VANESSA MIKA KINCHOKU

**Microrretalho bipediculado de mucosa cordal em
fonomicrocirurgia: estudo experimental em laringes
humanas excisadas**

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos Hiroshi
Tsuji

Versão Corrigida
(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kinchoku, Vanessa Mika

Microrretalho bipediculado de mucosa cordal em
fonomicrocirurgia : estudo experimental em laringes
humanas excisadas / Vanessa Mika Kinchoku. -- São
Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Domingos Hiroshi Tsuji.

Descritores: 1.Cadáver 2.Disfonia
3.Epidemiologia experimental 4.Laringe 5.Prega
vocal 6.Voz

USP/FM/DBD-009/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus queridos pais, **Luiza e Mario**, a quem devo tudo que sou e tenho hoje. Obrigada por todo amor, dedicação e sacrifício que fizeram por seus filhos.

Ao meu marido **Gilberto**, por todo amor, paciência e companheirismo de todos esses anos.

As minhas irmãs **Kelly e Andreia**, pela amizade e por estarem presentes em todos momentos da minha vida.

Aos meus sobrinhos, **Arthur, Lucas, Thiago e Carolina**, que me permitem sentir o amor mais puro e verdadeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e coordenador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), **Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**, por toda paciência, dedicação, orientação e amizade. Agradeço imensamente por todas as oportunidades, pela confiança e pelos conselhos. Foi um prazer ser orientada por uma pessoa tão inteligente, humilde e humana.

Ao **Dr. Rui Imamura**, pela enorme contribuição na qualificação e no decorrer dos estudos. Serei eternamente grata por toda disponibilidade e ajuda sempre que precisei. Sua retidão de caráter, dedicação, inteligência e humildade são invejáveis.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pela sua capacidade de liderar e manter o departamento sempre em destaque.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, pelo exemplo de professor e caráter.

A **Dra. Adriana Hachiya** e **Dra. Rosiane Yamazaki**, pela amizade, apoio, conselhos e ajuda em todos os momentos.

Ao **Dr. Henry Ugadin Koishi** e **Dr. Luiz Prata Figueiredo**, pelas observações e colocações valiosas no meu exame de qualificação.

Aos **amigos de residência** do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP, que proporcionaram boas lembranças e experiências ao longo da minha formação. Em especial aos amigos da minha turma e ao **Pedro Augusto Magliarelli Filho**, pela amizade, apoio e por sempre estar disposto a ajudar quem for preciso.

Às secretárias da Clínica de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, **Maria Márcia Alves, Maria Marileide Alves, Lucivânia Lima da Silva e Kátia Teresa Kayano Cota**, por toda ajuda e suporte durante o período de residência, preceptoria e pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci**, diretor do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVO-USP), por permitir a obtenção das laringes utilizadas no estudo.

A todos os funcionários do SVO, em especial ao **Nilton Fontes Neuman**, pela ajuda e disponibilidade sempre.

A **Adriana**, técnica do Laboratório de Habilidades da Otorrinolaringologia, pela proatividade, eficiência e ajuda em todos os momentos, desde a residência.

A **Prof. Dra. Thais Mauad**, Professora Associada do Departamento de Patologia Pulmonar da FMUSP, pela disponibilidade e enorme contribuição ao meu trabalho.

A **Kely Cristina Soares Bispo**, técnica do Laboratório de Anatomia, pela preparação das lâminas e pela enorme disponibilidade e ajuda em todo trabalho.

Ao **Reginaldo**, técnico do Museu da Anatomia, por ter me auxiliado com muita presteza e gentileza em todo processo de digitalização das lâminas.

Aos cadáveres, que possibilitaram a realização do trabalho e aos seus familiares, que gentilmente permitiram sua utilização.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela contribuição financeira por meio da bolsa de estudos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivos Primários	7
2.2	Objetivo Secundário	7
3	REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1	Estudo Experimental em Laringes	9
3.2	Histologia das Pregas Vocais e Ventrículo Laríngeo	12
3.3	Fonocirurgia	14
3.4	Retalho de Mucosa Cortal	17
4	MÉTODOS	20
4.1	Aspectos Éticos	21
4.2	Casuística	21
4.3	Preparo do Material	22
4.4	Confeção do Retalho	24
4.4.1	Retalho bipediculado de mucosa cortal	24
4.4.2	Retalho bipediculado de mucosa cortal acrescido de mucosa do ventrículo	34
4.5	Análise Histológica	36
4.6	Análise Estatística	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Estudo Experimental	40
5.2	Análise Histológica	46
6	DISCUSSÃO	53
6.1	Estudo Experimental	54
6.2	Retalho Bipediculado e Tamanho do Defeito de Mucosa Cortal	56
6.3	Diferenças Histológicas entre Área Vibrátil da Prega Vocal e Assoalho de Ventrículo Laríngeo	61
6.4	Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras	63
7	CONCLUSÕES	64

8	ANEXO	66
9	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag0	-	Área glótica inicial
DP	-	Desvio Padrão
FMUSP	-	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
N	-	Tamanho da amostra
p	-	Significância estatística
SVOC	-	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Utilização do retalho bipediculado de mucosa cordal no intraoperatório	19
Figura 2 - Laringe após remoção de estruturas adjacentes.....	22
Figura 3 - Foto do suporte desenvolvido pela Ferrari.....	23
Figura 4 - Bancada pronta para procedimento na laringe.....	24
Figura 5 - Pinças utilizadas	24
Figura 6 - Confecção do retalho bipediculado	26
Figura 7 - Abertura da região posterior de laringe.....	27
Figura 8 - Deslocamento medial do retalho e marcação com estilete foice na mucosa, no ponto médio do comprimento da prega vocal	28
Figura 9 - Marcação na mucosa, do ponto de máximo deslocamento do retalho.....	29
Figura 10 - Confecção do defeito mucoso	30
Figura 11 - Aspecto da laringe após confecção do defeito	31
Figura 12 - Aplicação de cola de fibrina para fixar o retalho	32
Figura 13 - Aspecto final após deslocamento do retalho para recobrir o defeito.....	33
Figura 14 - Confecção do retalho bipediculado de mucosa cordal acrescido de mucosa do ventrículo laríngeo.....	35
Figura 15 - Retângulos em preto ilustrando a região que foi recortada para análise histológica	37
Figura 16 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método hematoxilina-eosina, com aumento de 25x.....	47
Figura 17 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método hematoxilina-eosina, com aumento de 100x mostrando a diferença do epitélio	48

Figura 18 - Transição de epitélio com presença de células basaloides	49
Figura 19 - Fibras elásticas delgadas logo abaixo do epitélio e camada de fibras elásticas mais grossas próxima ao músculo vocal.....	50
Figura 20 - Glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos	51
Figura 21 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método picrossirius-red	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das medidas resumo de idade, sexo, comprimento e largura das pregas vocais	40
Tabela 2 - Descrição das medidas resumo de idade, comprimento e largura das pregas vocais, separados por gênero.....	41
Tabela 3 - Descrição das medidas resumo do retalho e defeito nos 2 grupos.....	41
Tabela 4 - Descrição das medidas resumo do tamanho do defeito nos 2 grupos, separado por gênero e análise estatística da diferença entre eles	43
Tabela 5 - Correlação entre o tamanho do defeito e as variáveis comprimento da prega vocal, largura da prega vocal e tamanho do retalho no grupo 1.....	43
Tabela 6 - Correlação entre o tamanho do defeito e as variáveis comprimento da prega vocal, largura da prega vocal e tamanho do retalho no grupo 2.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação entre tamanho do defeito no grupo 1 e grupo 2	42
Gráfico 2 -	Comparação entre tamanho do retalho no grupo 1 e grupo 2	42
Gráfico 3 -	Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do comprimento da parte membranosa da prega vocal no grupo 1	44
Gráfico 4 -	Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do retalho no grupo 1	44
Gráfico 5 -	Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do comprimento da parte membranosa da prega vocal no grupo 2	45
Gráfico 7 -	Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do retalho no grupo 2	46

RESUMO

Kinchoku VM. *Microrretalho bipediculado de mucosa cordal em fonomicrocirurgia*: estudo experimental em laringes humanas excisadas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A fonomicrocirurgia evoluiu ao longo dos anos à medida que se aprofundou os conhecimentos sobre anatomia e fisiologia da laringe, porém as complicações ainda são inevitáveis. Uma das possíveis complicações é a perda de tecido de cobertura na borda livre da prega vocal ou área adjacente a ela. Dependendo da extensão e profundidade do defeito, ocorre uma exposição do ligamento vocal e irregularidade da borda livre, podendo gerar retração cicatricial, fenda glótica e rigidez de mucosa. Foi desenvolvido um retalho bipediculado de mucosa cordal com a finalidade de recobrir esse defeito de mucosa, regularizar a borda livre e reduzir a chance de uma possível fibrose que ocorreria, caso o defeito cicatrizasse por segunda intenção. **Objetivos:** Quantificar o maior defeito que o retalho bipediculado de mucosa cordal é capaz de recobrir. Avaliar a viabilidade de aumentar o retalho, acrescentando mucosa do assoalho do ventrículo e estudar a histologia desta região. **Métodos:** Utilizou-se no total 25 laringes excisadas de cadáveres humanos adultos. Em 10 laringes (cinco de cada gênero) confeccionou-se o maior retalho bipediculado de mucosa cordal na sua face cranial para então, posteriormente, quantificar as dimensões do defeito que ele poderia recobrir com seu deslocamento medial. Em outras 10 laringes (cinco de cada gênero) o retalho foi acrescido lateralmente de mucosa do ventrículo laríngeo e verificou-se se este aumento no tamanho do retalho seria capaz de recobrir defeitos maiores. As cinco laringes restantes foram utilizadas para análise histológica do assoalho do ventrículo laríngeo. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, picrossirius e resorcina-fucsina de Weigert. **Resultados:** Houve correlação do tamanho do defeito

com comprimento da prega vocal e com largura do retalho no grupo 1 e somente com o comprimento da prega vocal no grupo 2. Observou-se que o epitélio do assoalho do ventrículo é do tipo respiratório. **Conclusão:** A média da largura do defeito mucoso, capaz de ser recoberto pelo retalho bipediculado, foi de 1,51mm e quando o retalho foi acrescido lateralmente com mucosa do assoalho do ventrículo foi de 1,67mm. Esta diferença, porém, não foi estatisticamente significativa. Houve diferença estatística no tamanho do defeito de acordo com o gênero, sendo maior no grupo masculino. Há diferenças bastante evidentes na histologia da prega vocal e assoalho do ventrículo laríngeo.

