**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANDRÉ ARMANI

**A influência da emissão sonora nos constituintes
da lâmina própria da prega ventricular**

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

ANDRÉ ARMANI

**A influência da emissão sonora nos constituintes
da lâmina própria da prega ventricular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientador: Prof. Dr. Rui Celso Martins
Mamede**

RIBEIRÃO PRETO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta Tese, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Armani, André

A influência da emissão sonora nos constituintes da lâmina própria da prega ventricular / André Armani - Orientador: Rui Celso Martins Mamede. Ribeirão Preto, 2015.

65p.: 9il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

1. Prega ventricular; 2. Lâmina própria; 3. Colágeno; 4. Fibras elásticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: André Armani

Título: A influência da emissão sonora nos constituintes da lâmina própria da prega ventricular.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Dedicatória

Dedico esta tese à minha esposa, Alessandra, com amor e carinho, por sua infinita paciência e compreensão, pela ajuda e sabedoria nesses anos da realização da tese. Dedico também aos meus filhos, Pedro e Manuela, que fazem valer cada novo dia. Por fim, também dedico esta tese aos meus pais, que, com grande esforço, me fizeram chegar até aqui.

Agradecimentos

Aos meus irmãos Gustavo, Juliana e Guilherme, aos meus cunhados, Ana, Fabiana, Alécia, Gustavo e Patrícia, e aos meus sogros Rubens e Louris, que juntos formamos uma família. Que sempre está presente nos momentos alegres e tristes, fáceis e difíceis, bons e ruins. Agradeço por fazer parte desta maravilhosa família.

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede, grande mestre e exemplo, com o qual convivi durante anos e aprendi a admirar. Obrigado pela dedicação em toda esta minha jornada de aluno de graduação a residente e doutorando.

À Profa. Dra. Maria Celia Jamur, que com muita dedicação me guiou na execução das lâminas e análises desta tese.

Agradeço aos Professores Francisco Veríssimo de Mello-Filho e Hilton Marcos Alves Ricz, pelos ensinamentos e pela maestria na condução da minha formação como médico e cirurgião.

Ao grande amigo Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias, pelas valiosas aulas na pós-graduação e na sua inestimável ajuda com a estatística.

Agradeço a todos os médicos assistentes da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos anos de ensinamentos.

Agradeço a todos os colegas de residência médica, pelos anos compartilhados, tenham todos a certeza de que a amizade construída em todo este tempo será eterna. Muito obrigado!

Agradeço à técnica Vani, pela habilidade e pelo carinho, sem ela esta tese jamais seria concluída.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que tanto se esforçam, diariamente, para o funcionamento das disciplinas. Agradeço, em especial, às secretárias Lilian e Cecília. Muito obrigado!

Resumo

ARMANI, A. **A influência da emissão sonora nos constituintes da lâmina própria da prega ventricular.** 2015. 65f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2015.

As pregas vocais (PV) são estruturas únicas, altamente especializadas na vibração para a produção sonora. Em grande parte, decorrente da estruturação em camadas da lâmina própria (LP). Essa estruturação não está presente ao nascimento, somente após anos de uso vibratório e fonatório da PV é que a LP está finalmente estruturada. As pregas ventriculares (PVT) não são, habitualmente, estruturas vibratórias na produção sonora, e possuem a LP menos organizada em estratos, sendo menos especializadas para a vibração. Até o presente momento, não se tem conhecimento do que ocorre com os constituintes da LP de PVTs de pessoas que as utilizam como fonte produtora de voz. No presente estudo, foram comparados os constituintes colágenos e as fibras elásticas da LP de PVTs de indivíduos que as utilizam como principal fonte vibratória na produção de voz com o grupo controle. Foram selecionados seis indivíduos que utilizavam pelo menos uma das PVTs como fonte de vibração para a produção sonora por ao menos seis anos. Delas, colheu-se pequeno fragmento ($0,5\text{ cm}^2$), que após processamento histológico, as fibras colágenas foram coradas com *Picrosirius Red* e as fibras elásticas com Weigert resorcina-fucsina. Foram obtidas 54 imagens da camada mais superficial da LP de cada PVT para cada coloração. Após a aquisição das imagens, as fibras colágenas tipo I e tipo III, colágenas totais e fibras elásticas foram quantificadas utilizando-se o *software Image-Pro Plus*, e comparadas com as PVTs dos controles. A análise estatística foi realizada por meio do teste T de Student para amostras não pareadas. A porcentagem de colágeno total na camada mais superficial da LP de PVT utilizada como fonte vibratória para a produção de som foi significativamente maior em relação aos controles. O mesmo ocorreu com a quantidade de colágeno tipo I. Não houve diferenças na quantidade de colágeno tipo III e de fibras elásticas. Como conclusão, pode-se afirmar que a utilização da PVT como fonte vibratória produtora de som leva ao aumento da quantidade de fibras colágenas totais e do tipo I na camada mais superficial da sua LP.

Palavras-chave: Prega ventricular, Lâmina própria, Colágeno, Fibras elásticas.

Abstract

ARMANI, A. **The influence of the sound emission on the lamina propria of the ventricular fold.** 2015. 65f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2015.

The vocal folds (VF) are unique structures, highly specialized in vibrating for sound production. This specialization is mainly due to a layered structure of the lamina propria (LP). This layered structure is not present at birth, and develops only after a several years of phonation. The LP of the mature vocal fold consists of three layers. The ventricular folds (VTF) are not originally vibrating structures for sound production, and in its LP the layers are poorly organized. It is not known what happens to the constituents of the LP in the VTF in subjects that use VTF vibration as a source of voice production. In the present study, the distribution and quantity of collagen and elastic fibers of the lamina propria from VTF of patients that use it as the main source of vibration for voice production were compared with the VTF from control subjects. Six individuals that used at least one of the VTF as source of vibration for sound production for minimum of six years were selected. A small fragment of VTF (0.5 cm²) used as vibration source of sound production was collected from each subject. The samples were processed for histological analysis. Collagen fibers were stained with Picrosirius Red and elastic fibers were stained with Weigert's Resorcin-Fuchsin. A total of 54 images were obtained from the superficial layer of the LP from each VTF for each stain. After image acquisition, collagen type I, III, total collagen and elastic fibers were quantified and compared with the VTF from the control group. Quantification was done using Image-Pro Plus software. Statistics were performed using an unpaired Student T test. The amount of total collagen in the most superficial layer of LP when the VTF was used as the source of vibration for the production of sound was significantly higher when compared to controls. The same result was seen for the amount of type I collagen in both groups. There was no difference in the quantity of type III collagen and elastic fibers between the two groups. Vibration of the VTF as a source of sound, for at least six years, leads to an increase in the amount of total collagen fibers and an increase in type I collagen, but does not increase the amount of type III collagen and elastic fibers in the most superficial layer of LP. These results may help elucidate the unique development of the lamina propria of the vocal fold.

Keywords: Ventricular fold, lamina propria, collagen, elastic fibres.

Lista de Figuras

Figura 1-	Imagens representativas de videolaringoscopia de paciente portador de disfonia ventricular espontânea.....	28
Figura 2-	Imagens representativas de videolaringoscopia de paciente submetido à laringectomia parcial vertical	28
Figura 3-	Imagem representativa do <i>software Image-Pro Plus</i> para a quantificação de colágeno total em uma área de 100 μm^2	31
Figura 4-	Imagem representativa do <i>software Image-Pro Plus</i> para a quantificação de fibras elásticas em uma área de 100 μm^2	32
Figura 5-	Imagens representativas dos cortes histológicos	35
Figura 6 -	Representação gráfica da porcentagem de colágeno total, em área total de 300 μm^2 , dos grupos controle e paciente	37
Figura 7 -	Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo I, em área total de 300 μm^2 , dos grupos controle e paciente	38
Figura 8 -	Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo III, em área total de 300 μm^2 , dos grupos controle e paciente	39
Figura 9 -	Representação gráfica da porcentagem de fibras elásticas, em área total de 300 μm^2 , dos grupos controle e paciente	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características dos pacientes incluídos no estudo	36
Tabela 2 -	Características dos indivíduos controles.....	36
Tabela 3 -	Média $\pm$ DP da quantificação de cada tipo de fibra, em %, da área total em 300 μm^2 , para pacientes que utilizavam a PVT como fonte sonora por até seis anos ou por mais de seis anos	41
Tabela 4 -	Média $\pm$ DP das quantificações de cada tipo de fibra entre os grupos de pacientes que possuíam como mecanismo de indução da utilização da PVT, como fonte sonora, uma cirurgia (LPV) e o grupo sem cirurgia (disfonia ventricular espontânea)	41

Lista de Abreviaturas

cm²-	Centímetros Quadrados
COX-2-	Ciclooxigenase-2
DP-	Desvio Padrão
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE-	Hematoxilina e Eosina
Hz-	Hertz
IL-1β-	Interleucina 1 β
LP-	Lâmina própria
LPI-	Camada Intermediária da Lâmina Própria
LPP-	Camada Profunda da Lâmina Própria
LPS-	Camada Superficial da Lâmina Própria
LPV-	Laringectomia Parcial Vertical
mRNA-	RNA Mensageiro
MV-	Músculo Vocal
PV-	Pregas Vocais
PVT-	Pregas Ventriculares
RNA-	<i>Ribonucleic acid</i>
TB-	Tuberculose
TGF-β1-	<i>Transforming growth factor β-1</i>
μm-	Micrômetros
μm²-	Micrômetros Quadrados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	24
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	26
4. RESULTADOS	33
4.1. Características dos indivíduos estudados.....	36
4.2. Quantificação de fibras colágenas.....	37
4.3. Quantificação de fibras elásticas	39
4.4. Análise entre grupos específicos.....	40
4.4.1. Quanto ao tempo de uso da PVT na fonação.....	40
4.4.2. Quanto ao posicionamento da PVT na laringe	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8. ANEXOS	62

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

1. Introdução

A laringe é um órgão cilíndrico, situado na porção média e anterior do pescoço, contendo um esqueleto cartilaginoso e tecidos moles, sempre revestidos por mucosa do tipo respiratória ou fonatória, com funções principais na respiração, circulação, deglutição, fonação e proteção da via aérea. Estende-se da epiglote e das pregas ariepiglóticas, cranialmente, até a borda inferior da cartilagem cricoide, na sua porção mais caudal. Comunica-se com a hipofaringe pelo ádito da laringe e com a traqueia. Na parede medial, de cada lado, encontram-se duas pregas mucosas internas, que se projetam para a luz, as pregas ventriculares (PVTs), também chamadas de pregas vestibulares ou falsas cordas vocais, situadas mais superiormente; e as pregas vocais (PVs), mais inferiormente. O espaço entre as PVTs é chamado de rima vestibular e o espaço entre as PVs, de rima glótica. A área da laringe entre o ádito e a rima vestibular é chamada de vestíbulo laríngeo, enquanto a área entre a rima vestibular e a rima glótica, de ventrículo; e a área abaixo da rima glótica é a cavidade subglótica (Sasaki; Kim, 2003; Dhilló, 2008; Mor; Blitzler, 2015). O ventrículo tem um prolongamento lateral e ascendente, entre a PVT e a cartilagem tireoide, denominado sáculo laríngeo (Dhilló, 2008). O tamanho do sáculo laríngeo é bem variável, mas raramente ultrapassa a membrana tireohioidea (Sasaki; Kim, 2003). O esqueleto cartilaginoso é composto pelas cartilagens epiglote, tireoide e cricoide, que são únicas, e pelos pares das cartilagens aritenoides, corniculadas e cuneiformes. Os tecidos fibroelásticos da laringe estão concentrados em duas principais estruturas: o cone elástico e a membrana quadrangular. O cone elástico ocupa a glote e a infraglote, sendo mais espesso e rígido ao nível da glote, onde termina formando o ligamento vocal. Na supraglote situa-se a membrana quadrangular, que se insere na margem lateral da epiglote e estende-se, posteriormente, até as cartilagens corniculadas e aritenoides. É na porção inferior da membrana quadrangular que se encontra o tecido conjuntivo das PVTs. O tecido que recobre a laringe é quase todo formado por um epitélio do tipo colunar ciliado respiratório, com exceção da cobertura das PVs, em que o epitélio é do tipo escamoso estratificado (Noordzij; Ossoff, 2006). Segundo Lucas et al. (2015), uma pequena porção da borda livre medial das PVTs é também recoberta por um epitélio escamoso estratificado, semelhante ao encontrado nas PVs. A mucosa

que reveste as PVs não contém glândulas secretoras, ao passo que a mucosa das PVTs possui grande quantidade de glândulas mucosas (Nassar; Bridger, 1971); muitas dessas direcionadas para o sáculo e a glote, tendo grande importância na hidratação, lubrificação e proteção imunológica de toda a laringe, em especial das PVs (Gracco; Kahane, 1989).

