferença significativa nas fibras mielínicas com diâmetro de 1-8mm, no sentido de maiores valores para os nervos laríngenos superiores. Não houve diferença significativa na distribuição das fibras mielínicas maiores que 9mm. O grupo Adulto apresentou maior número total de fibras mielínicas (soma das fibras dos nervos laríngenos superiores e dos nervos laríngenos recorrentes) que o grupo Idoso, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,0091$).

DISCUSSÃO

A idéia deste trabalho surgiu quando, durante a atividade assistencial, foi observado que muitos pacientes idosos apresentavam sintomas relacionados a distúrbios da voz e transtornos de deglutição (disfonia e disfagia). Como

existem poucos métodos objetivos para a avaliação destes sintomas, partimos para o campo experimental, especificamente para a avaliação do sistema nervoso periférico, com a finalidade de detectar modificações morfométricas que possam justificar estas queixas.

Poucos trabalhos, até o momento, analisaram as modificações nos nervos laríngeos desencadeadas pelo processo de envelhecimento. Foram encontrados na literatura cinco trabalhos que abordaram este tema, sendo que dois destes trabalhos foram realizados em animais^{16,17} e três em humanos.¹⁸⁻²⁰ O NLS foi avaliado em três trabalhos^{17,18,20} e o NLR em apenas dois,^{16,19} no entanto não foi encontrado nenhuma publicação na literatura que avaliou ambos os nervos laríngeos (NLS e NLR) em seres humanos, e correlacionou com o processo de envelhecimento.

A utilização de modelos animais para o estudo das modificações desencadeadas pelo envelhecimento nem sempre produz resultados passíveis de serem estendidos para os seres humanos, devido ao fato de serem espécies com curto período de vida. Talvez este tenha sido o motivo da detecção de alterações mínimas nas pesquisas realizadas em ratos.^{16,17}

Vários trabalhos publicados na literatura descreveram as características morfométricas dos nervos laríngeos, no entanto foram observadas diferenças no método utilizado entre estes trabalhos, o que limitou a comparação dos resultados. No método utilizado nesta pesquisa, foram seguidos alguns parâmetros já descritos, como o nível de secção do NLS,^{18,34} o preparo do material e a análise morfométrica. A escolha do local para obtenção do NLR foi baseado em estudos anatômicos,^{22,35} e na comprovação de alteração nas características morfométricas do nervo, dependendo do nível de secção.⁴⁰⁻⁴²

A amostra desta pesquisa foi composta por 12 indivíduos do sexo masculino, sem antecedentes de diabetes, alcoolismo ou neoplasia maligna, fatores estes que podem alterar os resultados devido ao risco de polineuropatia periférica desencadeada por essas doenças.³¹⁻³³ Foi observado que a grande maioria dos trabalhos que avaliou a morfometria dos nervos laríngeos em humanos utilizou, como amostra ou grupo controle, indivíduos com diagnóstico de carcinoma espinocelular de laringe e os fragmentos dos nervos laríngeos foram obtidos durante laringectomia.^{40,42-48}

Nesta pesquisa, a amostra foi dividida em dois grupos, um com idade inferior a 60 anos e outro com idade igual ou superior a 60 anos. O grupo Adulto apresentou média etária de 46,3 anos, e o grupo Idoso apresentou média etária de 78,2 anos, portanto foi observado um intervalo médio entre os grupos de 31,9 anos. Um dos trabalhos que correlacionou o envelhecimento com alterações morfométricas do NLR avaliou um grupo de indivíduos, todos com idade superior a 60 anos e com média etária de 75,1 anos; apesar de não ter comparado com um grupo

mais jovem, os autores observaram redução da área e do perímetro dos axônios com o decorrer da idade.¹⁹

Nos resultados desta pesquisa, foi observado que o NLS apresentou área intraperineural maior que o NLR, com diferença estatisticamente significativa. No entanto, não houve diferença entre a área do NLS direito e do NLS esquerdo, nem entre a área do NLR direito e do NLR esquerdo, nos dois grupos etários (Tabela 1, Figuras 1 e 2). O NLS apresentou área média de 0,44 mm² dos dois lados, em concordância com os valores médios publicados por outros autores.^{18,34} O NLR apresentou área média de 0,21mm² do lado direito e de 0,23mm² do lado esquerdo, resultado pouco superior ao de Germain et al.³⁴ provavelmente, devido ao fato do nível de secção realizado nesta pesquisa ter sido 1cm mais proximal ao nervo vago. Estudo realizado por Repice⁴⁷ relatou que a área de secção transversal do NLR foi maior que do NLS, contrário aos nossos achados e ao da literatura.³⁴ No entanto, como o NLR apresenta várias divisões próximo à laringe, Repice⁴⁷ pode ter incluído áreas de epineuro e, desta forma, apresentou áreas maiores que o esperado.