Descritores: Cadáver; Disfonia; Epidemiologia experimental; Laringe; Prega Vocal; Voz.

ABSTRACT

Kinchoku VM. *Bipedicled vocal fold mucosal flap in phonomicrosurgery: experimental study in excised human larynges* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Phonomicrosurgery has developed over the years as the knowledge on laryngeal anatomy and physiology increased, but complications are still inevitable. Complications may include loss of cover tissue at the free edge of the vocal fold or an area adjacent to it. Depending on the length and depth of the defect, vocal ligament exposure and free edge irregularity may occur, which can lead to scar retraction, glottal gap, and mucosal stiffness. A bipedicled mucosal flap was developed with the aim to cover this mucosal defect, regularize the free edge, and reduce the chance of possible fibrosis that could occur if the defect healed by secondary intention. **OBJECTIVES:** To quantify the largest defect that the bipedicled mucosal flap can recover. To evaluate the feasibility of enlarging the flap by adding ventricular floor mucosa and to study the histology of this area. **METHODS:** A total of 25 excised larynges from adult human cadavers were used. In 10 larynges (five of each gender) the largest bipedicled vocal fold mucosal flap was made on its cranial surface to subsequently quantified the dimensions of the defect that it could cover by displacing the flap medially. In 10 other larynges (five of each gender) the flap was laterally added to the laryngeal ventricle mucosa and it was verified whether this increase in flap size would be able to cover larger defects. The five remaining larynges were used for histological analysis of the laryngeal ventricle floor. The slides were stained with hematoxylin-eosin, picrossirius and Weigert's resorcin-fuchsin. **RESULTS:** There was a correlation between defect size and vocal fold length and flap width in group 1 and only with vocal fold length in group 2. The ventricular floor epithelium is similar to the respiratory type. **CONCLUSION:** The mean width of the mucosal defect

capable of being covered by the bipedicle flap was 1.51mm and when the flap was laterally added with ventricular floor mucosa was 1.67mm. This difference, however, was not statistically significant. There was a statistical difference in defect size according to gender, being larger in the male group. There are evident differences in the histology of the vocal fold and ventricular floor.

Descriptors: Cadaver; Dysphonia; Epidemiology, experimental; Larynx; Vocal cords; Voice.

1 INTRODUÇÃO

A voz é a principal forma de comunicação humana. Ela faz parte da identidade de um indivíduo e quando alterada, pode causar distúrbios sociais e psicológicos (Isshiki *et al.*, 1999, Zeitels e Healy, 2003).

Um estudo realizado em Iowa e Utah encontrou taxa de disfonia de 6,2% na população geral (Roy *et al.*, 2004), porém acredita-se que até um terço da população sofrerá de disfonia ao longo da vida (Schwartz *et al.*, 2009).

Acredita-se que os dois fatores mais importantes para causa da disfonia sejam o fechamento imperfeito da glote (área glótica inicial $[Ag_0] > 0$) e alterações nas características reológicas da prega vocal (Isshiki, 1998; Isshiki *et al.*, 1999; Perazzo *et al.*, 2007).

Isshiki (1998) comprovou, por meio de estudos em laringes excisadas, que é necessário um fechamento glótico completo para melhora da disfonia. Se não houver esta condição, haverá um turbilhonamento do fluxo de ar transglótico, em vez de um fluxo laminar perfeito, causando rouquidão.

Em posse de tais conhecimentos, a microcirurgia de laringe evoluiu ao longo do tempo para restabelecer, o quanto possível, a fisiologia da fonação normal com intuito de manter, reabilitar ou melhorar a qualidade vocal do paciente.

Preservar as estruturas em multicamadas da prega vocal e sua maleabilidade tornou-se um dos princípios primordiais da fonocirurgia

moderna, após a descoberta da importância de cada uma delas no processo de fonação (Hirano, 1974; Zeitels e Healy, 2003; Akst *et al.*, 2018). Desta forma, durante a cirurgia procura-se obedecer a algumas premissas, tais como: incisões menores, preservar ao máximo a mucosa normal ao redor da lesão, limitar a dissecação ao plano mais superficial possível e regularizar a borda livre, a fim de evitar uma insuficiência glótica (Rosen e Simpson, 2008; Isshiki, 1989).

A técnica cirúrgica para correção da maioria das alterações estruturais mínimas, como o cisto intracordal, consiste na realização de um retalho (*microflap*), que segue os princípios fonomicrocirúrgicos de preservação de mucosa. Para realização deste *microflap* é imprescindível uma dissecação perfeita entre o plano da lesão e a mucosa. Nesta etapa cirúrgica é necessário muita destreza, paciência e cuidado (Rosen e Simpson, 2008). Em alguns casos, não obstante a experiência do cirurgião, devido dificuldades técnicas ou localização da lesão, ocorre a ruptura deste *microflap* e perda de tecido epitelial (Garrett *et al.*, 2000). Outras situações imprevisíveis durante o intraoperatório também podem cursar com perda de tecido de cobertura.

Em outras especialidades cirúrgicas, principalmente na cirurgia plástica, é bem difundido o uso de retalhos para recobrir defeitos de cobertura. As principais vantagens do uso desta técnica consistem em evitar a cicatrização por segunda intenção, proteção de estruturas nobres e funcionalidade. A área doadora deve ter pedículo vascular e atingir a área receptora sem tração (Neligan e Buck, 2015).

A perda do tecido de cobertura da prega vocal promove a exposição do ligamento vocal e quando este defeito acomete a borda livre ou área adjacente vibrátil, pode ocorrer uma cicatrização com maior chance de fibrose, gerando uma fenda glótica e um prejuízo na onda mucosa (Sataloff *et al.*, 1995). Pensando em uma forma de minimizar esses efeitos deletérios já no intraoperatório, foi desenvolvido um retalho bipediculado de mucosa cordal, que recobre a área cruenta e irregular da borda livre (Tsuji *et al.*, 2019).

Foi descrito que é fundamental uma mucosa intacta recobrindo a superfície vibratória para que ocorra uma recuperação funcional máxima (Garrett *et al.*, 2000). Isto pode ser devido a presença da mucosa prevenir a cicatrização por segunda intenção, diminuindo a chance de rigidez e retração cicatricial. O uso do retalho bipediculado, além de diminuir a chance de prejudicar a maleabilidade das pregas vocais, regulariza a borda livre, melhorando o Ag0 e consequentemente, de forma indireta, a pressão subglótica, visto que ocorreria um menor turbilhonamento e escape de ar (Isshiki *et al.*, 1998).

Tsuji *et al.* (2019) realizaram um trabalho avaliando o uso desta técnica em seis pacientes. Houve resultados cirúrgicos favoráveis em diversas situações, melhorando a onda mucosa e a percepção global da disfonia. O seu uso foi benéfico inclusive em casos de sulco vocal, que atualmente, é um dos maiores desafios da laringologia.

Por ser uma técnica inovadora e com grande potencial de aplicação e eficácia, percebeu-se a necessidade de um conhecimento maior sobre as limitações do seu uso, especialmente em relação ao tamanho máximo de

defeito que o retalho seria capaz de recobrir.

Aventou-se ainda, a possibilidade de incluir a mucosa do assoalho do ventrículo como parte do retalho e avaliar se este aumento do tamanho do retalho seria viável e vantajoso. Para uma melhor compreensão da viabilidade da utilização da mucosa do ventrículo laríngeo, foi realizado um estudo histológico desta região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Primários

a) Quantificar o maior defeito que o retalho bipediculado de mucosa cordal é capaz de recobrir.

b) Quantificar o maior defeito que o retalho bipediculado, acrescido de mucosa do ventrículo laríngeo, consegue recobrir.

2.2 Objetivo Secundário

a) Analisar as diferenças histológicas da mucosa da porção vibrátil da prega vocal e da mucosa do assoalho do ventrículo laríngeo.

b) Avaliar a diferença entre o tamanho do defeito mucoso produzido de acordo com o gênero.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Estudo Experimental em Laringes

Os primeiros registros de estudos em laringes humanas excisadas para produção vocal são atribuídos a Leonardo da Vinci (1452-1519) (Garcia e Herbst, 2018).

Em 1741, Ferrein, utilizando laringes excisadas de humanos e animais, comprovou que a vibração das pregas vocais era responsável pela produção do som.

Müller, em 1840, provou que a laringe excisada era capaz de produzir uma grande gama de pitches, através do controle da tensão das pregas vocais e da pressão subglótica, e corroborou as pesquisas de Ferrein. A partir deste trabalho, o uso de laringes excisadas tornou-se uma nova ferramenta valiosa para estudos na área da laringologia (Van Den Berg e Tan, 1959).

A teoria mioelastica-aerodinamica de Van den Berg, em 1958, foi postulada através do estudo dos fenômenos aerodinâmicos e da onda mucosa em laringes humanas excisadas. Este foi mais um grande avanço neste tipo de estudo, que começou a ser amplamente utilizado para pesquisa em diversas áreas e com diferentes objetivos (Garcia e Herbst, 2018).