Dentre as funções da laringe, destaca-se, filogeneticamente, como mais primordial a sua atuação como esfíncter, protegendo a via aérea da entrada de líquidos e alimentos (Sasaki; Buckwalter, 1984). De acordo com Perelló (1978), a epiglote é a parte superior desse esfíncter, as PVTs a porção medial e as PVs sua porção inferior. Pela descrição de Sasaki e Buckwalter (1984), a função respiratória da laringe surge no segundo momento da evolução junto com o desenvolvimento do complexo cricoide-aritenóide, governado pelo reflexo muscular de abertura da laringe, com a inspiração, e de fechamento parcial da laringe na expiração. Já a função fonatória e de comunicação da laringe, melhor observada nos mamíferos, surge em momento mais avançado da evolução; considerada por Negus (1949), a de menor importância dentre as funções laríngeas.

Por ser a comunicação oral fundamental aos humanos, e como a principal estrutura vibratória e fonte sonora da laringe são as PVs, elas têm sua estrutura e funcionamento amplamente estudados (Chan et al., 2006). Sabe-se que a PV humana possui uma estrutura histológica muito peculiar e complexa, que possibilita a emissão de sons. O arranjo do tecido conjuntivo dentro da PV permite a vibração da membrana mucosa com mínima restrição. Para tal vibração, histologicamente, a PV contém cinco camadas: o epitélio escamoso; a camada superficial da lâmina própria, clinicamente conhecida como espaço de Reinke; a camada intermediária da LP e a camada profunda da LP; estas duas últimas juntas formam o ligamento vocal e, finalmente, o músculo *vocalis* ou músculo tireoaritenóideo (Noordzij; Ossoff, 2006). A camada superficial da LP é reconhecida pela pouca quantidade de fibras proteicas, já a camada intermediária LP, pela abundância em fibras elásticas, e a camada profunda da LP pela sua grande quantidade de colágenos (Hirano et al., 1983). Esse tecido conjuntivo, altamente especializado, é constituído por células imersas em uma matriz

extracelular. Segundo Catten et al. (1998), as células mais abundantes da LP são os fibroblastos, macrófagos e miofibroblastos, enquanto a matriz extracelular se constitui por fibras colágenas e elásticas e uma substância fundamental amorfa constituída, essencialmente, de glicosaminoglicanas. As glicosaminoglicanas, como o queratan sulfato, heparan sulfato e sulfato de condroitina, se ligam a proteínas para formar as proteoglicanas (fibromodulina, decorina, biglican e condroitina) que exercem importante papel na ligação da LP à membrana basal, na migração celular, diferenciação celular, no transporte molecular e na concentração molecular, modulando a função do fibroblasto e a sua migração (Butler et al., 2001). Além disso, participam na viscosidade e no controle osmolar local. O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana produzida por diferentes tipos celulares como macrófagos e fibroblastos. Com meia vida de três a cinco dias, liga-se às fibras colágenas e a outras proteoglicanas e proteínas para constituir a matriz extracelular, a qual assegura a regulação osmótica, viscosidade, arquitetura e habilidade do tecido em resistir a traumas (Hammond et al., 1998). O ácido hialurônico, que também exerce papel importante na modulação da inflamação, permitindo a recomposição dos tecidos no pós-operatório (Pawlak et al., 1996; Chan et al., 2001); possui, segundo Branco et al. (2014), distribuição uniforme pela LP da PV. A quantidade de cada um dos componentes do tecido conjuntivo, células e matriz extracelular, varia ao longo da espessura da PV. Desde os estudos de Hirano et al. (1983), já se conhece a estratificação da LP da PV em camadas. Muñoz-Pinto et al. (2009) mostraram que a camada superficial da LP da PV contém poucas fibras colágenas e que a maioria dessas são fibras mais delgadas, enquanto a camada profunda da LP contém a maioria das fibras colágenas e estas são mais espessas. Julias et al. (2013), concordando com Madruga de Melo et al. (2003), mostraram que a quantidade de colágeno é menor na camada mais superficial, diminui ainda mais na camada média e torna-se maior na camada profunda junto ao músculo tireoaritenóideo.

Essa estratificação em três camadas da LP das PV, como demonstrado por Hartnick et al. (2005), não está presente logo ao nascimento. Segundo os autores, já é possível detectar, aos dois meses de vida, uma diferenciação bilaminar da LP, porém é somente na puberdade que a maturação, em três

camadas, dessa estrutura, está completa. Os autores sugerem, ainda, que essa diferenciação aconteça devido à função fonatória progressiva à qual a PV é submetida ao longo dos anos. Destaca-se, também, que as dimensões da laringe são diferentes no recém-nascido e no adulto, pois no recém-nascido a glote posterior (mais ligada à respiração) ocupa, aproximadamente, 70% de toda a área glótica; favorecendo, aparentemente, a respiração sobre a fonação nesse período da vida (Sato et al., 2015).

Durante as últimas décadas, um novo componente celular da LP da PV vem sendo descrito e pesquisado, as *stellate cells*, ou células estreladas. Essas são uma classe especial de células intersticiais, morfologicamente similares aos fibroblastos, que têm importante papel no metabolismo da matriz extracelular da LP das PVs, atuando também como um tipo de célula tronco ou célula progenitora (Sato et al., 2003; Kurita et al., 2015). Fuja et al. (2005) mostraram que as *stellate cells* são um tipo celular bioquimicamente diferente dos fibroblastos da traqueia. Como as *stellate cells* de outras partes do corpo, elas estão associadas a um nicho, a mácula flava. Para Sato et al. (2012a), a mácula flava tem relação com o crescimento e a maturação das PVs e, segundo esses autores, a atividade das *stellate cells* no metabolismo, na produção e regulação da matriz extracelular da LP das PVs, é estimulada pela fonação (Sato et al. 2011).

Por outro lado, a morfologia e a função da PVT têm despertado pouco interesse por ser um elemento anatômico com funções menos definidas e pouca ação na fonação (Guida et al., 1998). As PVTs são formadas por um tecido gorduroso e fibroelástico, fibras musculares e um ligamento vestibular, cobertos por um epitélio (Guida; Zorzetto, 2007); e além de agir como parede superior do ventrículo da laringe e de delimitar anteriormente o sáculo laríngeo, apresenta uma borda que se projeta para a supraglote e parece exercer importante função, como esfíncter, nos reflexos de engasgo, expectoração, vômito, defecação, micção, durante o riso e na manobra de Valsalva. Existe, segundo Kutta et al. (2002), uma função imunológica das PVTs ao secretar peptídeos com função antimicrobiana em seu muco. Confirmando o pouco interesse no estudo anatomofisiológico da PVT, somente em 1998 é que Reidenbach esclareceu como seria a distribuição das fibras musculares nesse elemento anatômico.

Segundo o autor, essas fibras se dispõem em forma de três fascículos musculares com função adutora. Um estudo mais recente mostrou que essas fibras estão dispostas lateralmente na PVT, tendo na borda livre maior concentração de tecido conjuntivo e glandular (Moon; Alipour, 2013). Guida e Zorzetto (2007) destacaram que esse tecido conjuntivo é constituído por fibras colágenas e elásticas, dispostas de forma irregular numa camada subepitelial. No entanto, ainda não havia identificação detalhada dos elementos que constituem esse tecido conjuntivo e principalmente a sua matriz extracelular, sendo esse estudo concluído por Lucas (2008), em sua dissertação de mestrado.

Historicamente, as PVTs nunca foram implicadas na fisiologia normal da produção de voz; porém mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado a sua participação na vocalização normal. A contração de estruturas supraglóticas pode aumentar a eficiência da vibração das PVs em indivíduos normais, de acordo com Bailly et al. (2014), que observaram que as contrações das PVTs podem sofrer alterações, diminuindo ou aumentando a vibração das PVs. Em estudo com pacientes que tiveram a supraglote ressecada para tratamento do câncer, diferenças significativas foram encontradas na ressonância e na qualidade vocal (Stager, 2011). Em algumas situações, as PVTs podem, até mesmo, ser a fonte vibratória produtora de sons específicos, como no *glottal stop* (Stager et al., 2000); na vocalização por sussurros (Rubin et al., 2006); ou até em alguns tipos de cantos (Borch et al., 2004). Há situações, porém, em que a PVT funciona como principal fonte sonora, principalmente em condições patológicas. As etiologias mais frequentes nesses casos são: severa tensão muscular; alterações psicológicas; inoperância da PV ou mesmo na sua ausência, como na ressecção cirúrgica de um câncer glótico (Sataloff, 1997). Desse modo, um som mais grave e de pior qualidade passa a ser emitido, é a chamada disfonia ventricular ou "*Plica ventricularis*". Apesar da ausência de estudos mais recentes, a incidência estimada da disfonia ventricular, na população geral, é de 4% (Jackson, C; Jackson, CL, 1935). O uso da vibração das PVTs para a fonação gera voz caracterizada, principalmente, por *pitch* baixo, com frequência aproximada de 60 Hz (Kendall; Leonard, 1997) e monótona (Maryn et al., 2003). Ainda, segundo Maryn et al. (2003), o diagnóstico da disfonia ventricular é obtido

por meio de avaliação perceptual da voz, quando podem ser percebidas as características desse tipo de disfonia (rouquidão, soprosidade e diplofonia), e ao exame endoscópico da laringe (videolaringoscopia com estroboscopia); que mostra a constrição anormal das PVTs e a onda mucosa, produtora do som. Essa função, anormalmente aumentada da PVT, leva, com o tempo, à hipertrofia da mucosa da PVT (Kosoković; Lenarcic-Cepelja, 1973; Kendall; Leonard, 1997).

O exposto acima mostra que na PV os componentes do tecido conjuntivo exercem papel importante na emissão do som, e que o mesmo se apresenta estratificado e especializado somente a partir da puberdade, ou seja, após anos de estímulo vibratório fonatório. Com isso, supõe-se que o tecido conjuntivo da PVT tenderia a se estratificar também se passasse por estímulo semelhante. Assim, no presente estudo, pretendeu-se analisar as mudanças estruturais que ocorrem nos constituintes dos tecidos da PVT, em particular no tecido conjuntivo subepitelial, quando esta passa a ser a fonte sonora. Este estudo pode levar à melhor compreensão da complexa fisiologia de produção sonora pela laringe e ao refinamento das técnicas para o tratamento das patologias laríngeas.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi analisar as mudanças nos constituintes da LP da PVT, de acordo com:

- O uso fonatório da PVT;
- O tempo de uso da vibração da PVT (até seis anos e por mais de seis anos);
- O posicionamento da PVT aos níveis ventricular e glótico.

3. Casuística e Métodos

Foram avaliados seis indivíduos que utilizavam a vibração mucosa de pelo menos uma prega ventricular como fonte sonora para a produção de voz. Eles foram selecionados no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, nº 4637/2010 (Anexo A) e todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram previamente informados sobre os objetivos e condições de realização da mesma e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

A seleção dos pacientes foi realizada de duas formas:

- pacientes com disfonia: os pacientes com queixas de disfonia como rouquidão, soprosidade e diplofonia foram submetidos a um rigoroso exame endoscópico da laringe (videolaringoscopia com estroboscopia) para constatar se a voz emitida era realmente pela vibração das PVTs (Figura 1). Esses pacientes também precisavam apresentar lesões que exigissem uma laringoscopia direta.
- pacientes com rebaixamento da PVT: nos ambulatórios da especialidade, foram identificados pacientes submetidos à laringectomia parcial vertical (LPV), em que se realizou cordectomia por via cervical seguida de reconstrução glótica com o rebaixamento da PVT (Figura 2); e que necessitavam de uma laringoscopia direta, sob anestesia geral. Rigoroso exame endoscópico da laringe (videolaringoscopia com estroboscopia) constatava a participação da PVT na emissão da voz.