Em relação à densidade de fibras mielínicas por mm² foi observado que o NLS apresentou maior densidade numérica que o NLR, com diferença estatisticamente significativa. No entanto, não houve diferença entre a densidade do NLS direito e do NLS esquerdo, nem entre do NLR direito e do NLR esquerdo, nos dois grupos etários, mas com tendência de valores maiores para o grupo de indivíduos mais jovens (Tabela 2, Figuras 3 e 4). Este achado representou um método indireto de avaliação da morfometria dos nervos laríngeos, ou seja, o NLS por ser composto predominantemente por fibras mielínicas de menores diâmetros (fibras sensoriais) apresentou densidade de fibras por mm² estatisticamente superior ao NLR que é composto por fibras sensoriais (menor diâmetro) e motoras (médio diâmetro). Apesar de não ter sido estatisticamente significativa também foi observado que o grupo com idade inferior a 60 anos apresentou densidade média de fibras por mm² maior que o grupo idoso, sugerindo predominância das fibras de menor diâmetro no grupo mais jovem. Outros autores compararam a densidade de fibras mielínicas por mm² entre o NLS e o NLR, de ambos os lados, e obtiveram resultados similares aos desta pesquisa.³⁴ Ravits et al.⁴⁵ descreveram um grupo controle (idade média de 60,7 anos) com densidade média de 9420 fibras/mm² no NLR, valor inferior ao observado nesta pesquisa, mas que pode estar relacionado à redução das fibras mielínicas de menor diâmetro decorrente de fatores predisponentes ou associados a neoplasia maligna (alcoolismo, síndrome paraneoplásica). Outros autores que estudaram a densidade de fibras por mm² no NLS, em indivíduos normais,¹⁸ apresentaram resultados semelhantes aos desta pesquisa, ou seja, densidade média em torno de 20.000 fibras mielínicas por mm².

A distribuição das fibras mielínicas de acordo com o diâmetro nos nervos laríngenos superiores apresentou curva unimodal, com grande predomínio das fibras de 2µm, nos dois grupos etários. A maior frequência das fibras de menor diâmetro no NLS foi demonstrado por diversos autores^{17,18,20,25,26,43,47,49} e está relacionada à função sensorial primordial deste nervo. Na comparação da distribuição das fibras de acordo com o diâmetro (1µm a 15µm) não houve diferença entre os lados direito e esquerdo, nos dois grupos etários, como também não houve diferença entre os grupos etários (Tabela 3, Figura 5), no entanto, foi observada tendência para o maior número nas fibras mielínicas de 1µm ($p=0,074$) no grupo mais jovem. Mortelliti et al.¹⁸ observaram diferença estatisticamente significativa no número total de fibras, bem como nas fibras mielínicas de 1µm e 2µm, quando compararam dois grupos de diferentes médias etárias (grupo mais jovem com média etária de 23,8 anos e grupo idoso com média etária de 76,2 anos). Tiago et al.²⁰ também observaram diferença estatisticamente significativa, não no número total de fibras, mas apenas nas fibras de 1µm e 2µm, sendo que o grupo mais jovem foi constituído por indivíduos com média etária de 39,6 anos e o grupo Idoso com média etária de 71,2 anos. Nesta pesquisa o grupo mais jovem foi constituído por indivíduos com média etária de 46,3 anos, ou seja, média etária superior aos dos outros autores, o que não favoreceu a comprovação de diferença entre os grupos, mas por outro lado pode sugerir que a redução do número de fibras mielínicas do NLS tende a ocorrer a partir da quarta década de vida.

A distribuição das fibras mielínicas de acordo com o diâmetro nos nervos laríngenos recorrentes apresentou curva unimodal, com predomínio das fibras de 2µm (Tabela 4, Figura 5). Murtagh e Campbell⁴⁰ publicaram resultado semelhante, inclusive para o número total de fibras, valores próximos aos que foram observados no grupo idoso desta pesquisa. A distribuição das fibras mielínicas no NLR depende do nível de secção do nervo, e à medida que se aproxima da laringe as fibras de diâmetros médios passam a ser mais frequentes, principalmente quando os autores avaliaram o ramo anterior ou muscular do NLR.^{25,44,46,48,49} De acordo com alguns autores, as fibras de menor diâmetro se distribuem para a porção alta do esôfago e da traquéia, subglote²⁵ e músculo cricofaríngeo.³⁰ Na amostra desta pesquisa não houve diferença na distribuição das fibras de acordo com o diâmetro (1µm a 18µm) entre os lados direito e esquerdo, nos dois grupos etários. Na comparação da distribuição das fibras mielínicas de acordo com o diâmetro entre o grupo Adulto e o grupo Idoso, foi observado que o grupo Adulto apresentou número total de fibras maior que o grupo Idoso, com diferença estatisticamente significativa, e esta diferença ocorreu nas fibras de 1 µm a 3 µm de diâmetro. Não foram encontrados na literatura trabalhos que descreveram achado semelhante.