A maioria dos estudos utilizando laringes excisadas são para investigar a produção vocal em humanos. Devido ao ambiente controlado, é possível determinar relação de causalidade entre os parâmetros físicos da produção vocal

com alteração da vibração e parâmetros acústicos. Além disso, o estudo em laringes excisadas permitiu melhor compreensão da voz cantada e aprimorar as pesquisas médicas em laringologia (Garcia e Herbst, 2018).

Os estudos variam sobre a forma de armazenamento das laringes. Alguns utilizam a laringe fresca, enquanto outros armazenam congeladas e realizam o descongelamento antes do experimento.

Hirano, em 1988, estudou os músculos intrínsecos da laringe e suas diferenças na configuração glótica de acordo com o sexo. Ele utilizou laringes sob refrigeração e relatou a manutenção das características vibratórias das pregas vocais. Em 1997, Tsuji também utiliza laringes humanas excisadas, conservadas sob refrigeração, para analisar o efeito da tireoplastia tipo I na vibração das pregas vocais.

Para verificar se o método de congelação era suficiente para preservar a viabilidade e maleabilidade dos tecidos da laringe, um experimento foi desenvolvido nos Estados Unidos, que tentou quantificar os efeitos das mudanças pós-morte e da congelação nas propriedades viscoelásticas da mucosa cordal de cães. O estudo concluiu que o módulo elástico e coeficiente de viscosidade (parâmetros utilizados para avaliar a reologia da prega vocal) não sofriam uma mudança significativa após 24 horas de acondicionamento em solução salina a temperatura ambiente, nem após 1 mês de congelação rápida (as peças eram congeladas com nitrogênio líquido por 3 minutos antes de serem armazenadas no freezer a menos 20 °C). Houve uma queda estatisticamente significativa desses parâmetros nos tecidos congelados de modo convencional (peças armazenadas diretamente no freezer a menos 20

°C). Para realizar o descongelamento, as laringes permaneceram a noite em um refrigerador comum a 4 °C, seguido de 30 minutos em temperatura ambiente, antes de sua manipulação (Chan e Titze, 2003).

Regner *et al.* (2010) compararam as características vibratórias entre laringes excisadas de humanos e diferentes animais, através da videoquimografia. As laringes foram conservadas congeladas em solução salina a -12 °C e descongeladas lentamente em água fria antes do seu uso. Concluiu-se que não havia diferenças significativas entre parâmetros vibratórios de laringes humanas e de cães. As características vibratórias de laringes de porcos não foram estatisticamente diferentes de laringes humanas do sexo feminino.

Alipour *et al.* (2013) utilizaram laringes de humanos descongeladas durante a noite em temperatura ambiente com solução salina, para comparar as características fonatórias em relação a laringes excisadas de animais. Eles concluíram que as laringes de cães e porcos são os modelos mais próximos dos humanos.

Hess *et al.*, em 2013, ao estudar um novo tipo de laser - *Picosecond infrared laser* (PIRL) para uso na fonomicrocirurgia, utilizaram 15 laringes humanas excisadas que foram armazenadas congeladas. Não é descrito no trabalho o modo de descongelamento. Os autores defendem o uso de laringes congeladas, embasados em um estudo anterior de Hess *et al.* (2006) que comprova que o congelamento e descongelamento não provocam alterações significativas nas propriedades viscoelásticas da mucosa cordal.

3.2 Histologia das Pregas Vocais e Ventrículo Laríngeo

Hirano, em 1974, propôs que as pregas vocais de humanos eram estruturas divididas em múltiplas camadas histológicas. Segundo o autor, a prega vocal era composta por músculo vocal, lâmina própria (dividida em três camadas: superficial, média e profunda) e epitélio estratificado pavimentoso.

O epitélio da borda livre da prega vocal é diferente de todo o resto da laringe, que é composto por epitélio pseudoestratificado ciliado. Esta diferença deve-se, provavelmente, à prega vocal necessitar de tecido de revestimento que seja resistente a trauma (Hirano, 1988). Logo abaixo do epitélio encontra-se a membrana basal, que é responsável pela sua fixação com a camada superficial da lâmina própria (Gray, 1991).

A camada superficial da lâmina própria é composta por tecido frouxo, fibras colágenas e elásticas finas. É uma camada flexível e a que mais se move durante a vibração das pregas vocais. A camada intermediária é rica em fibras elásticas, de consistência similar à de borracha macia e a camada profunda é rica em fibras colágenas, fornecendo mais rigidez à estrutura (Hirano, 1988).

O ligamento vocal é composto pela camada média e profunda da lâmina própria e está frouxamente ligado à membrana mucosa (epitélio e camada superficial da lâmina própria). Estes achados histológicos foram relacionados com a produção de voz, através do desenvolvimento da teoria corpo-cobertura. Segundo esta teoria, uma estrutura maleável (membrana mucosa) seria capaz de se movimentar sob uma estrutura rígida (músculo vocal), formando a onda mucosa. O ligamento vocal, neste caso, é a transição entre corpo e cobertura (Hirano, 1974).

Nas extremidades anterior e posterior da prega vocal encontra-se uma massa oval, rica em fibras elásticas, fibroblastos e estroma, chamada de mácula flava. Elas são continuações do ligamento vocal e funcionam como amortecedor para traumas causados pela vibração das pregas vocais. Anteriormente à mácula flava anterior encontra-se uma massa de fibra colágena, chamada de tendão da comissura anterior, que se insere na cartilagem tireóidea. Posteriormente à mácula flava posterior, encontra-se o processo vocal da cartilagem aritenoidea. Em ambos os casos há uma transição gradual entre a estrutura maleável da prega vocal para uma estrutura rígida das cartilagens. Essa transição também exerce importante papel na prevenção de traumas e absorção de impactos (Hirano, 1988).

Melo *et al.*, em 2003, por meio da análise histológica das pregas vocais e coloração pelo método da picrossírius-polarização, mostrou que há duas bandas de fibras colágenas tipo I organizadas como cesta de vime: uma logo abaixo do epitélio e outra, mais densa na camada profunda da lâmina própria, onde penetra no músculo vocal através de prolongamentos.

Quanto à distribuição de fibras elásticas, sabe-se que elas estão mais densamente concentradas na camada intermediária, sendo mais escassas na camada profunda. Na camada superficial são encontradas fibras elásticas mais delgadas (Ishii *et al.*, 1996; Hammond *et al.*, 1997).

Na literatura é abundante o número de estudos histológicos sobre a prega vocal, porém ainda é escasso o estudo sobre a transição entre a parte vibratória da prega vocal e o ventrículo laríngeo. Alguns autores relatam que o epitélio do ventrículo laríngeo é semelhante ao respiratório, porém foi

descrito que há um epitélio de transição entre estes dois, de células basalóides ou escamosas imaturas, com hiper celularidade, desorganização e aumento no índice núcleo-citoplasma (Wening, 2008). Kooli *et al.*, em 2001, por meio de estudo histológico de laringes de crianças, observou que 56% do epitélio encontrado no ventrículo era estratificado escamoso, enquanto 44% era do tipo respiratório. Não foi encontrado nenhuma outra referência que descreva se o ventrículo laríngeo também é organizado por camadas histológicas e se há um espaço mais frouxo, assim como o espaço de Reinke, que permita um plano natural de dissecação.

3.3 Fonomicrocirurgia

Uma das primeiras formas de cirurgia minimamente invasiva na área de laringologia ocorreu através da cirurgia guiada pelo espelho de Garcia. O conceito de fonomicrocirurgia iniciou com Albrecht, quando utilizou colposcópios ginecológicos para visualizar a laringe (apud Zeitels e Healy, 2003).

Na década de 1880, Joseph O'Dwyer desenvolveu os primórdios dos laringoscópios e em 1895, Alfred Kirstein formalmente introduziu a laringoscopia direta (apud Zeitels e Healy, 2003). Na década de 1960, com o uso do microscópio amplamente difundido, permitindo a amplificação da imagem e o desenvolvimento dos laringoscópios de suspensão, que possibilitaram a cirurgia bimanual, as cirurgias voltadas para melhoria da voz finalmente foram reconhecidas como uma modalidade cirúrgica (apud Ford, 1999).

Os refinamentos das técnicas fonomicrocirúrgicas basearam-se no conhecimento crescente sobre a anatomia das pregas vocais e dos mecanismos envolvidos na vibração da sua mucosa, tendo como princípio fundamental a preservação de tecidos e das propriedades de corpo-cobertura. Atualmente, os fonocirurgiões visam evitar a manipulação de tecidos sãos, limitando-se a incisão à área acometida, aproveitar o plano natural de dissecção na camada superficial da lâmina própria, regularizar o bordo livre e preservar a mucosa (Ford, 1999; Garrett *et al.*, 2000; Wierzbicka *et al.*, 2015).

É nesse contexto de preservação de estruturas vibráteis que se desenvolveu a técnica do *microflap* medial e lateral para exérese de várias lesões submucosas benignas de laringe, principalmente os cistos (Garrett *et al.*, 2000). A preservação da membrana mucosa íntegra possibilita a cicatrização primária mais rápida, aumentando a chance de conservar a onda mucosa intacta (Courey *et al.*, 1995).

Além das vantagens já descritas, a técnica do retalho de mucosa cordal evitaria a formação de fibrose no pós-operatório. Sataloff *et al.*, em 1995, postulam que preservando a membrana mucosa que recobre o ligamento vocal, não haveria trauma direto, impedindo o estímulo de fibroblastos nele presentes, que formariam a cicatriz.

O *microflap* lateral consiste numa incisão paralela ao bordo livre, na face superior da prega vocal, perto ao ventrículo laríngeo, seguida de descolamento da mucosa em sentido medial até acessar a lesão. Esta técnica tem como vantagens baixa probabilidade de lesar bordo livre e ligamento vocal, pois ele é mais facilmente identificado (Courey *et al.*, 1995). Após o procedimento, as pregas vocais pareciam curadas quase que no pós-

operatório imediato e os pacientes relatavam uma melhora da voz, embora nem sempre era visto uma melhora nos parâmetros da estroboscopia (Sataloff *et al.*, 1995).