Figura 1 - Imagens representativas de videolaringoscopia de paciente portador de disfonia ventricular espontânea, em que a voz é produzida pela vibração das pregas ventriculares (PVT) e não pela vibração das pregas vocais (PV). **(a)** Laringe em abdução, visualizando-se as PV e as PVT. **(b)** Laringe em adução (fonação), em que a constrição das PVT não permite a visualização das PV

Figura 2 - Imagens representativas de videolaringoscopia de paciente submetido à laringectomia parcial vertical esquerda e reconstrução da glote com o abaixamento da prega ventricular (PVT) esquerda. A voz é produzida pela vibração da prega vocal (PV) direita com a PVT esquerda. **(a)** Laringe em abdução. **(b)** Laringe em adução - note que no momento da foto, a adução da laringe ainda não é máxima, ou seja, sem coaptação da PV com a PVT

Foram identificadas, nesses indivíduos, suas características demográficas, idade, sexo, consumo de tabaco, motivo e tempo de uso da PVT na fonação, realização ou não de fonoterapia, motivo da realização da laringoscopia direta e, finalmente, identificação da PVT, de onde foi retirada a amostra.

Durante a laringoscopia direta, foi coletada uma amostra de aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$ do bordo livre do terço médio da PVT, que o paciente utilizava como fonte de vibração para a produção da voz. Como controle, foram utilizadas amostras do terço médio de PVT normal, obtidas de três indivíduos. As laringes foram retiradas até 24 horas *post-mortem* de cadáveres do sexo masculino, sem história prévia de patologias laríngeas, não tabagistas e que não foram submetidos à intubação orotraqueal por mais de três dias antes do óbito. As amostras de tecido foram fixadas, imediatamente após a coleta, durante 24 horas em formol a 10%. A seguir, os tecidos foram lavados em água destilada e desidratados em séries crescentes de álcool etílico (50% - 100%), permanecendo de 3 a 4 horas em cada álcool. Após, as amostras foram mergulhadas em óleo de terpineol e diafanizadas em benzol (três banhos com duração de 3 horas cada) e, então, incluídas em parafina, com orientação espacial, para a obtenção de cortes coronais da PVT. Aproximadamente 40 cortes de $6\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos de cada amostra. Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de alcoóis até 50% e, finalmente, lavados com água corrente e água destilada. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a análise morfológica. No mínimo 15 cortes de cada amostra foram corados com *Picrosirius Red* (0,1 g de *Sirius Red* em 100 ml de solução de ácido pícrico saturado), pH 2,0, por 20 minutos (Junqueira et al., 1979), para a identificação de fibras colágenas. Outros 15 cortes foram corados com Weigert resorcina-fucsina por 60 minutos para a identificação de fibras elásticas. Após as colorações, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados em lâmina com Permount.

Para a análise de imagens foram selecionados 18 cortes de cada paciente (total 108 cortes) e seis de cada controle (total 18 cortes). Cinquenta e quatro cortes de pacientes e nove de controle foram corados com *Picrosirius Red*, outros 54 cortes de pacientes e nove de controle foram corados com a solução de

Weigert. As imagens desses cortes foram observadas em microscópio Olympus BX50 (objetiva de 20x) equipado com câmera digital SPOT - RT3. Todas as imagens foram adquiridas com os mesmos ajustes do microscópio e da câmera, no mesmo período de tempo. As imagens foram obtidas da LPS (camada subepitelial). Em seguida, as imagens foram analisadas utilizando-se o *software Image-Pro Plus* 3D suite: 7.0, para a quantificação do colágeno e das fibras elásticas. Para a coloração de Weigert foi utilizado o campo claro convencional. Os cortes corados com *Picrosirius Red* foram observados à microscopia de polarização, que diferencia as fibras colágenas por meio da birrefringência. As fibras com birrefringência nas cores amarela, laranja e vermelha representam o colágeno do tipo I, enquanto o colágeno tipo III possui birrefringência de cor verde. A coloração de Weigert cora as fibras elásticas de marrom escuro. Para a quantificação de fibras colágenas e elásticas, três áreas com $100\ \mu\text{m}^2$ (9.782,2207 pixels) foram mensuradas na camada mais superficial do tecido conjuntivo de cada imagem adquirida, totalizando $300\ \mu\text{m}^2$ (29.346,6621 pixels) por imagem.

A quantificação do colágeno total dessas áreas foi realizada considerando a intensidade de birrefringência total (tons de vermelho mais os tons de verde) do colágeno (Figura 3). Depois, somente a birrefringência de cor verde, indicativa da presença de colágeno tipo III, foi quantificada. A cor verde (e seus tons) foi selecionada, manualmente, para que a quantificação fosse feita pelo *software*. Para a quantificação do colágeno tipo I, subtraímos do colágeno total o colágeno tipo III. Esse processo era repetido para cada uma das imagens coradas com *Picrosirius Red*. Para as fibras elásticas, o mesmo processo foi empregado, sendo selecionadas áreas similares, que foram utilizadas para a análise do colágeno. As fibras elásticas coradas em marrom escuro pelo corante de Weigert foram quantificadas por meio do *software* (Figura 4).

Figura 3 - Imagem representativa do software *Image-Pro Plus* para a quantificação de colágeno total em uma área de $100\mu\text{m}^2$

Ao final desse processo, foram obtidas nove medidas de cada fibra em $300\mu\text{m}^2$ para cada um dos seis pacientes e três medidas para cada um dos três controles. Em cada medida foram quantificados o colágeno total, o do tipo III e do tipo I (pela subtração do colágeno total pelo do tipo III) e as fibras elásticas. Foram obtidas as médias das medidas de cada tipo de fibra para cada paciente e cada controle. A análise estatística foi realizada sobre essas médias, utilizando o Teste T de Student para amostras não pareadas, mostrada em porcentagem das fibras colágenas e elásticas, sobre a área total.

Figura 4 - Imagem representativa do software *Image-Pro Plus* para a quantificação de fibras elásticas em área de $100 \mu\text{m}^2$

4. Resultados

Segundo os critérios estabelecidos, foram selecionados dois indivíduos do Ambulatório de Disfonias e quatro pacientes submetidos à LPV com reconstrução glótica. A média de idade dos pacientes foi de 56,6 anos, com média de tempo de uso da PVT na fonação de 9,8 anos e a média de idade dos controles foi de 51 anos.

No corte histológico da PVT de um indivíduo controle, corado com HE, observou-se o epitélio colunar ciliado, sua LP não estratificada em camadas e a presença de tecido glandular (Figura 5a). Na PVT de um paciente notou-se, logo abaixo do epitélio colunar, maior quantidade de tecido conjuntivo (Figura 5b). Na coloração com *Picrosirius Red*, em uma PVT controle, foi possível identificar a predominância de fibras colágenas tipo III coradas em verde (Figura 5c). Já na PVT de um paciente, verificou-se maior concentração de colágeno, principalmente o de tipo I, corado em vermelho, laranja e amarelo (Figura 5d). Nos cortes corados com a solução de Weigert, evidenciou-se pouca quantidade de fibras elásticas, coradas em marrom escuro, na camada subepitelial, tanto de um controle (Figura 5e) quanto na PVT de um paciente (Figura 5f).

Figura 5 - Imagens representativas dos cortes histológicos. **(a)** HE 40X, PVT do controle. **(b)** HE 40X, PVT de paciente (seta marca o epitélio, *marca a lâmina própria, + marca o tecido glandular). **(c)** Microscopia de polarização, *Picrosirius Red* 200X, do mesmo controle mostrado em **a**, notou-se maior quantidade de fibras colágenas tipo III, coradas em verde. **(d)** Microscopia de polarização, *Picrosirius Red* 200X, do mesmo paciente apresentado em **b**, nota-se a grande quantidade de colágeno tipo I, corado de vermelho, amarelo ou laranja. **(e)** Coloração de Weigert, 200X, para o mesmo controle evidenciado em **a**. **(f)** Coloração de Weigert, 200X, para o mesmo paciente mostrado em **b**. PVT: prega ventricular

4.1 Características dos indivíduos estudados

A Tabela 1 resume as características de cada um dos seis pacientes incluídos no estudo, que utilizavam a vibração das PVT como fonte produtora de som.

Tabela 1 - Características dos pacientes incluídos no estudo

Iniciais	Idade na coleta (anos)	Sexo	Motivo da vibração da PVT	Tempo de uso da PVT na fonação (anos)	Tabagismo	Fonoterapia	Motivo da laringoscopia direta	PVT da coleta
SSSG	44	F	Disfonia ventricular	17	Não	Não	Retirada de pólipos da PV direita	Direita
CMM	42	M	Disfonia ventricular	6	Não	Sim	Suspeita de Tb laríngea - não confirmada	Esquerda
MEOL	48	F	LPV	6	Parou há 8 anos	Sim	Recidiva na glote à direita.	Esquerda
MSM	67	M	LPV	6	Sim	Sim	Área suspeita no seio piriforme	Direita
CUT	61	M	LPV	11	Sim	Não	Área suspeita na base da língua	Esquerda
OL	78	M	LPV	13	Parou há 14 anos	Sim	Área suspeita na comissura anterior	Esquerda

LPV: laringectomia parcial vertical; PV: prega vocal; PVT: prega ventricular; Tb: tuberculose

Os dados demográficos dos indivíduos utilizados como controle estão sintetizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características dos indivíduos controles

Iniciais	Idade (anos)	Tempo <i>Most-Mortem</i> (horas)	<i>Causa Mortis</i>
LAF	43	6h e 40min	Sepse
CLV	60	6h e 50min	Infarto Agudo do Miocárdio / Hipertensão Arterial Sistêmica
AEM	50	10h e 30min	Insuficiência Respiratória / Pneumonia

Não houve diferença estatística na média das idades dos pacientes em comparação com os controles.

4.2 Quantificação de fibras colágenas

A porcentagem de colágeno total foi significativamente superior nas PVT utilizadas na vibração para a produção sonora, com média de $23,4\% \pm 2,7\%$ da área total, em comparação com os controles, média de $7,4\% \pm 1,5\%$ da área total ($p < 0,001$) (Figura 6).

Figura 6 - Representação gráfica da porcentagem de colágeno total em área de $300 \mu\text{m}^2$, dos grupos controle e de pacientes. Os dados representam a média e o desvio padrão ($p < 0,001$)

A porcentagem de fibras colágenas tipo I também foi estatisticamente superior nos pacientes em relação aos controles ($p<0,001$), com média nos pacientes de $18,8\% \pm 6,1\%$ e média de $1,4\% \pm 0,6\%$ ($p<0,01$) nos controles (Figura 7).

Figura 7 - Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo I, em área total de $300 \mu\text{m}^2$, dos grupos controle e de pacientes. Os dados representam a média e o desvio padrão ($p<0,01$)

Na porcentagem de colágeno tipo III não houve diferença estatística ($p=0,61$) entre os grupos, com média de $4,5\% \pm 4,7\%$ nos pacientes e $6,0\% \pm 0,9\%$ nos controles (Figura 8).

Figura 8 - Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo III, em área total de $300 \mu\text{m}^2$, dos grupos controle e de pacientes. Os dados representam a média e o desvio padrão ($p=0,61$)

4.3 Quantificação de fibras elásticas

Não foi observada diferença estatística ($p=0,28$) na porcentagem das fibras elásticas entre os grupos. O grupo de pacientes obteve média de $10,1\% \pm 11,8\%$ e o grupo controle de $1,8\% \pm 0,7\%$ (Figura 9).