Na comparação do número de fibras mielínicas entre os nervos laríngenos superiores e os nervos laríngenos recorrentes foi observado que os superiores apresentaram mais que o dobro de fibras mielínicas, com diferença estatisticamente significativa. Esta diferença ocorreu nas fibras de 1µm a 8µm de diâmetro (Figura 5). Outros autores publicaram resultados similares³⁴, no entanto, com número total de fibras menor que os encontrados nesta pesquisa, e também não relataram em quais diâmetros das fibras ocorreu esta diferença. Estes autores realizaram a análise em microscópio de luz com cortes de 5µm de espessura, o que provocou sobreposição de imagens e impossibilitou a contagem das fibras mielínicas de 1µm.

A redução do número total de fibras mielínicas nos nervos laríngenos em idosos, principalmente as fibras de menores diâmetros (aférentes), pode estar relacionada à diminuição dos reflexos de proteção da laringe e, desta forma, torna o idoso mais susceptível a aspiração e pneumonias de repetição. Além disso, também altera o sistema regulador do tônus reflexo da musculatura intrínseca da laringe, levando a flacidez dos músculos laríngenos e determinando alterações na voz que caracterizam a presbifonia.

CONCLUSÕES

De acordo com a análise morfométrica das fibras mielínicas dos nervos laríngenos, em dois grupos etários distintos, é possível concluir que o grupo com idade inferior a 60 anos apresenta maior número de fibras mielínicas nos nervos laríngenos que o grupo idoso, sendo esta diferença evidente nos nervos laríngenos recorrentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirano M, Kurita S, Sakaguchi S. Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. *Acta Otolaryngol* 1989;107:428-33.
2. Rodeno MT, Sanchez-Fernandez JM, Rivera-Pomar JM. Histochemical and morphometrical ageing changes in human vocal cord muscles. *Acta Otolaryngol* 1993;113:445-9.
3. Ximenes Filho JA, Tsuji DH, do Nascimento PH, Sennes LU. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:894-8.
4. Mota PHM, Pontes PAL, Parise ER. Quantificação bioquímica do colágeno na túnica mucosa das pregas vocais humanas. *Rev Bras Otorrinolaringol* 1994;60:177-9.
5. Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:44-8.
6. Madruga de Melo EC, Lemos M, Aragão Ximenes Filho J, Sennes LU, Nascimento Saldiva PH, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003;113:2187-91.
7. Malmgren LT, Fisher PJ, Bookman LM, Uno T. Age-related changes in muscle fiber types in the human thyroarytenoid muscle: an immunohistochemical and stereological study using confocal laser scanning microscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:441-51.
8. Suzuki T, Connor NP, Lee K, Bless DM, Ford CN, Inagi K. Age-related alterations in myosin heavy chain isoforms in rat intrinsic laryngeal muscles. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:962-7.