Courey *et al.* (1995), avaliaram, entre 1990 e 1993, os resultados cirúrgicos de 32 pacientes que se submeteram a esta técnica, devido lesões benignas como pólipos, cisto, edema de Reinke e fibrose. Os autores observaram que houve uma melhora após a cirurgia, em 18 das 31 pregas vocais que apresentavam ausência de onda mucosa no pré-operatório.

Após Gray (1991) descrever que a membrana basal era uma estrutura complexa que ligava o epitélio à camada superficial da lâmina própria através de emaranhados de colágeno, a técnica do microflap foi sendo questionada pela possibilidade de alterar a integridade destas estruturas ao levantar o flap de mucosa. No final de 1991, difundiu-se a técnica do mini-microflap, em que o cirurgião restringe ao máximo a manipulação da mucosa. A incisão e descolamento ocorrem bem justo à lesão. Embora tenha sido visto uma tendência de melhores resultados no mini-microflap comparado ao microflap tradicional, não houve diferença significativa entre eles (Sataloff *et al.*, 1995).

Gray *et al.*, em 2000, demonstraram que há um plano de dissecção natural, entre as camadas superficial e intermediária da lâmina própria, onde é possível realizar o descolamento sem o uso de instrumentos cortantes e que o plano de dissecção se encontra mais superficial em idosos.

Embora os avanços cirúrgicos tenham bases teóricas, é notório que eles ainda acontecem pelo senso comum de plausibilidade e avaliação do sucesso pós-operatório. Não há modelo animal que tenha ligamento vocal, portanto os estudos são realizados experimentalmente e o que se pode ver

na prática são os resultados destas técnicas (Sataloff *et al.*, 1995).

Apesar das técnicas cirúrgicas terem evoluído e se aperfeiçoado, as complicações ainda são inevitáveis, como qualquer outro procedimento. Dentre as complicações encontram-se a fibrose de pregas vocais, rigidez de mucosa, perda tecidual e fenda glótica, quando há acometimento da borda livre da prega vocal ($Ag0 > 0$) (Garrett *et al.*, 2000).

3.4 Retalho de Mucosa Cordal

Um retalho consiste em um tecido de cobertura com suprimento vascular próprio, através de um pedículo, que é movido para uma área receptora com a finalidade de preencher uma ferida cirúrgica (Neligan e Buck, 2015).

A vascularização da mucosa das pregas vocais é realizada por vasos de pequeno calibre, que se originam das regiões anterior e posterior da parte intermembranácea da glote e que correm paralelamente à borda livre. Não foram observadas glândulas, nem vasos sanguíneos calibrosos próximos ao bordo livre da prega vocal, diferentemente dos vasos que foram encontrados nas regiões posterior e lateral, de calibre maior e dispostos em várias direções (Grellet *et al.*, 2002).

Em 1999, D'Avila *et al.* descreveram uma variação da técnica de exérese de cisto de prega vocal fistulizado. Nesta descrição foi realizado a exérese do cisto, seguido de fistulectomia extra-cordal e confecção de um *flap* bipediculado. Esta técnica foi utilizada em 67 cirurgias, obtendo uma cura em

100% dos casos sem nenhum caso de recidiva em 3 anos de acompanhamento.

Grellet *et al.*, em 2002, descreveram um retalho pediculado para correção de sulco vocal. Foi realizado uma incisão longitudinal junto ao lábio lateral do sulco e outra incisão paralela a 2 mm deste, por fim uma incisão transversal posterior juntava as duas incisões. Realizou-se o descolamento da mucosa e posicionamento do retalho sob o sulco vocal. Esta cirurgia foi realizada em 3 pacientes com sucesso pós-operatório em todos casos.

Izadi *et al.*, em 2015, descreveram um retalho em ilha para remoção de cisto intracordal. Foi realizado uma incisão medial e outra lateral junto à parede do cisto, com laser de CO₂, preservando uma ilha de epitélio entre eles. A lesão foi retirada por estas duas incisões. Foram incluídos quatro pacientes neste estudo, com acompanhamento médio de 11 meses pós-operatório. Todos obtiveram uma melhora dos parâmetros vocais e estroboscópicos.

Em 2019, Tsuji *et al.* apresentaram os resultados pós-operatórios de seis pacientes, nos quais foi utilizado o retalho bipediculado de mucosa cordal que esta tese descreve. Neste estudo, o retalho foi utilizado para recobrir defeitos de cobertura que se encontravam na borda livre ou área imediatamente adjacente na face superior da prega vocal, ou defeitos que deixavam o ligamento vocal exposto (Figura 1). As lesões previamente existentes na prega vocal variaram entre pólipos, cistos, sulcos e ponte. Com relação aos parâmetros estroboscópicos, houve diferença estatística somente na onda mucosa ($p=0,046$). Na análise da voz, houve uma melhora significativa no grau global de disfonia ($p=0,025$) e na soprosidade ($p=0,025$).

Fonte: Tsuji *et al.* (2019). Arquivo pessoal.

Figura 1 - Utilização do retalho bipediculado de mucosa cordal no intraoperatório. Na prega vocal direita foi encontrado um grande cisto aberto com tecido de granuloma no seu interior (seta branca, A). Sua remoção (B) resultou em um amplo defeito de mucosa (seta preta, C). Foi realizado a dissecção no plano natural de dissecção, na camada superficial da lâmina própria, com um descolador (D) e realizado uma incisão lateral, com um estilete foice, na face superior da prega vocal, paralela ao bordo do defeito (E). O retalho bipediculado (delimitado pelas linhas tracejadas, F) foi mobilizado, deslocado horizontalmente (no sentido medial) para recobrir o defeito (G) e fixado com cola de fibrina (H). Aspecto final da prega vocal direita após o uso do retalho bipediculado (I)

4 MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 056/16, em 28 de março de 2016 (Apêndice A).

Todas as laringes foram retiradas após autorização dos familiares e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), fornecido pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC).

4.2 Casuística

Este estudo experimental utilizou vinte e nove laringes excisadas de cadáveres humanos adultos, macroscopicamente íntegras, provenientes do SVOC.

Foram incluídas laringes retiradas em até 12 horas após o óbito. Foram excluídas quatro laringes que continham lesões de pregas vocais ou ventrículo laríngeo.

4.3 Preparo do Material

As peças foram retiradas por um técnico do SVOC e encaminhadas ao Laboratório de Habilidades Cirúrgicas do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. As 20 laringes disponibilizadas para realização do estudo experimental foram armazenadas congeladas a -20°C para preservação das propriedades teciduais. Quando utilizadas, elas foram descongeladas com solução salina a uma temperatura de 21°C a 25°C durante 1 hora. As outras cinco laringes foram utilizadas frescas para estudo histológico.

Foram removidas todas as estruturas adjacentes à laringe, como músculos extrínsecos, mucosa faríngea, esôfago e língua, assim como as estruturas da região supraglótica, como epiglote, gordura pré epiglótica, ligamentos ariepigloticos, membrana tireo-hioidea e osso hióideo. As bandas ventriculares foram removidas com o cuidado de não desinserir o ventrículo da parede lateral (cartilagem tireóidea) (Figura 2).

Figura 2 - Laringe após remoção de estruturas adjacentes. A: visão anterior. B: Visão posterior

Para realização do procedimento, as laringes foram posicionadas no suporte (Figura 3) idealizado pelo Prof Dr Domingos Hiroshi Tsuji e desenvolvido pela Ferrari (São Paulo, Brasil), para simular a inclinação encontrada em uma laringoscopia de suspensão. Foi utilizado um microscópio (MC-M12MF, DFV, São Paulo, Brasil), com lente de 250 mm. Os instrumentos utilizados foram pinças otológicas (estilete foice, estilete bisturi horizontal 90° e pinça de apreensão reta) e de laringe (microtesoura curva, pinça de apreensão triangular e pinça estilete descolador), estas últimas personalizadas pela Ferrari (São Paulo, Brasil) com tamanho de 250 mm (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 - Foto do suporte desenvolvido pela Ferrari (visão superior, lateral e anterior)

Figura 4 - Bancada pronta para procedimento na laringe

Figura 5 - Pinças utilizadas

4.4 Confeção do Retalho

4.4.1 Retalho bipediculado de mucosa cordal

Este retalho foi confeccionado em 10 pregas vocais, sendo cinco masculinas e cinco femininas. O lado escolhido foi aleatório. Este grupo de laringes foi denominado Grupo 1. As medições foram realizadas com paquímetro digital (modelo 100.250, Digimess®, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,01 mm.

O comprimento da parte membranosa da prega vocal foi medido desde

a comissura anterior até a sua inserção no processo vocal da cartilagem aritenoide. A largura foi medida no ponto médio do comprimento da parte membranosa da prega vocal entre a borda livre e a transição entre a porção vibrátil da prega vocal e o assoalho do ventrículo laríngeo. A espessura foi medida no ponto médio do comprimento da parte membranosa da prega vocal entre os dois planos paralelos traçados superior e inferiormente ao músculo tireoaritenóideo.

Com o intuito de confeccionar o maior retalho possível de mucosa cordal, foi realizada uma incisão longitudinal no bordo livre da prega vocal, estendendo-se da comissura anterior até processo vocal, seguida de descolamento da mucosa no plano natural de dissecção existente na camada superficial da lâmina própria (Figura 6).

Realizou-se uma incisão lateral, paralela à primeira, no limite lateral da prega vocal (na transição entre a porção vibrátil da prega vocal e o assoalho do ventrículo laríngeo, onde há a mudança de coloração), formando um retalho com pedículo anterior e posterior (Figura 6).