Figura 9 - Representação gráfica da porcentagem de fibras elásticas, em área total de $300 \mu\text{m}^2$, dos grupos controle e de pacientes. Os dados representam a média e o desvio padrão ($p=0,61$)

4.4 Análise entre grupos específicos

4.4.1 Quanto ao tempo de uso da PVT na fonação

Distribuindo os pacientes estudados de acordo com o tempo de uso da PVT na fonação em dois grupos, obteve-se um com seis anos de uso e outro com mais de seis anos de uso; e média de 13,6 anos. Neste último grupo, foram observados pacientes com 11, 13, e 17 anos, em que a PVT era utilizada para a fonação. Cada grupo era composto por três indivíduos. Comparando a quantidade de fibras colágenas totais, do tipo I e do tipo III e fibras elásticas, não se constatou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 3).

Tabela 3 - Média $\pm$ DP das porcentagens de cada tipo de fibra, em %, da área total de 300 μm^2 , para pacientes que utilizavam a PVT como fonte sonora por seis anos ou por mais de seis anos. Valores em % da área de 300 μm^2 , ocupada por cada tipo de fibra na camada mais superficial da LP da PVT

Tempo de uso da PVT na fonação			
	6 anos	Mais de 6 anos	p
Colágeno Total	23,1 $\pm$ 1,8	22,6 $\pm$ 3,9	0,865
Colágeno Tipo I	18,9 $\pm$ 3,2	18,0 $\pm$ 9,0	0,879
Colágeno Tipo III	4,2 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 7,2	0,922
Fibras elásticas	3,2 $\pm$ 5,1	16,5 $\pm$ 13,3	0,183

PVT: prega ventricular; LP: lâmina própria; DP: desvio padrão

4.4.2 Quanto ao posicionamento da PVT na laringe

Agrupando os pacientes, conforme a posição da PVT na fonação, obtiveram-se dois grupos:

- com PVT posicionada no nível glótico. Foram quatro pacientes com a PVT posicionada ao nível glótico (pós LPV).
- com PVT posicionada no nível vestibular. Foram dois pacientes com a PVT ao nível ventricular (disfonia ventricular espontânea).

A análise das quantificações de cada tipo de fibras não mostrou significância entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Média $\pm$ DP das porcentagens de cada tipo de fibra entre os grupos de pacientes com a PVT ao nível ventricular e glótico. Valores em % da área de 300 μm^2 , ocupada por cada tipo de fibra na camada mais superficial da LP da PVT

Posição da PVT na fonação			
	Nível ventricular (disfonia ventricular)	Nível glótico (Pós LPV)	p
Colágeno Total	22,8 $\pm$ 1,6	23,0 $\pm$ 3,4	0,957
Colágeno Tipo I	14,4 $\pm$ 8,1	20,5 $\pm$ 4,8	0,292
Colágeno Tipo III	8,4 $\pm$ 6,5	2,5 $\pm$ 2,5	0,156
Fibras Elásticas	7,5 $\pm$ 10,2	11,0 $\pm$ 13,5	0,768

PVT: prega ventricular; LPV: laringectomia parcial vertical; LP: lâmina própria; DP: desvio padrão

5. Discussão

Muitos pacientes foram excluídos da amostra, pois não apresentavam motivo para se realizar o exame sob anestesia geral, anestesia esta necessária para a ressecção do fragmento da PVT para este estudo. Nos pacientes selecionados, todo cuidado foi aplicado para que não ocorresse lesão decorrente desse procedimento. Constatou-se que nenhum paciente teve sua qualidade vocal alterada após o procedimento, confirmando a ausência de lesão adicional. Não houve dificuldades na execução do processamento histológico e na quantificação das fibras, pois foram realizados em laboratório experimentado neste tipo de pesquisa.

Quando um indivíduo deixa de utilizar as PVs para a fonação e começa a usar a PVT para esta função, gera uma condição em que uma estrutura não adaptada à vibração passa a receber este estímulo. Com essa mudança, esperava-se que houvesse também alteração no padrão tissular para adequar esta estrutura à nova função. Porém, no presente estudo, observou-se que as PVTs utilizadas como fonte vibratória na produção de som por seis anos ou mais apresentaram maior quantidade de colágeno total e do tipo I na LPS. A única descrição histológica sobre PVTs acometidas por disfonia ventricular é de Kosoković et al. (1977), que descreveram edema e infiltrado inflamatório das PVTs em fases iniciais da disfonia ventricular, e em fases mais avançadas, hipertrofia e metaplasia escamosa do epitélio, e na LP redução do componente glandular e permeação por um tecido conectivo denso. Essa classificação em fases iniciais e tardias é histológica, e os autores não fazem referência à existência de alguma correlação clínica, com severidade da disfonia ou com o tempo de uso da PVT na fonação. Embora esses resultados se assemelhem aos do presente estudo, o trabalho é apenas descritivo e não trata de comparação estatística com uma PVT normal. Desde então, a PVT utilizada como fonte vibratória produtora de sons não havia sido estudada histologicamente.

Dos seis casos analisados, quatro foram submetidos à cirurgia oncológica para tratamento de carcinoma epidermoide inicial da região glótica. Para isso, realizou-se LPV, na qual a PV comprometida foi extirpada e procedeu-se ao rebaixamento da PVT, a fim de preencher o espaço e reconstruir a área glótica; permitindo, assim, melhora na função fonatória (Martins Mamede et al., 2005).

Deve-se salientar que somente a laringectomia por via cervical permite essa reconstrução funcional, pois por via endoscópica, mais frequentemente utilizada nos dias de hoje, não existem técnicas para rebaixar a PVT. Nestes quatro pacientes, este foi o mecanismo utilizado na vibração das PVTs para a produção sonora; e estas PVT estavam posicionadas ao nível glótico. Os outros dois pacientes foram diagnosticados com disfonia ventricular espontânea, ou seja, a PVT estava posicionada ao nível ventricular e ambas vibravam quando da emissão sonora.

Durante a fonação, as PVs, sob controle neuromuscular, são aduzidas, assumindo posição fonatória na linha média (Simonyan; Horwitz, 2011). Esse componente mioelástico tem também influência na tensão, massa e elasticidade das PVs, controlando a modulação e manutenção da vibração. A partir daí, predomina a função aerodinâmica, em que o fluxo expiratório, por encontrar a glote fechada, sofre aumento na pressão subglótica até conseguir entreabrir as PVs e eliminar pequeno fluxo de ar, que irá diminuir a pressão subglótica e, novo fechamento das PVs ocorre. Esse fluxo de ar, ao passar pelas PV entreabertas, faz com elas vibrem no sentido horizontal, gerando um som. Esse mesmo fluxo gera outro som devido à vibração da borda livre da PV no sentido vertical (de baixo para cima), decorrente do princípio de Bernoulli (atração da borda livre da PV para a linha mediana devido à passagem do fluxo de ar). Pelo menos mais outro som aparece, agora no plano anteroposterior. A resultante da somatória desses sons gera o produto final que é a voz harmônica (Khosla et al., 2008). Portanto, o som agradável da voz humana somente é possível numa estrutura especializada como a da PV, que possui uma LP própria, escalonada, que se mostra rígida no plano profundo e flexível no plano superficial; permitindo, assim, a vibração em vários planos. Por outro lado, a PVT apresenta uma estrutura diferente da PV, pois exerce a função de esfíncter para impedir a entrada de objetos estranhos na via aérea e também a saída de ar durante manobras do tipo Valsalva. Deve-se salientar que, segundo Lucas et al. (2015), uma PVT normal tem, na sua LP, quantidades de fibras colágenas muito semelhantes a uma PV, porém a sua LP não é estruturada em camadas como a PV. A LP da PV tem, na sua camada mais superficial, escassez de fibras colágenas (Hahn et al., 2006;

Noordzij; Ossof, 2006), estando a maioria dessas fibras concentradas na camada mais profunda da LP (Gray et al., 1993). Quando o indivíduo deixa de utilizar a PV e passa a usar a PVT na função de emitir som, gera estímulos que podem alterar as estruturas não adaptadas à vibração. Com a mudança da função, a PVT deve ficar sob a influência das variações de pressão, como as descritas acima, a fim de propiciar essa vibração e, por conseguinte, a emissão sonora. Porém, mesmo depois de 17 anos, a PVT não sofreu alteração na sua estrutura no sentido de se igualar à PV, pois os resultados do presente estudo mostraram que esses indivíduos apresentam na camada mais superficial da LP da PVT, maior quantidade de colágeno total e do tipo I em relação aos controles, sem diferenças nas quantificações de colágeno tipo III e fibras elásticas. Era esperado, caso a diferenciação fosse no sentido de melhora da qualidade do som, que a vibração para a produção sonora produzisse um estímulo de diferenciação da estrutura na direção de uma PV normal madura, ou seja, uma diminuição na quantidade de colágeno total na camada superficial da LP da PVT estudada.

Sabe-se que cada região da laringe está sujeita a regimes de pressões diferentes durante a fonação normal (van den Berg et al., 1957; Scherer et al., 1983). A maior pressão fica ao nível subglótico, e essa diferença de pressão é fundamental para a fonação fisiológica harmônica (Jiang; Titze, 1994; Rosa et al., 2003). Mais recentemente, num estudo em laringes caninas excisadas, Alipour e Scherer (2012) mostraram que a pressão no ventrículo da laringe pode variar conforme as PVTs assumem determinada posição durante a fonação. Essa pressão ventricular é maior quanto mais próximas estão as PVTs, e tem seu pico quando elas começam a vibrar e produzir som, mas nunca essa pressão supera 65% da pressão infraglótica à que as PVs estão submetidas durante a fonação. Não se tem conhecimento, até o momento, qual é a influência desse regime de pressões durante a fonação na diferenciação das PVs e das PVTs, mas é possível supor que PVTs submetidas a um período longo de pressão mais elevada, podem ter sua LP modificada. No presente estudo, as diferenças de pressões aos níveis glótico e ventricular não parecem exercer influências na LP das PVTs no período de até 17 anos (período máximo avaliado neste estudo), pois não foram encontradas diferenças entre as PVTs que mantiveram ao nível

glótico (pacientes submetidos à reconstrução da glote com o rebaixamento da PVT pós-cirurgia) e as que permaneceram ao nível ventricular (pacientes com disfonia ventricular). Também foi possível observar que o trauma cirúrgico e o processo de reparo cicatricial pós-operatório não foram relevantes para a constituição da camada superficial da LP da PVT.

De fato, o estímulo vibratório parece ser importante na composição da matriz extracelular da LP da PV e Sato et al. (2011) relataram que uma prega vocal adulta sem estímulo fonatório por mais de uma década mostrava-se atrófica, incluindo a mácula flava. A PV não apresentava o ligamento vocal, nem o espaço de Reinke; e a LP evidenciava estrutura uniforme. Sato et al. (2012b) detectaram que as PVs de crianças, que nunca foram submetidas à fonação, eram hipoplásicas e rudimentares, e em sua LP encontraram poucas fibras colágenas e elásticas e estas não estavam estruturadas em camadas. Isso mostra a importância do estresse fonatório sobre a PV na formação dos constituintes da sua matriz extracelular. O tempo de uso da PV na fonação também é fator importante na quantidade, distribuição e estratificação dos constituintes da LP (Hartnick et al., 2005; Sato et al., 2011, 2012a). No presente estudo, o tempo prolongado de uso da PVT como fonte vibratória produtora de som não se mostrou suficiente para alterar os componentes da camada superficial da LP, pois os grupos com seis anos de uso e mais de seis anos não se apresentaram diferentes quanto aos constituintes da LP da PVT. O efeito que o estímulo vibratório produziu na LP das PVTs foi o aumento do colágeno total e do tipo I, mas esse efeito não ocorre nas PVs, uma vez que o colágeno tipo I está associado a tecidos mais resistentes a forças de estiramento como ossos, tendões, ligamentos, cápsulas de articulações (Culav et al., 1999), sendo considerada uma fibra mais forte e de maior diâmetro quando comparada a outros tipos de fibras colágenas. O aumento na quantidade dessas fibras, observado neste estudo, pode dificultar as propriedades vibratórias da PVT na produção sonora. O colágeno tipo I também é o principal componente presente na fase tardia do tecido cicatricial (Clark, 1985), sugerindo que o mecanismo de aumento do colágeno tipo I na camada mais superficial da LP da PVT observado neste

estudo possa ser um mecanismo de reparo tissular cicatricial pelo trauma repetido causado pela vibração das PVT por tempo prolongado.