9. Takeda N, Thomas GR, Ludlow CL. Aging effects on motor units in the human thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2000;110:1018-25.
10. Honjo I, Isshiki N. Laryngoscopic and voice characteristics of aged persons. *Arch Otolaryngol* 1980;106:149-50.
11. Behlau MS, Pontes PAL, Ganança MM, Tosi O. Presbifonia: tratamento da deterioração vocal inerente à idade. *Acta AWHO* 1988;7:110-5.
12. Aviv JE, Martin JH, Jones ME, Wee TA, Diamond B, Keen MS et al. Age-related changes in pharyngeal and supraglottic sensation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:749-52.
13. Ekberg O, Feinberg MJ. Altered swallowing function in elderly patients without dysphagia: radiologic findings in 56 cases. *AJR Am J Roentgenol* 1991;156:1181-4.
14. McKee GJ, Johnston BT, McBride GB, Primrose WJ. Does age or sex affect pharyngeal swallowing? *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1998;23:100-6.
15. Sasaki CT, Weaver EM. Physiology of the larynx. *Am J Med* 1997;103:9S-18S.
16. Malmgren LT, Ringwood MA. Aging of the recurrent laryngeal nerve: an ultrastructural morphometric study. In: Fujimura O, editor. *Vocal physiology: voice production, mechanisms and functions*. New York: Raven Press; 1988. p.159-80.
17. Rosenberg SI, Malmgren LT, Woo P. Age-related changes in the internal branch of the rat superior laryngeal nerve. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115:78-86.
18. Mortelliti AJ, Malmgren LT, Gacek RR. Ultrastructural changes with age in the human superior laryngeal nerve. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:1062-9.
19. Nakai T, Goto N, Moriyama H, Shiraishi N, Nonaka N. The human recurrent laryngeal nerve during the aging process. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2000;76:363-8.
20. Tiago RSL, Munhoz MSL, Faria FP, Guilherme A. Aspectos histomorfométricos do nervo laríngeo superior. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002;68:157-65.
21. Dilworth TFM. The nerves of the human larynx. *J Anat* 1921;56:48-52.
22. Nemiroff PM, Katz AD. Extralaryngeal divisions of the recurrent laryngeal nerve: surgical and clinical significance. *Am J Surg* 1982;144:466-9.
23. Wu BL, Sanders I, Mu L, Biller HF. The human communicating nerve. An extension of the external superior laryngeal nerve that innervates the vocal cord. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1321-8.
24. Sanudo JR, Marañillo E, Leon X, Mirapeix RM, Orús C, Quer M. An anatomical study of anastomoses between the laryngeal nerves. *Laryngoscope* 1999;109:983-7.
25. Tomasch J, Britton WA. A fibreanalysis of the laryngeal nerve-supply in man. *Acta Anat* 1955;23:386-98.
26. Domeij S, Carlsoo B, Dahlqvist A, Hellstrom S, Kortopoulos H. Motor and sensory fibers of the superior laryngeal nerve in the rat. A light and electron microscopic study. *Acta Otolaryngol* 1989;108:469-77.
27. Gacek RR, Lyon MJ. Fiber components of the recurrent laryngeal nerve in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;85:460-71.
28. Dahlqvist A, Carlsoo B, Hellstrom S, Domeij S, Kortopoulos H. Fiber composition of the recurrent laryngeal nerve after experimental vagotomy and sympathectomy. A qualitative study by light and electron microscopy. *Acta Anat* 1986;125:114-20.
29. Mu L, Sanders I. The innervation of the human upper esophageal sphincter. *Dysphagia* 1996;11:234-8.
30. Sasaki CT, Kim YH, Sims HS, Czibulka A. Motor innervation of the human cricopharyngeus muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1132-9.
31. Shuman CR, Weissman B. Recurrent laryngeal nerve involvement as a manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetes* 1968;17:302.
32. Dyck PJ. Hypoxic neuropathy: does hypoxia play a role in diabetic neuropathy? *Neurology* 1989;39:111-8.
33. Grisold W, Drlicek M. Paraneoplastic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 1999;12:617-25.
34. Germain MA, Trotoux J, Bruneau X. Les nerfs laryngés: Étude histomorphométrique et cartographie. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1986;103:379-88.
35. Sunderland S, Swaney WE. The intraneural topography of the recurrent laryngeal nerve in man. *Anat Rec* 1952;114:411-26.
36. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965;27:137A-8A.
37. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. *J Anat* 1984;139:45-58.
38. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977;111:219-23.
39. Fraher JP. On methods of measuring nerve fibres. *J Anat* 1980;130:139-51.
40. Murtagh JA, Campbell CJ. The respiratory function of the larynx. III. The relation of fibre size to function in the recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope* 1951;61:581-90.
41. Dahlqvist A, Carlsoo B, Hellstrom S. Fiber components of the recurrent laryngeal nerve of the rat: a study by light and electron microscopy. *Anat Rec* 1982;204:365-70.
42. Carlsoo B, Izdebski K, Dahlqvist A, Domeij S, Dedo HH. The recurrent laryngeal nerve in spastic dysphonia: a light and electron microscopic study. *Acta Otolaryngol* 1987;103:96-104.
43. Ogura JH, Lam RL. Anatomical and physiological correlations on stimulating the human superior laryngeal nerve. *Laryngoscope* 1953;63:947-59.
44. Piquet J, Hoffmann M, Husson R. Recherches histologiques sur le nerf récurrent et sur les plaques motrices de la musculature laryngée intrinsèque de l'homme. *Acta Otolaryngol* 1957;48:7-13.
45. Ravits JM, Aronson AE, DeSanto LW, Dyck PJ. No morphometric abnormality of recurrent laryngeal nerve in spastic dysphonia. *Neurology* 1979;29:1376-82.
46. Harrison DF. Fibre size frequency in the recurrent laryngeal nerves of man and giraffe. *Acta Otolaryngol* 1981;91:383-9.
47. Repice F. Analisi morfometrica computerizzata della composizione in fibre dei nervi laringei superiori ed inferiori dell'uomo. *Arch Ital Anat Embriol* 1989;94:173-84.
48. Kosaki H, Iwamura S, Yamazaki I. Histologic study of the recurrent laryngeal nerve in spasmodic dysphonia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:129-33.
49. Scheuer JL. Fibre size frequency distribution in normal human laryngeal nerves. *J Anat* 1964;98:99-104.