Figura 6 - Confeção do retalho bipediculado. A: Incisão com pinça estilete foice na borda livre da prega vocal direita. B: Descolamento no plano natural submucoso com estilete descolador. C: linhas pontilhadas demonstrando onde realizou-se a incisão lateral (limite da prega vocal, onde há a mudança de coloração da mucosa). D: Deslocamento medial do retalho, com pedículos anterior e posterior

Após as medições das dimensões da prega vocal e confecção do retalho, retirou-se a laringe do suporte e realizou-se uma incisão longitudinal com bisturi lâmina 11, na linha média da parte posterior da laringe, entre as cartilagens aritenóideas, seguida de abertura da cartilagem cricoide, de forma que fosse possível visualizar as pregas vocais (Figura 7).

Figura 7 - Abertura da região posterior de laringe. A: Incisão com bisturi lâmina 11 na linha média, na parte posterior da laringe. B: Abertura da cartilagem cricoide, de forma a deixar as pregas vocais expostas (setas brancas)

Com a laringe aberta, sob visão do microscópio, o retalho é movimentado no sentido horizontal até o limite de seu deslocamento medial e realizado uma marcação na mucosa com um estilete foice, no ponto médio da parte membranosa da prega vocal e local de maior deslocamento (Figura 8). O retalho é reposicionado no seu lugar original e a partir desta marcação na mucosa realizada anteriormente (Figura 9), é confeccionado um defeito em formato de meia lua, com uma microtesoura curva (Figuras 10 e 11).

As medições da largura do defeito e da largura do retalho, no ponto médio do comprimento da prega vocal, foram realizadas na laringe neste momento.

Figura 8 - Deslocamento medial do retalho e marcação com estilete foice na mucosa, no ponto médio do comprimento da prega vocal (seta). R: retalho. A: anterior. P: posterior. Asteriscos: área descoberta após deslocamento do retalho

Figura 9 - Marcação na mucosa, do ponto de máximo deslocamento do retalho (seta preta). A: anterior. P: posterior

Figura 10 - Confeção do defeito mucoso. A partir da marcação na mucosa (seta preta), é realizado um defeito em forma de meia lua na mucosa (linhas tracejadas), com uma microtesoura curva. A: anterior. P: posterior

Figura 11 - Aspecto da laringe após confecção do defeito. A: Anterior. P: posterior. R: retalho. D: defeito. Seta vermelha: onde foi realizada a medição do tamanho do defeito

O retalho foi então fixado na posição (recobrando o defeito de mucosa) com cola de fibrina (Figuras 12 e 13). Após 10 minutos para fixação completa do retalho e secagem da cola, retirou-se o afastador e aproximou-se novamente a região posterior da cartilagem cricoide, de forma que a laringe fosse fechada e posicionada no suporte. Realizou-se a palpação das mucosas cordais e aproximação das cartilagens cricoide e tireoide, através de um ponto com fio nylon 2-0, para estiramento das pregas vocais e observou-se que o retalho permanecia devidamente aderido no local.

Figura 12 - Aplicação de cola de fibrina para fixar o retalho. A: anterior. P: posterior, R: retalho, D: defeito, seta preta: cola de fibrina

Figura 13 - Aspecto final após deslocamento do retalho para recobrir o defeito. A: anterior. P: posterior, R: retalho deslocado e recobrindo o defeito, asteriscos: área sem cobertura na superfície cranial da prega vocal

4.4.2 Retalho bipediculado de mucosa cordal acrescido de mucosa do ventrículo

Este retalho foi confeccionado em 10 pregas vocais, sendo cinco masculinas e cinco femininas. Este grupo de laringes foi denominado Grupo 2.

Com o intuito de confeccionar o maior retalho possível de mucosa cordal acrescido de mucosa do ventrículo, foi realizada uma incisão longitudinal no bordo livre da prega vocal, estendendo-se da comissura anterior até processo vocal, seguida de descolamento no plano natural submucoso da prega vocal. O descolamento da mucosa do ventrículo laríngeo foi realizado com uma microtesoura curva e com estilete bisturi horizontal 90°. Realizou-se uma incisão lateral, paralela à primeira, no limite lateral do ventrículo laríngeo (até onde era possível descolar a mucosa) (Figura 14).

Figura 14 - Confecção do retalho bipediculado de mucosa cordal acrescido de mucosa do ventrículo laríngeo. A: Incisão no bordo livre da prega vocal. B: descolamento no plano submucoso com estilete descolador, seguido de descolamento da mucosa do ventrículo com microtesoura. C: Incisão lateral (linha pontilhada) no limite do descolamento lateral do ventrículo laríngeo. D: medição do tamanho do retalho

Os passos seguintes, a partir da confecção do retalho, foram semelhantes ao já descrito no retalho bipediculado de mucosa cordal (Figuras 7 a 13).

4.5 Análise Histológica

Para análise histológica, foram utilizadas cinco laringes frescas. Após a retirada no SVOC, as laringes foram dissecadas para retirada de todas partes moles adjacentes, como músculos extrínsecos, mucosa faríngea, esôfago e língua, assim como as estruturas da região supraglótica, como epiglote, gordura pré epiglótica, ligamentos ariepigloticos, membrana tireo-hioidea e osso hioideo. Posteriormente, elas foram imediatamente acondicionadas em solução de formaldeído tamponado a 10% por 24 horas.

Após este período para fixação, as peças foram embebidas em ácido nítrico a 5% por 48 horas para a descalcificação e posterior recorte. Foi realizada uma incisão longitudinal na linha média da região posterior da laringe com um bisturi número 11, entre as cartilagens aritenóideas (Figura 7). Retirou-se um retângulo compreendendo, aproximadamente, o terço médio da prega vocal, parte da banda ventricular, ventrículo laríngeo e cartilagem tireóidea (Figura 15). O lado a ser retirado foi selecionado aleatoriamente. Os fragmentos foram submetidos a desidratação em concentrações gradativas de álcool etílico e embebição em parafina para confecção dos blocos.

Fonte: Modificado de Netter (2018)

Figura 15 - Retângulos em preto ilustrando a região que foi recortada para análise histológica. À esquerda observa-se um corte sagital da laringe e à direita um corte coronal. Os limites anterior e posterior foram os limites do terço médio da prega vocal

Os blocos foram submetidos a cortes seriados de 5 μ m de espessura, no sentido coronal e corados pelo método de hematoxilina e eosina, para análise histopatológica inicial.

Para identificar as diferenças entre a composição da prega vocal e do assoalho do ventrículo laríngeo, realizou-se a coloração pelo método de picrossirius, para analisar as fibras colágenas e resorcina-fucsina de Weigert, para analisar as fibras elásticas.

O preparo das lâminas foi realizado por um mesmo técnico, de modo a manter a padronização.

As lâminas passaram pelo processo de digitalização com auxílio do scanner Pannoramic Scan (3D Hitech, Budapeste, Hungria) e transportadas para o software Pannoramic Viewer.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Sciences, versão 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Devido a casuística pequena do estudo, optou-se por utilizar testes não-paramétricos. Para comparar diferentes medidas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Analisou-se a associação entre o tamanho do defeito e as demais variáveis quantitativas através do teste de Spearman.

Adotou-se o nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Experimental

Foram utilizadas 20 laringes excisadas de cadáveres humanos adultos, sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino. O Anexo A contém os dados completos das características dos cadáveres (sexo, idade, comprimento, largura e altura das pregas vocais, tamanho do defeito e do retalho).

A Tabela 1 mostra a análise da casuística das laringes obtidas e a Tabela 2 mostra os mesmos dados separados por gênero.

Tabela 1 - Descrição das medidas resumo de idade, sexo, comprimento e largura das pregas vocais

Variável	Valor (n=20)
Idade (anos)	
Média $\pm$ DP	74 $\pm$ 13,5
Mediana (mín.; máx.)	78 (40; 95)
Sexo, n (%)	
Feminino	10 (50%)
Masculino	10 (50%)
Comprimento Prega Vocal (mm)	
Média $\pm$ DP	13,47 $\pm$ 2,34
Mediana (mín.; máx.)	13,05 (10,12; 18,37)
Largura Prega Vocal (mm)	
Média $\pm$ DP	2,40 $\pm$ 0,23
Mediana (mín.; máx.)	2,36 (2,02; 2,9)

n: tamanho da amostra; DP: desvio padrão; mín: mínimo; máx: máximo

Tabela 2 - Descrição das medidas resumo de idade, comprimento e largura das pregas vocais, separados por gênero

Variável	Feminino (n=10)	Masculino (n=10)
Idade (anos)		
Média $\pm$ DP	78,3 $\pm$ 11,90	69,7 $\pm$ 14,16
Mediana (mín.; máx.)	78,5 (56; 95)	72 (40; 87)
Comprimento Preca Vocal (mm)		
Média $\pm$ DP	11,52 $\pm$ 0,92	15,42 $\pm$ 1,50
Mediana (mín.; máx.)	11,70 (10,12; 12,85)	15,2 (13,26; 18,37)
Largura Preca Vocal (mm)		
Média $\pm$ DP	2,35 $\pm$ 0,19	2,45 $\pm$ 0,26
Mediana (mín.; máx.)	2,32 (2,02; 2,72)	2,5 (2,04; 2,9)

n: tamanho da amostra; DP: desvio padrão; mín: mínimo; máx: máximo

A Tabela 3 mostra o tamanho do defeito e retalho nos dois grupos. Houve uma diferença no tamanho do retalho dos dois grupos, porém não houve diferença significativa no tamanho máximo do defeito que ele conseguiu recobrir (Gráficos 1 e 2).