Uma justificativa para as diversidades de respostas encontradas à fonação entre a PV e a PVT é a diferença de tamanho do epitélio escamoso estratificado de revestimento, presente na borda livre das duas pregas, muito menor nas PVTs. Kojima et al. (2014a) evidenciaram que a profundidade da lesão no epitélio estratificado da PV depende da duração e intensidade do fonotrauma, e que a barreira epitelial das PVs, em coelhos, se manteve intacta após o fonotrauma de intensidade moderada. É possível que esse fato ocorra, pois, segundo Gray (2000), o epitélio que recobre as PV tem entre suas células micro projeções que podem, entre outras funções, ser uma adaptação para suportar o trauma repetido, causado pela fonação. A escassez de epitélio escamoso estratificado de revestimento ou a ausência de micro projeções nas suas células, explicaria o tipo de resposta demonstrada pela PVT.

Ainda com respeito à proteção que o epitélio oferece à LP da PV, o estudo de Kojima et al. (2014b) não identificou aumento na expressão de genes de citocinas inflamatórias, responsáveis pela formação de cicatriz fibrótica, como a interleucina 1β (IL- 1β), ciclooxygenase-2 (COX-2) e o *transforming growth factor β -1* (TGF- β 1), após o trauma vibratório da fonação na PV. Chang et al. (2014) mostraram que a expressão do TGF- β 1 ocorre, principalmente, nos fibroblastos da LP da PV e não nas células do epitélio escamoso, sugerindo que somente após a lesão do epitélio das PVs é que acontece a produção dessas citocinas pelos fibroblastos de sua LP e a formação de cicatriz fibrótica, pois essas citocinas, principalmente o TGF- β 1, são bem identificadas nos processos inflamatórios que resultam nesse tipo de resposta (Shah et al., 1995; Ferguson et al., 2009; Ocleston et al., 2011). No presente estudo, foi observado aumento de colágeno tipo I; colágeno este, geralmente ligado ao processo de reparo e cicatrização do tipo fibrótica. Apesar de não se conhecer o seu efeito sobre o epitélio das PVTs, é possível supor que o fonotrauma repetido sobre o epitélio de revestimento das PVTs é suficiente para estimular os fibroblastos da LP, ativando os genes responsáveis pela resposta inflamatória e cicatricial do tipo fibrótica, levando, assim, ao acúmulo de colágeno na camada subepitelial da PVT.

Outra possibilidade a ser considerada é o tipo de resposta dos fibroblastos das PVs e das PVTs ao estímulo mecânico vibratório. Sabe-se que os fibroblastos respondem, de forma direta, aos estresses mecânicos, aumentando os níveis de expressão das glicoproteínas extracelulares (Wang, 2006); e é provável que fibroblastos de diferentes partes do corpo respondam diferentemente ao mesmo estímulo (Chang et al., 2002). Durante a fonação, a PV está sujeita a vibrações regulares, normalmente em frequências maiores de 120 Hz, o que não ocorre com nenhum outro tecido do corpo humano. Gaston et al. (2012), num estudo *in vitro* de cultura de fibroblastos de PVs humanas, submetidos a condições de vibração comparáveis às das PVs fisiológicas, observaram marcadores de proliferação celular aumentados em relação aos fibroblastos mantidos em repouso. O mesmo resultado (aumento dos marcadores de proliferação celular) foi obtido quando a cultura de fibroblastos de PV foi comparada à cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea submetida ao mesmo estímulo vibratório. No entanto, o estímulo vibratório na cultura de fibroblastos de PV humana não aumentou a expressão gênica do colágeno tipo I desses fibroblastos. Este fato pode mostrar que a vibração fonatória fisiológica não leva ao acúmulo de colágeno tipo I e à formação de uma PV mais rígida. Além disso, culturas de fibroblastos de traqueia, submetidos a estímulos vibratórios semelhantes aos da fonação apresentaram expressão e produção de colágeno tipo I aumentadas (Titze et al., 2004; Wolchok et al., 2009). Assim, é possível supor que, diferentemente de fibroblastos das PVs, os fibroblastos da supraglote submetidos a estímulo vibratório fonatório respondem de forma a gerar uma cicatriz fibrótica com aumento do colágeno tipo I, como ocorreu na análise deste estudo na camada superficial da LP.

As fibras elásticas são um importante componente da matriz extracelular da LP da PV, exercendo papel fundamental na produção sonora (Moore; Thibeault, 2012), a tal ponto que pacientes portadores de síndromes relacionadas a mutações do gene da elastina apresentam instabilidade do *pitch* vocal e rouquidão perceptível quando comparados a indivíduos controles (Watts et al., 2008). A maior quantidade de fibras elásticas na LP das PVs está concentrada na camada intermediária LP (Hammond et al., 1997; Gray et al., 2000), e esta

estratificação só ocorre após os 11 ou 12 anos de idade (Hartnick et al., 2005). Sato et al. (2011) referiram que a quantidade de fibras elásticas na LP da PV é menor em uma laringe que não recebeu o estímulo fonatório por mais de 10 anos. Em laringes de crianças de 7 e 12 anos, que nunca falaram, a quantidade de fibras elásticas na LP das PVs é marcadamente menor em comparação às laringes normais (Sato et al., 2012b). Esses estudos mostram que a quantidade e localização das fibras elásticas na LP de PV também são influenciadas pelo estímulo vibratório. Contrariamente, Titze et al. (2004) não detectaram diferenças de níveis mRNA de elastina em fibroblastos de laringes expostos a estímulo vibratório de 100 Hz em comparação aos controles. Já Kutty e Webb (2010), em cultura de fibroblastos da derme, expostos a estímulo vibratório de 100 Hz, não observaram diferenças na expressão de mRNA de elastina em relação aos controles estáticos. Neste estudo, embora com médias muito diferentes, a porcentagem de fibras elásticas na camada superficial da LP das PVT não se mostrou significativamente diferente dos controles. Essa falta de significância pode ser explicada pela amostra relativamente pequena, ou pelo fato de as fibras elásticas serem muito estáveis durante a vida adulta do indivíduo, pois a elastogênese começa no período embrionário, tem seu pico no período neonatal e é muito pouco ativa na fase adulta (Swee et al., 1995); e talvez apenas o estímulo mecânico vibratório sobre as PVTs de adultos possa não ser suficiente para alterar a quantidade de fibras elásticas na sua LP.

O fato de as PV possuírem mácula flava e suas respectivas *stellate cells*, o que ainda não foi evidenciado nas PVTs, pode explicar a diferença na resposta ao estímulo vibratório entre os dois tipos de pregas da laringe. Fuja et al. (2005), em estudo com culturas de *stellate cells* de PV e de fibroblastos de traqueia, observaram diferenças na resposta a diferentes estímulos inflamatórios e bioquímicos entre os dois tipos celulares. As *stellate cells* são consideradas essenciais no crescimento, desenvolvimento e processo de envelhecimento das PVs, e atuam também na composição e viscoelasticidade da LP das PVs (Sato et al., 2010a,b; Kurita et al., 2015). Alguns autores referem que essas células exercem papel regulatório sobre a matriz extracelular, controlando a síntese fibroelástica (Fayoux et al., 2004), enquanto outros sugerem participação ativa,

sintetizando os componentes da matriz extracelular da PV (Sato et al., 2012c). Uma explicação para o fato de as máculas flava das PVs se posicionarem nas duas extremidades das mesmas (junto à comissura anterior e ao processo vocal), locais de maior concentração do estresse mecânico vibratório durante a fonação, é que o estresse físico é importante no estímulo da produção da matriz extracelular pela *stellate cells* (Sato et al., 2009). Talvez, a falta dessas estruturas, vitais na produção e diferenciação da LP da PV, possa explicar a resposta diferente ao trauma fonatório nas PVT.

A análise da LP de PVs não é uma tarefa simples e padronizada. Infusino et al. (2013), avaliando a habilidade de patologistas experientes em estratificarem as camadas da LP de PV de adultos humanos, fetos humanos e porcos, encontraram acurácia de 50 a 75%, evidenciando as dificuldades em estudos histopatológicos para se determinarem as camadas da LP de PVs. No presente estudo, analisou-se apenas a camada superficial da LP das PVTs, que é muito menos conhecida que a LP das PVs, em uma amostra relativamente pequena, embora se acredite que o tamanho da amostra não deva influenciar nos resultados, pois mesmo depois de 17 anos, nenhuma diferença foi notada. Porém, o resultado inicial obtido foi bastante interessante.

6. Conclusão

Os dados obtidos com este estudo permitem concluir que:

- Sujeitos que utilizam a PVT como fonte vibratória para a produção de som apresentam, na LPS, aumento na porcentagem de colágeno total e do tipo I, sem alterar a porcentagem de colágeno tipo III e de fibras elásticas.
- O tempo de utilização das PVT como fonte produtora de som (até seis e por mais de seis anos) manteve a porcentagem de colágeno total e do tipo I.
- O posicionamento das PVT ao nível ventricular ou glótico (após reposicionamento cirúrgico) na vibração para produção sonora manteve a porcentagem de colágeno total e do tipo I.

7. Referências Bibliográficas

Alipour F, Scherer RC. Ventricular pressures in phonating excised larynges. *J Acoust Soc Am*. 2012;132(2):1017-26.

Bailly L, Bernardoni NH, Müller F, Rohlf AK, Hess M. Ventricular-fold dynamics in human phonation. *J Speech Lang Hear Res*. 2014;57(4):1219-42.

Borch DZ, Sundberg J, Lindestad PA, Thalén M. Vocal fold vibration and voice source aperiodicity in 'dist' tones: a study of a timbral ornament in rock singing. *Logoped Phoniatr Vocol*. 2004;29(4):147-53.

Branco A, Rodrigues SA, Fabro AT, Fonseca-Alves CE, Martins RH. Hyaluronic acid behavior in the lamina propria of the larynx with advancing age. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(4):652-6.

Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2001;111(5):907-11.

Catten M, Gray SD, Hammond TH, Zhou R, Hammond E. Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;118(5):663-7.

Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;124(6):607-14.

Chan RW, Fu M, Tirunagari N. Elasticity of the Human Flase Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(5):370-81.

Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(20):12877-82.

Chang Z, Kishimoto Y, Hasan A, Welham NV. TGF- β 3 modulates the inflammatory environment and reduces scar formation following vocal fold mucosal injury in rats. *Dis Model Mech*. 2014;7(1):83-91.

Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13(5 Pt 1):701-25.

Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther.* 1999;79(3):308-19.

Dhillon N. Larynx anatomy. In: Lalwani AK. *Current Diagnosis & Treatment in Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 2008, p. 18-20.

Fayoux P, Devisme L, Merrot O, Chevalier D, Gosselin B. Histologic structure and development of the laryngeal macula flava. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004;113(6):498-504.

Ferguson MW, Duncan J, Bond J, Bush J, Durani P, So K et al. Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet.* 2009;373(9671):1264-74.

Fuja TJ, Probst-Fuja MN, Titze IR. Transdifferentiation of vocal-fold stellate cells and all-trans retinol-induced deactivation. *Cell Tissue Res.* 2005;322(3):417-24.

Gaston J, Quinchia Rios B, Bartlett R, Berchtold C, Thibeault SL. The response of vocal fold fibroblasts and mesenchymal stromal cells to vibration. *PLoS One.* 2012;7(2):e30965.

Gracco C, Kahane JC. Age-related changes in the vestibular folds of the human larynx: A histomorphometric study. *J Voice.* 1989;3(3):204-12.

Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR (Ed). *Vocal fold physiology: frontiers of basic science*. San Diego: Singular Publishing Group, 1993, p. 1-34.

Gray SD. Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000;33(4):679-98.

Gray SD, Chan KJ, Turner B. Dissection plane of the human vocal fold lamina propria and elastin fibre concentration. *Acta Otolaryngol.* 2000;120(1):87-91.

Guida HL, Zorzetto NL, Martinez M. Estudo morfológico e histoquímico da prega vestibular em laringes humanas. *Unimar Ciências.* 1998;7:14-9.

Guida HL, Zorzetto NL. Morphological and histochemical analysis of the human vestibular fold. *Int. J. Morphol.* 2007;25(3):537-43.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115(3):225-32.

Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice.* 1997;11(1):59-66.

Hammond TH, Gray SD, Butler J, Zhou R, Hammond E. Age and gender-related elastin distribution changes in human vocal folds. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;119(4):314-22.

Hartnick CJ, Rehbar R, Prasad V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope.* 2005;115(1):4-15.

Hirano M, Kurita S, Nakashima T. Growth, development and aging of human voice folds. In: Bless DM, Abbs JH (Eds). *Vocal physiology*. San Diego: College Hill, 1983, p. 22-43.

Infusino SA, Ojha S, Maurer R, Sadow PM, Faquin WC, Hartnick CJ. The utility of histopathology in identifying structural differences among layers of the lamina propria. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77(10):1651-4.

Jackson C, Jackson CL. Dysphonia plicae ventricularis: phonation with the ventricular bands. *Arch Otolaryngol.* 1935;21:157-67.

Jiang JJ, Titze IR. Measurement of vocal fold intraglottal pressure and impact stress. *J Voice.* 1994;8(2):132-44.

Julias M, Riede T, Cook D. Visualizing collagen network within human and rhesus monkey vocal folds using polarized light microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2013;122(2):135-44.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.

Kendall KA, Leonard RJ. Treatment of ventricular dysphonia with botulinum toxin. *Laryngoscope.* 1997;107(7):948-53.

Khosla S, Murugappan S, Gutmark E. What can vortices tell us about vocal fold vibration and voice production. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;16(3):183-7.

Kojima T, Van Deusen M, Jerome WG, Garrett CG, Sivasankar MP, Novaleski CK et al. Quantification of acute vocal fold epithelial surface damage with increasing time and magnitude doses of vibration exposure. *PLoS One.* 2014a;9(3):e91615.

Kojima T, Valenzuela CV, Novaleski CK, Van Deusen M, Mitchell JR, Garrett CG et al. Effects of phonation time and magnitude dose on vocal fold epithelial genes, barrier integrity, and function. *Laryngoscope.* 2014b;124(12):2770-8.

Kosoković F, Lenarcic-Cepelja I. Surgical therapy of dysphonia plica ventricularis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1973;82(3):386-8.

Kosoković F, Večerina S, Čepelja I, Konić V. Contribution to therapy of dysphonia plica ventricularis. *Laryngoscope.* 1977;87(3):408-14.

Kurita T, Sato K, Chitose S, Fukahori M, Sueyoshi S, Umeno H. Origin of vocal fold stellate cells in the human macula flava. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015;124(9):698-705.

Kutta H, Steven P, Kohla G, Tillmann B, Paulsen F. The human false vocal folds - an analysis of antimicrobial defense mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 2002;205(4):315-23.

Kutty JK, Webb K. Vibration stimulates vocal mucosa-like matrix expression by hydrogel-encapsulated fibroblasts. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(1):62-72.

Lucas, AS. Análise e quantificação das fibras colágenas e elásticas no conjuntivo das pregas ventriculares. 2008. 64f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Lucas AS, de Souza Júnior DA , Mamede RCM, Jamur MC. Comparative histological analysis of collagen and elastic fibers present in the ventricular folds and the vocal folds of cadaveric larynges. *Ann Otolaryngol Rhinol*. 2015;2(6):1045.

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(12):2187-91.

Martins Mamede RC, Ricz HM, Aguiar-Ricz LN, de Mello-Filho FV. Vestibular fold flap for post-cordectomy laryngeal reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(3):478-83.

Maryn Y, De Bodt MS, Van Cauwenberge P. Ventricular dysphonia: clinical aspects and therapeutic options. *Laryngoscope*. 2003;113(5):859-66.

Moon J, Alipour F. Muscular anatomy of the human ventricular folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013;122(9):561-7.

Moore J, Thibeault S. Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease. *J Voice*. 2012;26(3):269-75.

Mor N, Blitzer A. Functional anatomy and oncologic barriers of the larynx. *Otolaryngol Clin N Am*. 2015;48(4):533-45.

Muñoz-Pinto D, Whittaker P, Hahn MS. Lamina propria cellularity and collagen composition: an integrated assessment of structure in humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118(4):299-306.

Nassar VH, Bridger GP. Topography of the laryngeal mucous glands. *Arch Otolaryngol*. 1971;94(6):490-8.

Negus VE. *The Comparative Anatomy and Physiology of The Larynx*. London. 1949: Heinemann.

Noordzij JP, Ossoff RH. Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006;39(1):1-10.

Occleston NL, O'Kane S, Lavery HG, Cooper M, Fairlamb D, Mason T et al. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen*. 2011;19(Suppl 1):s38-48.

Pawlak AS, Hammond E, Hammond T, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105(1):6-11.

Perelló J. Morfología fonoaudiológica. 2ª Ed. Barcelona: Editorial Científico - Médica, 1978.

Reidenbach MM. The muscular tissue of the vestibular folds of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1998;255(7):365-7.

Rosa MO, Pereira JC, Grellet M, Alwan A. A contribution to simulating a three-dimensional larynx model using the finite element method. *J Acoust Soc Am*. 2003;114(5):2893-905.

Rubin AD, Praneetvatakul V, Gherson S, Moyer CA, Sataloff RT. Laryngeal hyperfunction during whispering: reality or myth? *J Voice*. 2006;20(1):121-7.

Sasaki CT, Buckwalter J. Laryngeal function. *Am J Otolaryngol*. 1984;5(4):281-91.

Sasaki CT, Kim YH. Anatomy and physiology of the larynx. In: Snow Jr JB, Ballenger JJ. (Eds). *Otorhinolaryngology head and neck surgery*. 16th Edition. Hamilton: BC Decker, 2003, p. 1090-109.

Sataloff RT. Professional voice. The science and art of clinical care. San Diego: Singular Publishing Group, 1997, 815p.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Vitamin A-storing stellate cells in the human vocal fold. *Acta Otolaryngol*. 2003;123(1):106-10.

Sato K, Umeno H, Nakashima T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expression and distribution of hyaluronic acid and CD44 in unphonated human vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118(11):773-80.

Sato K, Umeno H, Nakashima T. Functional histology of the macula flavain the human vocal fold--Part 1: its role in the adult vocal fold. *Folia Phoniatr Logop*. 2010a;62(4):178-84.

Sato K, Umeno H, Nakashima T. Functional histology of the macula flavain the human vocal fold--Part 2: Its role in the growth and development of the vocal fold. *Folia Phoniatr Logop*. 2010b;62(6):263-70.

Sato K, Umeno H, Ono T, Nakashima T. Histopathologic study of human vocal fold mucosa unphonated over a decade. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(12):1319-25.

Sato K, Umeno H, Nakashima T. Vocal fold stem cells and their niche in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012a;121(12):798-803.

Sato K, Umeno H, Nakashima T, Nonaka S, Harabuchi Y. Histopathologic investigations of the un phonated human child vocal fold mucosa. *J Voice*. 2012b;26(1):37-43.

Sato K, Umeno H, Nakashima T. Vocal fold stellate cells in the human macula flava and the diffuse stellate cell system. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012c;121(1):51-6.

Sato K, Chitose S, Umeno H. Dimensions and morphological characteristics of human newborn glottis. *Laryngoscope*. 2015;125(5):E186-9.

Scherer RC, Titze IR, Curtis JF. Pressure-flow relationships in two models of the larynx having rectangular glottal shapes. *J Acoust Soc Am*. 1983;73:668-76.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995;108(Pt 3):985-1002.

Simonyan K, Horwitz B. Laryngeal motor cortex and control of speech in humans. *Neuroscientist*. 2011;17(2):197-208.

Stager SV, Bielamowicz SA, Regnell JR, Gupta A, Barkmeier JM. Supraglottic activity: evidence of vocal hyperfunction or laryngeal articulation? *J Speech Lang Hear Res.* 2000;43(1):229-38.

Stager S. The role of the supraglottic area in voice production. *Otolaryngol.* 2011;S1:001.

Swee MH, Parks WC, Pierce RA. Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J Biol Chem.* 1995;270(25):14899-906.

Titze IR, Hitchcock RW, Broadhead K, Webb K, Li W, Gray SD et al. Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses. *J Biomech.* 2004;37(10):1521-9.

van den Berg JW, Zantema JT, Doornenbal Jr P. On the air resistance and the bernoulli effect of the human larynx. *J Acoust Soc Am.* 1957;29:626-31.

Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech.* 2006;39(9):1563-82.

Watts CR, Awan SN, Marler JA. An investigation of voice quality in individuals with inherited elastin gene abnormalities. *Clin Linguist Phon.* 2008;22(3):199-213.

Wolchok JC, Brokopp C, Underwood CJ, Tresco PA. The effect of bioreactor induced vibrational stimulation on extracellular matrix production from human derived fibroblasts. *Biomaterials.* 2009;30(3):327-35.

8. Anexos

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.usp.br
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

COPIA

Ribeirão Preto, 03 de agosto de 2010

Ofício nº 2524/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“A INFLUÊNCIA DA EMISSÃO SONORA NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA PREGA VESTIBULAR”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4637/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
ANDRÉ ARMANI
PROF. DR. RUI CELSO MARTINS MAMEDE (Orientador)
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Campus Universitário – Monte Alegre
Fone/Fax: (16) 3602 1000

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO:

**“A INFLUÊNCIA DA EMISSÃO SONORA NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO
CONJUNTIVO DA PREGA VESTIBULAR”**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **André Armani**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede**

CONTATO: Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Endereço: Campus Universitário Monte Alegre – 14048-900

Telefones: (16) 3602-2353 (43)9618-0128

O senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado **“A influência da emissão sonora na constituição do tecido conjuntivo da prega vestibular”**. Neste termo o senhor será orientado especialmente no que diz respeito aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos que o senhor será submetido, os seus direitos e as condições a seguir relacionadas:

1. As pregas vestibulares, também chamadas falsas cordas vocais, não tem sua constituição totalmente determinadas, principalmente quando elas participam da emissão de sons. Esta pesquisa tem o objetivo de fazer esta determinação.
2. Por alguma indicação do Serviço de Cirurgia de Cabeça de Pescoço o senhor deverá ser submetido a uma laringoscopia direta sob anestesia geral, para o seu acompanhamento ou tratamento médico. Durante este procedimento nós retiraremos apenas 0,5 cm² de uma das pregas vestibulares para o nosso estudo.
3. Não haverá riscos nem desconforto para o senhor, pois esta amostra será coletada enquanto o senhor estiver anestesiado para a realização do exame. Este é um procedimento rápido e não trará qualquer consequência negativa para o senhor, tão pouco trará qualquer benefício.
4. Com esta pesquisa esperamos conhecer melhor as pregas vestibulares, e suas alterações, o que pode, no futuro ajudar no diagnóstico e tratamento das patologias da voz e da laringe.
5. Não haverá despesas para o senhor.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**Campus Universitário – Monte Alegre
Fone/Fax: (16) 3602 1000**

6. O senhor será acompanhado das maneiras normais no serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP, independentemente da sua participação ou não na pesquisa.

7. A pesquisa não oferece danos ao senhor e comprometemos que será mantido total sigilo sobre sua identidade e que em qualquer momento o senhor poderá solicitar esclarecimentos quanto ao projeto de pesquisa ou desistir da participação na presente pesquisa.

Ribeirão Preto,/...../.....