Tabela 3 - Descrição das medidas resumo do retalho e defeito nos 2 grupos

Variável	Grupo 1 (n=10)	Grupo 2 (n=10)
Defeito(mm)		
Média $\pm$ DP	1,51 $\pm$ 0,21	1,67 $\pm$ 0,37
Mediana (mín.; máx.)	1,56 (1,17; 1,77)	1,76 (1,12; 2,24)
IIQ [Q1; Q3]	0,33 [1,35; 1,68]	0,44 [1,43; 1,87]
Retalho (mm)		
Média $\pm$ DP	1,92 $\pm$ 0,27	3,29 $\pm$ 0,62
Mediana (mín.; máx.)	1,93 (1,49; 2,46)	3,36 (2,3; 4,07)
IIQ [Q1; Q3]	0,30 [1,74; 2,05]	0,57 [3,10; 3,67]

Grupo 1: retalho somente da prega vocal; Grupo 2: retalho da prega vocal acrescido de mucosa do assoalho do ventrículo laríngeo; n: tamanho da mostra; DP: desvio padrão; mín: mínimo; máx: máximo; IIQ: intervalo interquartil; Q1: percentil 25%; Q3: percentil 75%.

Gráfico 1 - Comparação entre tamanho do defeito no grupo 1 e grupo 2

* teste de Mann- Whitney

Gráfico 2 - Comparação entre tamanho do retalho no grupo 1 e grupo 2

* teste de Mann- Whitney

A Tabela 4 mostra o tamanho do defeito nos dois grupos, separados por gênero. O tamanho do defeito foi maior no grupo masculino nos dois grupos.

Tabela 4 - Descrição das medidas resumo do tamanho do defeito nos 2 grupos, separado por gênero e análise estatística da diferença entre eles

Tamanho Defeito	Feminino	Masculino	p*
Grupo 1	n= 5	n= 5	
Média ± DP	1,37 ± 0,21	1,64 ± 0,11	
Mediana (mín.; máx.)	1,31 (1,17; 1,69)	1,64 (1,47; 1,77)	0,05
IIQ [Q1; Q3]	0,22 [1,24; 1,46]	0,06 [1,64; 1,7]	
Grupo 2	n=5	n=5	
Média ± DP	1,39 ± 0,28	1,94 ± 0,20	
Mediana (mín.; máx.)	1,39 (1,12; 1,78)	1,9 (1,74; 2,24)	0,02
IIQ [Q1; Q3]	0,42 [1,12; 1,54]	0,25 [1,79; 2,04]	

Grupo 1: retalho somente da prega vocal; Grupo 2: retalho da prega vocal acrescido de mucosa do assoalho do ventrículo laríngeo; n: tamanho da mostra; DP: desvio padrão; mín: mínimo; máx: máximo; IIQ: intervalo interquartil; Q1: percentil 25%; Q3: percentil 75%; p: significância estatística.

* teste de Mann- Whitney.

As Tabelas 5 e 6 mostram o resultado da análise da associação entre o tamanho do defeito com comprimento da prega vocal, largura da prega vocal e tamanho do retalho nos grupos 1 (Gráficos 3 e 4) e no grupo 2 (Gráficos 5 e 6).

Tabela 5 - Correlação entre o tamanho do defeito e as variáveis comprimento da prega vocal, largura da prega vocal e tamanho do retalho no grupo 1

VARIÁVEL	Rs	P VALOR *
Comprimento	0,68	0,03
Largura	0,06	0,87
Retalho	0,74	0,014

Rs: coeficiente de correlação; p: significância estatística. * correlação de Spearman

Gráfico 3 - Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do comprimento da parte membranosa da prega vocal no grupo 1

Gráfico 4 - Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do retalho no grupo 1

Tabela 6 - Correlação entre o tamanho do defeito e as variáveis comprimento da prega vocal, largura da prega vocal e tamanho do retalho no grupo 2

VARIÁVEL	Rs	P VALOR *
Comprimento	0,78	0,008
Largura	0	1
Retalho	-0,55	0,10

Rs: coeficiente de correlação; p: significância estatística. * correlação de Spearman

Gráfico 5 - Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do comprimento da parte membranosa da prega vocal no grupo 2

Gráfico 6 - Dispersão do tamanho do defeito e tamanho do retalho no grupo 2

5.2 Análise Histológica

Foram utilizadas cinco laringes excisadas de cadáveres humanos adultos. O Anexo B contém os dados completos das características dos cadáveres (sexo, idade, peso e altura).

Os achados foram consistentes em todas as laringes. Observou-se que o ventrículo laríngeo apresenta epitélio do tipo pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes, semelhante ao respiratório. A mudança de epitélio aconteceu bruscamente em quatro das laringes estudadas. Em somente uma houve a presença de um epitélio de transição de células basaloides (Figuras 16, 17 e 18).

Figura 16 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método hematoxilina-eosina, com aumento de 25x. O quadrado mostra a área a ser estudada, na transição da porção vibratória da prega vocal e o assoalho do ventrículo. Pode-se visualizar a transição do epitélio (seta preta)

Figura 17 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método hematoxilina-eosina, com aumento de 100x mostrando a diferença do epitélio. Epitélio pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes (seta preta) e epitélio estratificado pavimentoso (seta vermelha)

Figura 18 - Transição de epitélio com presença de células basaloides. Aumento 150x

No ventrículo laríngeo há uma camada de fibras elásticas delgadas imediatamente abaixo do epitélio e não há um tecido frouxo abaixo dele, semelhante ao espaço de Reinke. Há uma outra camada mais profunda de fibras elásticas, próxima ao músculo vocal (Figura 19).

Figura 19 - Fibras elásticas delgadas logo abaixo do epitélio (seta vermelha) e camada de fibras elásticas mais grossas próxima ao músculo vocal (seta azul). Lâmina corada pelo método de resorcina-fucsina de Weigert. Aumento 50x

Logo abaixo do epitélio pode-se observar presença de vasos sanguíneos e linfáticos. A lâmina própria contém glândulas seromucosas isoladas, que parecem ajudar na lubrificação das pregas vocais, uma vez que elas não as possuem (Figura 20).

Figura 20 - Glândulas (seta amarela), vasos sanguíneos (seta vermelha) e linfáticos (seta azul). Aumento 25x

As fibras colágenas encontram-se mais compactas e difusamente concentradas na região do assoalho do ventrículo laríngeo (Figura 21).

Figura 21 - Corte coronal do terço médio da porção membranosa de prega vocal humana corado pelo método picrossirius-red, observada sob luz convencional (A) e luz polarizada (B). Na prega vocal observa-se uma fina camada de fibras colágenas logo abaixo do epitélio (seta branca) e uma camada mais grossa e densa de colágeno na camada profunda da lâmina própria (seta amarela). Observa-se no assoalho do ventrículo uma concentração difusa de fibras colágenas (seta verde). Aumento de 50x

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo Experimental

Desde o século XV há indícios da utilização de laringes excisadas para estudo, desde então esta forma de pesquisa proporcionou avanços importantes na área da laringologia (Garcia e Herbst, 2018). Ferrein (1741), Müller (1840) e Van den Berg (1958), por meio de estudo experimental, puderam comprovar que o som era produzido pela vibração das pregas vocais e entender o mecanismo da fonação.

Além de melhorar a compreensão da fisiologia e anatomia, o estudo com laringes excisadas foi importante também para prever resultados terapêuticos, principalmente na área cirúrgica (Luo, *et al.*, 2018).

As principais vantagens do estudo experimental consistem na facilidade de acesso visual de todos os ângulos da laringe, ambiente controlado e modelo mais fidedigno de um modelo real. É citada algumas desvantagens, como tempo limitado de experimento, devido deterioração dos tecidos e não poder contrair músculos, em especial o tireoaritenóideo, já que a contração dos outros músculos laríngeos pode ser mimetizada (Van den Berg e Tan, 1959; Döllinger *et al.*, 2011).

A dificuldade na obtenção de laringes de cadáveres humanos e o aspecto ético nele envolvido são as prováveis razões de grande número de experimentos optarem pelo uso de laringes de animais mamíferos (Garcia e Herbst, 2018).

Embora haja estudos demonstrando que as propriedades vibratórias e fonatórias são equiparáveis (Garrett *et al.*, 2000; Regner *et al.*, 2010; Alipour *et al.*, 2013), a laringe humana continua sendo a primeira escolha quando se leva em consideração a singularidade da anatomia e estrutura em multicamadas da prega vocal, além de não existir modelo animal que tenha ligamento vocal (Sataloff *et al.*, 1995; Garcia e Herbst, 2018).

Por estas razões, embora grande parte dos estudos com laringes humanas excisadas sejam do tipo exploratório e experimental, como este, é inegável sua importância para o avanço na área da laringologia e fonomicrocirurgia. Estes estudos possibilitam o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e avaliação de sua plausibilidade, podem predizer os benefícios e limitações das intervenções e ajudam a compreender a anatomia aplicada à cirurgia.

A forma de armazenamento das laringes varia conforme os estudos. Alguns optaram pelo uso da laringe fresca (retirada em até 24 horas após o óbito), para garantir manutenção das propriedades físicas e maleabilidade da mucosa, embora tenham pontuado a possibilidade de usar laringes congeladas (Bohadana, 2002; Chung *et al.*, 2007; Pinheiro, 2016; Ishikawa, 2016), enquanto outros utilizaram as laringes armazenadas sob refrigeração. Chan e Titze (2003) ao estudarem o efeito da congelação nos tecidos da prega vocal de cães, observaram que as propriedades reológicas não eram afetadas após 24 horas do óbito nas laringes acondicionados em solução salina em temperatura ambiente ou após um mês de congelação rápida com nitrogênio líquido, porém havia uma queda dos parâmetros quando congeladas pelo

método convencional. Este estudo foi conduzido em modelo animal canino e, portanto, talvez não seja aplicado a laringe humana excisada, já que desde 1988 (Hirano *et al.*, 1988) utiliza-se laringes acondicionadas sob refrigeração e os estudos demonstraram não haver prejuízo nas propriedades viscoelásticas (Tsuji, 1997; Hess *et al.*, 2006; Alipour *et al.*, 2013; Hess *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

Além de ter embasamento nestes estudos anteriores, que demonstraram não haver prejuízo nos tecidos e nas propriedades reológicas (Tsuji, 1997; Alipour *et al.*, 2013), o objetivo deste estudo foi essencialmente descritivo em relação ao tamanho do defeito. Desta maneira, acredita-se que o uso de laringes congeladas não prejudicou os resultados encontrados.