André Armani
Pesquisador responsável

Paciente ou responsável Nome: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Anexo de Publicação

The influence of the sound emission on the *lamina propria* of the ventricular fold

Short Title: Ventricular fold in sound production

Andre Armani MD - Department of Ophthalmology, Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil

Maria Celia Jamur PhD - Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil

Rui Celso Martins Mamede MD, PhD - Department of Ophthalmology, Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil

From the Division of Head and Neck Surgery, University Hospital, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

There is no financial support

There is no conflict of interest

Correspondent author:

Andre Armani, MD, Department of Ophthalmology, Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14048-900, Ribeirão Preto, SP Brazil; e-mail: andrearmani@yahoo.com

Abstract

Objectives: Characterization of extracellular matrix of the ventricular fold *lamina propria* of individuals that use the ventricular fold as the main vibration source for sound production. **Study design: Basic Research. Methods:** Collagen and the elastic fibers quantification of *lamina propria* of ventricular fold of patients that use it as the main source of vibration for voice production were compared with ventricular fold of control subjects. Six individuals using at least one of the ventricular folds as source of vibration for at least six years were selected. A fragment of ventricular fold used as vibration source was collected. After histological process. The type I and type III collagen, total collagen and elastic fibers were quantified and compared with the ventricular fold of the control group. Statistics were performed using an unpaired T test. **Results:** The amount of total collagen and type I collagen of the most superficial layer of *lamina propria* of ventricular fold used as source for sound production was significantly higher when compared to controls. There was no difference on the quantity of type III collagen and elastic fibers. **Conclusions:** The vibratory use of ventricular fold for sound production leads to an increase in the amount of total collagens fibers and type I collagen, with no interference in the amount of type III collagen and elastic fibers on the most superficial layer of *lamina propria*.

Key Words: Ventricular fold; *lamina propria*; collagen; elastic fibers

Level of Evidence: NA

Introduction

In order to produce harmonious sounds, the vocal fold (VF) has a peculiar and complex structure. The arrangement of the connective tissue of the VF allows the vibration of the mucous membrane tissue with minimal restriction. For that, the VF is formed by five layers: (1) the squamous epithelium, (2) superficial layer of the *lamina propria* (LP)(Reinke's space), (3) intermediate layer of the LP, (4) the deep layer of LP, which form the vocal ligament together with the latter and (5) the muscle layer called *vocalis* muscle or thyroarytenoid¹. In the superficial layer of the LP there are few quantity of protein fibers. In the intermediate and deep layers there are a great amount of elastic and collagen fibers, respectively². The superficial layer of the *lamina propria* of VF has few collagen fibers and most of these are thinner, while the deep layer has predominance of thicker collagen fibers³. The amount of collagen fibers is less in the surface layer, further decreases in the medium and becomes higher in the deep muscle layer adjacent to thyroarytenoid^{4,5}. The stratification in three layers of the LP in the VF is not present at birth. At two months of age it is possible to find a bilaminar differentiation of the LP, however, it is only at puberty that the maturation in three layers is completed⁶, due to progressive phonation that the VF is submitted over the years. The morphology and function of the ventricular fold (VTF) has attracted little interest due to its little action in phonation⁷. The VTF are formed by adipose and fibroelastic tissue, muscle fibers and a vestibular ligament, covered by an epithelium⁸. The VTF has a medial edge that protrudes into the supraglottic and plays an important role, as sphincter. There is also an immune function of VTF, which secrete a mucus with antimicrobial peptides⁹. The muscle fibers of the VTF are arranged in the form of three muscle fascicles with adductor function of VTF¹⁰, and that these fibers are arranged laterally in the VTF with free edge of PVT with higher concentration of connective and glandular tissue¹¹. This connective tissue consists of collagen and elastic fibers arranged irregularly on a sub-epithelial layer^{8,12}. Historically the VTF were not involved in normal physiology of voice production, but more recently some studies have shown the involvement of VTF in the normal vocalization. The contraction of supraglottic structures, such as VTF, can increase the efficiency of the VF vibration¹³. In some situations VTF may even be the vibratory source producing specific sounds, such as the glottal stop¹⁴, whispering¹⁵, or even some types of singing¹⁶. There are pathological situations that the VTF act as main sound source. Under these conditions a

low-pitched voice and with poorer quality happens. These conditions are called ventricular dysphonia or "*Plica ventricularis*"¹⁷. Over time, this abnormally increased phonatory function of the PVT leads to a mucosal hypertrophy and fibrosis of the PVT^{18,19}. We can assume that the connective tissue of the VTF would tend to stratify if it also passed by vibratory stimulation similar to that of a VF.

Thus, the present study aims to analyse the structural changes occurring in the constituents of the VTF tissues, particularly in sub-epithelial tissue of the LP when it becomes the source of sound production. This study may lead to a better understanding of the complex physiology of sound production by the larynx and the refinement of techniques for the treatment of laryngeal diseases.

Methods

Tissue Samples

Six patients from the Clinic Hospital of Faculty of Medicine of Ribeirao Preto University of Sao Paulo, that used mucosa vibration of at least of one of the ventricular fold as a source for sound production, were enrolled for this study. The study was conducted under approval by the Clinical Research Ethics Committee of University of Sao Paulo and all of the patients was informed about this research and signed a consent agreement. Patient's characteristics such as age, sex, tabaco use, motive and time for VTF use, phonotherapy, the motive to the indication of the direct laryngoscopy used for sample collection. Approximately 0.5 cm² of the VTF that used as source of voice production was collected.

Histological assessment

Paraffin-embedded VTF sample were submitted for histological analysis. Briefly, 40 sections of 6-µm thick of each sample was mounted on glass slides. For the identification of collagen fibers the sections were stained using Picrosirius Red²⁰. For elastic fibers analysis the sections were incubated with Weigert's Resorcin-Fuchsin stain. For the control group of normal VTF it was used the parafinized blocks from necropsis of 3 patients analysed by our group previously¹². The sections were analysed in microscope Olympus BX50 and the images acquired by a digital SPOT-RT3 camera. For the quantitative analysis, the image of 54 sections from each sample stained with Picrosirius Red or Weigert

solution and 9 sections from each control, with particular interest in the *lamina propria* (subepitelial layer) were acquired. For the quantification of collagen and elastic fibers the software Image-Pro Plus 3D suite:7.0 was used.

Statistical analysis

The values obtained are reported as mean $\pm$ standard deviation (SD). The Student T test was applied for unpaired comparisons, shown as percentage of fibers, collagen and elastic, in relation to total area. Statistical analysis was performed using JMP[®] software.

Results

Patients Characteristic

Table 1 shows the patients profile. Four out of six patients had partial vertical laryngectomy (PVL), with lowering the VTF at the same level as the contralateral VF for phonatory reconstruction²¹, as the mechanism that caused the vibration of VTF to sound production. Two of the patients had the diagnose of spontaneous ventricular dysphonia. For the controls the mean age was 51 years and the cause of death was not related to larynx disease (data not shown).

Collagen and elastic fibers quantification

Figure 1 shows the quantification of collagen fibers. The amount of total collagen showed significantly increased ($23.4\% \pm 2.7\%$; $p < 0.001$) in the VTF that was used for sound production, when compared to controls ($7.4\% \pm 1.5\%$). The amount of type I collagen was also increased ($18.8\% \pm 6.1\%$; $p < 0.001$) when compared to controls ($1.4\% \pm 0.6\%$) (Figure 2). There was no statistical difference in type III collagen (Figure 3) between both groups (patients $4.5\% \pm 4.7\%$; controls $6.0\% \pm 0.9\%$; $p = 0.61$). For the elastic fibers there was no difference between patients ($10.1\% \pm 11.8\%$; $p = 0.2$) and controls ($1.8\% \pm 0.7\%$) (Figure 4).

Table 2 shows the comparison between patients that used the VTF for six years and patients that used the VTF over six years (mean of 13.6 years). There was no difference in the amount of total collagen, type I and type III collagen and elastic fibers.

Other two analysis was made in relation to the mechanism of induction of VTF for sound production. In one group the surgery was the mechanism and the other group was not submitted to surgery and the mechanism, in other words, there was patients with spontaneous ventricular dysphonia. Again, the total collagen, type I and type III collagen and elastic fibers did not show any difference (Table 3).

Discussion

When a person stops using the vocal folds for speech and starts to use the ventricular folds in order to emit sound, it generates a condition in which a structure that is not adapted to receive such vibration, start receiving this stimulus. With the shift in it's function, it is reasonable to expect also a shift in the pattern of the tissue, in order to adapt to the new function. Thus, we can hypothesize that the sound emission may influence the development of a new pattern of constituents of the *lamina propria* of the VTF. In the present study, we analyse the most superficial layer of LP of VTF in individuals that use it as vibrate source for sound production. This analysis and its comparison produced interesting results and, so far, unique.

Our results showed that individuals who use the VTF as a vibrating structure to sound production have the most superficial layer of LP of VTF greater amounts of collagen, specially type I collagen, when compared to control subjects. There were no differences in the quantification of type III collagen and elastic fibers. If we assume vibration for sound production as a differentiation stimuli to the structure in the direction to a normal mature VF, it is expected a decrease in the amount of total collagen in the superficial layer of the LP of the VTF. A normal VTF has in its LP a total quantity of collagen fibers very similar to a VF¹², but the VTF hasn't its LP structured in layers as the VF. The LP of VF has in its outermost layer a shortage of collagen fibers^{22,1}, with the majority of the fibers of the extracellular matrix concentrated in the deeper layer of LP²³. Our results showed that the VTF used as sound source accumulated collagen fibers, especially type I collagen in its most superficial layer of LP, contrary to expectations for an adaptation to phonation.

In fact, the vibratory stimulus appears to be important in the composition of the extracellular matrix of the LP of VF. An adult vocal fold without stimulation for more than a decade showed to be atrophic, did not have the vocal ligament, or the Reinke space and

its LP showed up a uniform structure²⁴. These changes show the importance of physical tension caused by phonation stress on the vocal folds as an important factor in the metabolism of the extracellular matrix. Moreover, it was shown that VF from children who have never been submitted to phonation were hypoplastic and rudimentary, and in their LP they found few collagen and elastic fibers not structured in layers, also demonstrating that the phonation stimulus is important in the differentiation of VF²⁵. Our study showed that the vibrating stimulus was effective in LP of VTF, leading to an increase in total collagen and type I collagen, but this effect is in the opposite direction to what occurs in the VF. Type I collagen is associated with more resistant tissue stretching forces as bones, tendons, ligaments, joints capsules²⁶, being a stronger and larger diameter fibre. An increased amount of this fiber, as seen in our work, can worsen the vibrational properties of VTF in sound production. Type I collagen is also the main component of scar tissue in late stage²⁷, suggesting that the mechanism of type I collagen increase in the most superficial layer of LP of VTF can be a mechanism of cicatricial tissue repair by repeated trauma caused by the vibration of VTF for prolonged periods.

It is known that the squamous epithelium that covers the VF has microprojections among its cells that may be related to an adaptation to withstand the repeated trauma caused by phonation²⁸. In a recent study the vibratory trauma of speech on the VF has not led to change in the regulation of genes responsible for inflammatory response (IL-1 β COX-2 and TGF- β 1)²⁹. These cytokines are well documented in the inflammatory process in healing and in the formation of fibrotic scar. TGF- β 1 and TGF- β 3 has different roles in tissue cicatrization^{30,31} and are involved in different types of scarring shown by different tissues. While TGF- β 1 is involved in the formation of a scar with collagen and more hardened, TGF- β 3 associated with tissue repair without scar formation^{31,32}. Chang et al., 2014³³ showed that the expression of TGF β -1 occurs mainly in the fibroblasts of LP of VF and not in squamous cells in the epithelium, leading to a favourable environment towards the formation of a nonfibrotic scar post a phono-trauma, which does not cause epithelial cells lesion, suggesting that only after the epithelium lesion the formation of a fibrotic scar may occur. Therefore, the epithelial barrier of VF is intact after phono-trauma of moderate intensity, which does not activate the expression of genes related to cytokines that can lead to a fibrotic scar²⁹. Again the difference in the type of epithelium that covers the LP of VF and the VTF epithelium may influence the type of response to vibratory stress. In our study

we found a great proliferation of type I collagen, the most superficial portion of the LP of VTF, which is covered for the most part by a different epithelial epithelium of VF. In fact, the damage of the epithelium of VTF, which is not adapted to the vibratory trauma, may affect important mechanisms that are crucial for tissue homeostasis.

In different parts of the body, fibroblasts respond directly to mechanical stresses increasing expression levels of extracellular glycoproteins³⁴, and is likely to fibroblasts of different body parts respond differently to the same stimuli³⁵. During speech, the VF is typically subject to regular vibrations at frequencies greater than 120 Hz, which does not occur with any other tissue in the body. Some studies have shown that cells of the matrix LP in VF respond to vibratory stimuli differently from other mesenchymal cells. A study of *in vitro* culture of human fibroblasts VF subjected to conditions of vibration, similar to physiologic, showed an increase in cell proliferation markers compared to fibroblasts kept at rest³⁶. They also showed increased when compared to culture mesenchymal stem cells from bone marrow subjected to the same vibratory stimulus. However, there was no interference in gene expression of type I collagen regulation of VF fibroblast culture cells³⁶. This may show that the phonatory vibration does not lead to extracellular matrix accumulation and the formation of a more rigid VF. On the other hand, tracheal fibroblasts cell culture submitted to vibratory stimuli similar to the speech had the expression and type I collagen production increased^{37,38}.

The elastic fibers are an important component of the extracellular matrix LP in VF having a fundamental role in the production of sound³⁹. Abnormalities in the gene for elastin can affect the biomechanics of VF⁴⁰. The largest amount of elastic fibers of the LP in VF is concentrated in the middle layer^{28,41}, and this stratification is present only after 11 or 12 years old⁶. The amount of elastic fibers in LP in VF decreased in a larynx that has not received the stimulation phonation for more than 10 years²⁴. In laryngeal children between 7 and 12 years old who have never spoken, the amount of elastic fibers in the LP of VF is markedly lower compared to normal larynx²⁵. These studies show that the amount and location of elastic fibers in LP of VF are also influenced by the vibratory stimulus. In contrast to these studies Titze et al. (2004)³⁷ did not detect differences in mRNA levels of elastin in laryngeal fibroblasts exposed to vibrating stimulus of 100Hz compared to controls. Kutty and Webb (2010)⁴² in culture dermal fibroblasts exposed to vibratory stimulation of 100 Hz did not show differences in mRNA expression compared to static

controls. In our study, the amount of elastic fibers in the superficial layer of LP of VTF was not significantly different from controls. This lack of significance may be explained by the relatively small sample size, or because of the elastic fibers are very stable during the life. The elastogenesis begins in the embryonic period, it has its maximum in the neonatal period and in adulthood is very little active⁴³, and the vibratory stimulus over the VTF may not be sufficient to lead a change in the elastic fibers in the LP.

Our work can contribute to better understanding of the physiology of sound production, in tissue repair mechanisms of the larynx, the role of each LP component of VF and VTF in laryngeal physiology and understanding of the complex physiology of differentiation of this very unique structure of the LP in the vocal folds.

Conclusions

The phonatory use of the ventricular fold for at least six years lead to an increase of total collagen and type I collagen in most superficial layer of ventricular fold's *lamina propria*. There were no changes in the quantities of type III collagen and elastic fibers.

References

1. Noordzij JP, Ossoff RH. Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin N Am* 2006;39(1):1-10.
2. Hirano M, Kurita S, Nakashima T. Growth, development and aging of human voice folds. In: Bless DM, Abbs JH, eds. *Vocal physiology*. San Diego, CA: College Hill; 1983:22-43.
3. Muñoz-Pinto D, Whittaker P, Hahn MS. Lamina propria cellularity and collagen composition: an integrated assessment of structure in humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118(4):299-306.
4. Julias M, Riede T, Cook D. Visualizing collagen network within human and rhesus monkey vocal folds using polarized light microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122(2):135-44.
5. 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(12):2187-91.

6. Hartnick CJ, Rehbar R, Prasad V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope* 2005;115(1):4-15.
7. Guida HL, Zorzetto NL, Martinez M. Estudo morfológico e histoquímico da prega vestibular em laringes humanas. *Unimar Ciências* 1998;7:14-19.
8. Guida HL, Zorzetto NL. Morphological and histochemical analysis of the human vestibular fold. *Int. J. Morphol* 2007;25(3):537-43.
9. Kutta H, Steven P, Kohla G, Tillmann B, Paulsen F. The human false vocal folds - an analysis of antimicrobial defense mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 2002;205(4):315-23.
10. Reidenbach MM. The muscular tissue of the vestibular folds of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255(7):365-7.
11. Moon J, Alipour F. Muscular anatomy of the human ventricular folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122(9):561-7.
12. Lucas AS, de Souza Junior DA, Mamede RCM, Jamur MC. Comparative histological analysis of collagen and elastic fibers present in the ventricular folds and the vocal folds of cadaveric larynges. *Ann Otolaryngol Rhinol* 2015;2(6):1045.
13. Stager S. The Role of the Supraglottic area in voice production. *Otolaryngol* 2011;S1:001.
14. Stager SV, Bielamowicz SA, Regnell JR, Gupta A, Barkmeier JM. Supraglottic activity: evidence of vocal hyperfunction or laryngeal articulation? *J Speech Lang Hear Res* 2000;43(1):229-38.
15. Rubin AD, Praneetvatakul V, Gherson S, Moyer CA, Sataloff RT. Laryngeal hyperfunction during whispering: reality or myth? *J Voice* 2006;20(1):121-7.
16. Borch DZ, Sundberg J, Lindestad PA, Thalén M. Vocal fold vibration and voice source aperiodicity in 'dist' tones: a study of a timbral ornament in rock singing. *Logoped Phoniatr Vocol* 2004;29(4):147-53.
17. Sataloff RT. Professional Voice. The Science and Art of Clinical Care. San Diego: Singular Publishing Group;1997. 815.
18. Kendall KA, Leonard RJ. Treatment of ventricular dysphonia with botulinum toxin. *Laryngoscope* 1997;107(7):948-53.
19. Kosoković F, Lenarcic-Cepelja I. Surgical therapy of dysphonia plica ventricularis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1973;82(3):386-8.

20. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11(4):447-55.
21. Martins Mamede RC, Ricz HM, Aguiar-Ricz LN, de Mello-Filho FV. Vestibular fold flap for post-corpectomy laryngeal reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(3):478-83.
22. Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(3):225-32.
23. Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR. *Vocal fold physiology: frontiers of basic science*. San Diego: Singular Publishing Group, 1993, 1-34.
24. Sato K, Umeno H, Ono T, Nakashima T. Histopathologic study of human vocal fold mucosa unphonated over a decade. *Acta Otolaryngol* 2011;131(12):1319-25.
25. Sato K, Umeno H, Nakashima T. Vocal fold stem cells and their niche in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2012;121(12):798-803.
26. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79(3):308-19.
27. Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 1985;13(5 Pt 1):701-25.
28. Gray SD, Chan KJ, Turner B. Dissection plane of the human vocal fold lamina propria and elastin fibre concentration. *Acta Otolaryngol* 2000;120(1):87-91.
29. Kojima T, Valenzuela CV, Novaleski CK, et al. Effects of phonation time and magnitude dose on vocal fold epithelial genes, barrier integrity, and function. *Laryngoscope* 2014;124(12):2770-8.
30. Ferguson MW, Duncan J, Bond J, et al. Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet* 2009;373(9671):1264-74.
31. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995;108(Pt 3):985-1002.

32. Occleston NL, O'Kane S, Lavery HG, et al. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen* 2011;19(Suppl 1):s38-48.
33. Chang Z, Kishimoto Y, Hasan A, Welham NV. TGF- β 3 modulates the inflammatory environment and reduces scar formation following vocal fold mucosal injury in rats. *Dis Model Mech* 2014;7(1):83-91.
34. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 2006;39(9):1563-82.
35. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(20):12877-82.
36. Gaston J, Quinchia Rios B, Bartlett R, Berchtold C, Thibeault SL. The response of vocal fold fibroblasts and mesenchymal stromal cells to vibration. *PLoS One* 2012;7(2):e30965.
37. Titze IR, Hitchcock RW, Broadhead K, et al. Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses. *J Biomech* 2004;37(10):1521-9.
38. Wolchok JC, Brokopp C, Underwood CJ, Tresco PA. The effect of bioreactor induced vibrational stimulation on extracellular matrix production from human derived fibroblasts. *Biomaterials* 2009;30(3):327-35.
39. Moore J, Thibeault S. Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease. *J Voice* 2012;26(3):269-75.
40. Watts CR, Awan SN, Marler JA. An investigation of voice quality in individuals with inherited elastin gene abnormalities. *Clin Linguist Phon* 2008;22(3):199-213.
41. Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice* 1997;11(1):59-66.
42. Kutty JK, Webb K. Vibration stimulates vocal mucosa-like matrix expression by hydrogel-encapsulated fibroblasts. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4(1):62-72.
43. Swee MH, Parks WC, Pierce RA. Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J Biol Chem* 1995;270(25):14899-906.

Figures Legend

Figure 1 - Mean $\pm$ SD of total collagen. A 300 μm^2 total area from control and patients groups was analyzed.

Figure 2 - Quantification of collagen type I. Mean and sandard deviation of the percentage of the área of 300 μm^2 . Comparisson between controls and patients. Mean $\pm$ SD of type I collagen. A 300 μm^2 total area from control and patients groups was analyzed.

Figure 3 - Mean $\pm$ SD of type III collagen. A 300 μm^2 total area from control and patients groups was analyzed.

Figure 4 - Mean $\pm$ SD of elastic fibers. A 300 μm^2 total area from control and patients groups was analyzed.

Figure 1 **Figure 2**

Figure 3

Figure 4

Table 1- Clinical characteristics of the subjects.

Initials	Age at sample collection (years)	Sex	Motive for the vibration of VTF	VTF time of use (years)	Tabaco use	Phonotherapy	Motive for the direct laryngoscopy	Localization of VTF
SSSG	44	F	Ventricular dysphonia	17	No	No	Right VF Polyp withdrawn	Right
CMM	42	M	Ventricular dysphonia	6	No	Yes	TB suspicious in the larinx	Left
MEOL	48	F	PL	6	Stoped 8 years ago	Yes	Total Laryngectomy - câncer recurrence in the right glottis	Left
MSM	67	M	PL	6	Yes	Yes	Suspicious area in piriform sinus	Right
CUT	61	M	PL	11	Yes	No	Suspicious area in tongue base	Left
OL	78	M	PL	13	Stoped 14 years ago	Yes	Suspicious area in anterior commissurer	Left

PL= Partial Laryngectomy; VTF= Ventricular Fold; TB=tuberculosis; VF= Vocal fold.

Table 2- Utilization of VTF as source of sound production. The patients were divided in two groups: one group that used VTF for six years and other group that used VTF for more than six years.

LP analisys	6 years (%)	> 6 years (%)	P
Total collagen	23.1 ± 1.8	22.6 ± 3.9	0.865
Type I collagen	18.9 ± 3.2	18.0 ± 9.0	0.879
Type III collagen	4.2 ± 1.4	4.6 ± 7.2	0.922
Elastic Fibers	3.2 ± 5.1	16.5 ± 13.3	0.183

Mean ± SD for each type of fibre; % of total area in 300 µm².

Table 3- Utilization of VTF as source of sound in two groups of patients: one submitted to surgery and other with no surgery (spontaneous ventricular dysphonia).

LP analisys	No surgery (%)	Surgery (%)	p
Total collagen	22.8 ± 1.6	23.0 ± 3.4	0.957
Type I collagen	14.4 ± 8.1	20.5 ± 4.8	0.292
Type III collagen	8.4 ± 6.5	2.5 ± 2.5	0.156
Elastic Fibers	7.5 ± 10.2	11.0 ± 13.5	0.768

Mean ± SD for each type of fibre; % of total area in 300 µm².