No presente estudo, optou-se pelo descongelamento em solução salina para manter a hidratação das pregas vocais, que mostrou ser um fator importante para manter a maleabilidade da mucosa (Van den Berg e Tan, 1959; Jiang *et al.*, 1999).

6.2 Retalho Bipediculado e Tamanho do Defeito de Mucosa Cordal

Os primórdios da cirurgia minimamente invasiva de laringe iniciaram-se com as cirurgias guiadas pelo espelho de Garcia (apud Zeitels e Healey, 2003). Após o desenvolvimento dos laringoscópios e o uso do microscópio amplamente difundido, a fonocirurgia foi aceita e avançou como modalidade cirúrgica (apud Ford, 1999).

As técnicas cirúrgicas desenvolveram-se embasadas no conhecimento sobre anatomia e fisiologia da laringe. Conforme esse conhecimento

aumentava, as técnicas iam se aperfeiçoando e se adaptando às novidades. Após a compreensão da complexidade das camadas das pregas vocais e a importância de cada uma delas no processo de vibração, o conceito de máxima preservação dos tecidos foi amplamente aceito (Ford, 1999; Garrett *et al.*, 2000).

Foi a partir deste momento que surgiram as técnicas de retalho de mucosa cordal. A técnica do *microflap* medial e lateral para exérese de lesões submucosas de pregas vocais é amplamente utilizada pelos bons resultados que tem no pós-operatório. O intuito do uso de retalhos é a preservação de superfície e cicatrização primária, que parecem ser fundamentais para preservar as propriedades viscoelásticas da mucosa (Courey *et al.*, 1995).

Na literatura, além do *microflap* medial e lateral, há a descrição de alguns retalhos de mucosa cordal que foram utilizados como um passo cirúrgico para remoção de lesões de pregas vocais ou para correção de sulco (D'Avila *et al.*, 1999; Grellet *et al.*, 2002; Izadi *et al.*, 2015), porém não houve nenhum retalho semelhante e com a mesma função que o retalho bipediculado de mucosa cordal, que foi utilizado neste estudo.

Um retalho necessita de suprimento vascular próprio, através de um pedículo. Sabe-se que a vascularização da prega vocal é paralela ao bordo livre, originada na região anterior e posterior da parte intermembranácea da glote (Grellet *et al.*, 2002), portanto, o retalho bipediculado de mucosa cordal obedece a direção dos vasos da mesma, garantindo que o retalho tenha irrigação.

O retalho deste estudo foi desenvolvido com o intuito de regularizar a

borda livre e recobrir um defeito de cobertura nesta região ou área adjacente, na face superior da prega vocal. Essas regiões são fundamentais e cruciais para que ocorra uma fisiologia da fonação adequada, com fechamento glótico completo e propagação da onda mucosa.

Além de ser um método fácil e seguro para recobrir defeitos de cobertura, o uso desta técnica visa diminuir a chance de fibrose cicatricial, por evitar a cicatrização por segunda intenção e recobrir o ligamento vocal exposto, impedindo o trauma direto e o estímulo de fibroblastos nele presentes, que poderiam causar rigidez de mucosa (Sataloff *et al.*, 1995).

Tsuji *et al.* (2019) mostraram que o uso do retalho não prejudicou o resultado pós-operatório esperado da exérese de pólipos, cistos, sulcos e ponte mucosa. Talvez, se o defeito mucoso permanecesse sem cobertura, o resultado poderia ser pior. Trata-se de uma suposição, porém clinicamente sabe-se que retirar a cobertura da prega vocal e permitir a cicatrização por segunda intenção causa maior fibrose e alterações das propriedades reológicas, consequentemente, impactando na qualidade vocal, assim como acontece quando se realiza a decorticação de pregas vocais.

O retalho bipediculado poderia ser utilizado para reparar alguma deformidade de mucosa cordal ou uma falha na camada superficial da lâmina própria, e não somente em casos de defeitos de cobertura intraoperatórios. Um exemplo do potencial de uso desta técnica seria para correção de sulco vocal. Tsuji *et al.* (2019) utilizaram o retalho bipediculado de mucosa cordal em dois casos de sulco vocal, com melhora dos parâmetros estroboscópicos (ausência de sulco no exame pós-operatório) e funcional (melhora da análise

perceptiva-auditiva da voz).

Durante o intraoperatório, antes da confecção e execução do retalho é necessário saber se é possível realizar esta técnica dependendo da magnitude do defeito que se almeja recobrir.

A ideia de confeccionar o maior retalho possível (abrangendo toda superfície da face cranial da prega vocal) para então, poder avaliar o tamanho do defeito, é devido as lesões serem majoritariamente na borda livre da prega vocal. Do ponto de vista prático, o defeito de mucosa causado durante uma fonomicrocirurgia costuma ser pequeno, exigindo um retalho menor do que o avaliado neste estudo.

A presença dos pedículos anterior e posterior fixam as extremidades do retalho, proporcionando maior deslocamento na região central do mesmo. Portanto, para que haja um fechamento borda a borda, idealmente, o defeito deve ser em formato de meia-lua, com amplitude maior no ponto médio do comprimento do retalho produzido. Em alguns casos, durante o intraoperatório, o defeito deverá ser remodelado para um formato mais próximo a um fusos, para permitir essa melhor adaptação.

Houve um grau de correlação estatisticamente significante entre tamanho do defeito com tamanho do retalho. Este trabalho mostrou que é possível recobrir um defeito de em média 1,51 mm. O tamanho do retalho foi em média 1,93 mm. A média do retalho correspondeu a um aumento de 30% da média da largura do defeito.

O tamanho de defeito máximo que o retalho conseguiu recobrir no grupo feminino teve média de 1,37 mm e no grupo masculino de 1,64 mm. Essas

medidas correspondem a 58% da média da largura de prega vocal encontrada no grupo feminino e 67% da largura de prega vocal do grupo masculino.

Houve diferença significativa no tamanho do defeito de acordo com o gênero, sendo maior no grupo masculino. Esperava-se esse resultado, já que é bem descrita na literatura a diferença nas dimensões da prega vocal entre os dois grupos (Ximenes Filho *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2011; Jotz *et al.*, 2014; Mobashir *et al.*, 2018) e o defeito mostrou correlação significativa com comprimento da prega vocal. No trabalho de Mobashir *et al.* (2018), ao analisar 21 laringes frescas, a média do comprimento da prega vocal membranosa foi 15,1 mm no grupo masculino contra 10,4 mm no grupo feminino, essa diferença foi estatisticamente significativa. Jotz *et al.* (2014) analisaram as medidas morfométricas de laringes durante 20 anos e obtiveram um total de 100 laringes (50 de cada gênero). A média do comprimento da prega vocal membranosa foi 14,97 mm no grupo masculino e 11,17 mm no grupo feminino, com uma diferença bastante significativa entre os dois grupos. No presente estudo, a média do comprimento das pregas vocais em homens foi 15,42 mm e nas mulheres 11,52 mm, condizente ao encontrado na literatura.

Observamos que é possível aumentar o tamanho do retalho adicionando a mucosa do ventrículo, porém a área recoberta do defeito não difere muito, não obtendo diferença significativa. Esta pouca diferença provavelmente se deve ao fato da restrição de mobilidade lateral, imposta pelos pedículos anterior e posterior. O aumento de tecido de cobertura não modifica o potencial de deslocamento.

Há uma maior dificuldade ao descolar a mucosa do ventrículo laríngeo,

pois esta região não possui o espaço natural de descolamento (espaço de Reinke), evidenciado pelos estudos histológicos. Porém, com a ajuda de um instrumento cortante, é possível realizar a dissecação no plano submucoso. Outra possível desvantagem do uso da mucosa do ventrículo é a chance de sangramento, visto que na região lateral da prega vocal os vasos são mais calibrosos e dispostos em várias direções (Grellet *et al.*, 2002).

Embora as lesões de pregas vocais estejam majoritariamente localizadas perto da borda livre da prega vocal, durante fonomicrocirurgia para resolução de cistos intracordais grandes, fibroses ou áreas de sulco, pode ocorrer uma perda excessiva de tecido de cobertura na face cranial da prega vocal. Nestas situações, o uso de mucosa do assoalho do ventrículo seria importante, pois talvez o tecido que restou de mucosa cordal vibrátil não seja suficiente para recobrir o defeito.

A cola de fibrina parece ser suficiente para manter o retalho na sua posição, pois ele permaneceu intacto mesmo após palpação e estiramento de pregas vocais. Porém, seria mais adequado estudos *in vivo* e com um tempo de acompanhamento apropriado para confirmar esta afirmativa e avaliar os efeitos inflamatórios que o retalho poderia promover na prega vocal a longo prazo.

6.3 Diferenças Histológicas entre Área Vibrátil da Prega Vocal e Assoalho de Ventrículo Laríngeo

Para a análise histológica optou-se por utilizar laringes frescas, sem nenhuma manipulação, pois observou-se no estudo piloto que o epitélio é

facilmente descamado e prejudicaria a análise.

Sabe-se que há uma membrana basal que liga o epitélio à camada superficial da lâmina própria através de emaranhado de colágeno. Esta descoberta fez os *microflaps* laterais serem questionados por possivelmente prejudicarem esta estrutura ao levantar a mucosa, porém estudos e a prática clínica mostram que não há prejuízo na cicatrização, pelo contrário, há uma melhora da onda mucosa e dos resultados pós operatórios quando realiza-se esta técnica (Sataloff *et al.*, 1995; Courey *et al.*, 1995). Este é o mesmo raciocínio utilizado no retalho bipediculado de mucosa cordal. Embora haja um descolamento de toda a mucosa e deslocamento da mesma, preservar uma cobertura mucosa protegendo o ligamento vocal parece ser um dos principais fatores para a cicatrização adequada, com manutenção das propriedades vibráteis da prega vocal.

Observamos que o epitélio do assoalho do ventrículo é do tipo respiratório, ou seja, pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes. Somente em um caso foi visto um epitélio de transição com células basalóides, conforme descrito por Wening (2008).

Logo abaixo do epitélio encontramos fibras elásticas finas, semelhante ao encontrado na prega vocal verdadeira. O estudo de Ishii *et al.* (1996) demonstrou por meio de microscopia eletrônica, que havia fibras elásticas oxitalânicas logo abaixo do epitélio da prega vocal humana. Este estudo foi confirmado por Ramos *et al.* (2005), por meio de imunohistoquímica que corava os diferentes tipos de fibras elásticas. Acredita-se que há a presença de fibras oxitalânicas em regiões submetidas a estresse mecânico (Montes,

1992). A presença destas fibras mostra que o ventrículo laríngeo é uma região que suporta absorção de impacto, muito provavelmente proveniente da vibração das pregas vocais.

Há uma camada de fibras colágenas compactas, sem um espaço de tecido frouxo entre ela e o epitélio, justificando a dificuldade em descolar a mucosa nesta região. Essa configuração histológica promove maior rigidez ao assoalho do ventrículo, propiciando a transição entre elasticidade da prega vocal verdadeira e tecido rígido adjacente (cartilagem tireóidea), semelhante ao que encontramos na região anterior e posterior da prega vocal, com as máculas flavas e na região inferior, com o cone elástico. Essa transição parece ter importância na prevenção de traumas e absorção de impactos da prega vocal e ser um fator importante para isolá-la de disseminações tumorais (Hirano, 1988).

6.4 Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras

A principal limitação deste estudo é ser um estudo experimental, portanto em condições ideais, com boa exposição e acesso facilitado. Ele é uma base para posteriores estudos *in vivo* sobre o efeito inflamatório promovido pelo retalho na prega vocal e o impacto do uso desta técnica na vibração da mucosa cordal e no fechamento glótico.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

- O retalho bipediculado de mucosa cordal foi capaz de recobrir um defeito de média 1,51 mm de largura.
- Quando o retalho foi acrescido de mucosa do ventrículo laríngeo, a média da largura do defeito foi de 1,67 mm.
- Não houve diferença estatística entre as médias dos tamanhos dos defeitos nos dois grupos.
- Há uma diferença significativa entre o tamanho do defeito de acordo com o gênero, sendo maior no grupo masculino.
- Há diferenças bastante evidentes na histologia da prega vocal e assoalho do ventrículo.
- O assoalho do ventrículo laríngeo é formado por epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, uma camada compacta de fibras colágenas e fibras elásticas mais profundas. Não há uma camada semelhante ao espaço de Reinke, abaixo do epitélio.

Anexo A - Dados das laringes obtidas no Serviço de Verificação de Óbitos da capital

Laringes em que foi confeccionado o retalho bipediculado de mucosa cordal

	Sexo	Idade (anos)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura (mm)	Defeito (mm)	Retalho (mm)
1	Masculino	66	16,37	2,08	2,25	1,77	2,03
2	Masculino	59	14,07	2,9	3,87	1,7	2,46
3	Feminino	64	10,23	2,35	2,47	1,17	1,84
4	Feminino	82	11,71	2,02	2,57	1,69	1,98
5	Feminino	95	10,86	2,3	2,81	1,31	1,71
6	Feminino	79	11,81	2,29	3,24	1,24	1,49
7	Masculino	40	14,73	2,65	3,68	1,47	1,68
8	Masculino	72	15,52	2,54	3,24	1,64	2,11
9	Masculino	82	14,88	2,63	3,71	1,64	2,05
10	Feminino	78	12,54	2,37	2,34	1,46	1,87

Laringes em que foi confeccionado o retalho bipediculado de mucosa cordal acrescido de mucosa do ventrículo laríngeo

	Sexo	Idade (anos)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura (mm)	Defeito (mm)	Retalho (mm)
1	Masculino	87	17,03	2,3	3,5	2,24	3,24
2	Masculino	78	18,37	2,48	3,14	1,9	2,3
3	Feminino	77	11,7	2,57	2,35	1,78	4,04
4	Feminino	56	12,85	2,72	2,36	1,39	4,07
5	masculino	59	13,26	2,04	3,21	2,04	3,39
6	feminino	95	10,12	2,28	2,87	1,12	3,74
7	Feminino	79	11,15	2,23	3,05	1,12	3,46
8	Feminino	78	12,27	2,34	2,32	1,54	3,32
9	masculino	72	15,56	2,38	3,23	1,74	3,05
10	masculino	82	14,46	2,52	4,07	1,79	2,31

Anexo B - Dados dos cadáveres, dos quais obteve-se as laringes utilizadas para estudo histológico

	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)
1	Masculino	51	77	172
2	Masculino	48	50,8	186
3	Masculino	57	75,4	180
4	Feminino	92	57	172
5	Feminino	86	51	163

9 REFERÊNCIAS

Akst LM, Olds KC, Balicki M, Chalasani P, Taylor RH. Robotic microlaryngeal phonosurgery: Testing of a "steady-hand" microsurgery platform. *Laryngoscope*. 2018;128(1):126-32.

Alipour F, Finnegan EM, Jaiswal S. Phonatory characteristics of the excised human larynx in comparison to other species. *J Voice*. 2013;27(4):441-7.

Behlau M. *Voz - O livro do especialista*. Vol 1. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 247-281.

Birk V, Kniesburges S, Semmler M, Berry DA, Bohr C, Döllinger M, Schützenberger A. Influence of glottal closure on the phonatory process in ex vivo porcine larynges. *J Acoust Soc Am*. 2017;142(4):2197-207.

Bohadana SC. *Vibração das pregas vocais pré e pós aproximação cricótireóidea: estudo experimental em laringes humanas por videoquimografia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Chan RW, Titze IR. Effect of postmortem changes and freezing on the viscoelastic properties of vocal fold tissues. *Ann Biomed Eng*. 2003;31(4):482-491.

Chung D, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R. Upper displacement of the anterior commissure: experimental study of a new phonosurgical approach to raising vocal pitch. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007; 116(6): 462-70.

Courey MS, Gardner GM, Stone RE, Ossoff RH. Endoscopic vocal fold microflap: a three-year experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:267-73.

D'Avila JS, Santos Junior RC, Naves AB. Variação técnica (microcirúrgica) para cisto fistulizado de prega vocal. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 1999;65(2):131-9.

Döllinger M, Kobler J, Berry DA, Mehta DA, Luegmair G, Bohr C. Experiments on analysing voice production: excised (human, animal) and in vivo (animal) approaches. *Curr Bioinform*. 2011;6(3):286-304.

Ferrein M. De la formation de la voix de l'homme. *Histoire de l'Académie Royale des Sciences*. 1741;1:409-32.

Ford CN. Advances and refinements in phonosurgery. *Laryngoscope*. 1999;109(12):1891-900.

Garcia M, Herbst CT. Excised larynx experimentation: history, current developments, and prospects for bioacoustic research. *Anthropol Sci*. 2018;126(1):9-17.

Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope*. 2000;110(5 Pt 1):814-24.

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.

Gray SD. Basement membrane zone injury in vocal nodules. In: Gauffin J, Hammarberg B, editors. *Vocal fold physiology*. San Diego. Singular Publishing Group, 1991. p. 21-7.

Grellet M, Carneiro CG, Aguiar LN, Rosa MO, Pereira JC. Técnica do retalho pediculado para correção do sulco vocal. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2002;68(1):75-9.

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.

Hess M, Hildebrandt MD, Müller F, Kruber S, Kroetz P, Schumacher U, Reimer R, Kammal M, Püschel K, Wöllmer W, Miller D. Picosecond infrared laser (PIRL): an ideal phonomicrosurgical laser? *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(11):2927-37.

Hess MM, Mueller F, Kobler JB, Zeitels SM, Goodyer E. Measurements of vocal fold elasticity using the linear skin rheometer. *Folia Phoniatr Logop.* 2006;58(3):207-16.

Hirano M, Kiyokawa K, Kurita S. Laryngeal muscles and glottic shaping. In: Fujimura O. editor. *Vocal physiology: voice production, mechanisms and functions*. Vol. 2. New York: Raven Press. 1988. p. 49-65.

Hirano M. Morphological structure of the vocal fold. *Folia Phoniatr.* 1974;26:89-94.

Hirano M. Vocal mechanisms in singing: laryngological and phoniatric aspects. *J Voice.* 1988;2:51-69.

Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(5):778-82.

Ishikawa CC. *Efeitos da contração do músculo cricótireóideo na vibração cordal: estudo experimental com videolaringoscopia de alta velocidade* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Isshiki N, Tsuji DH, Sennes LU. Tireoplastias. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia; 1999.

Isshiki N. Phonosurgery: Theory and practice. Tokyo: Springer Verlag, 1989.

Isshiki N. Vocal mechanics as the basis for phonosurgery. *Laryngoscope.* 1998;108(12):1761-6.

Izadi F, Ghanbari H, Zahedi S, Pousti B, Delarestaghi M M, Salehi A. An island flap technique for laryngeal intracordal mucous retention cysts. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2015;27(5):337-42.

Jiang J, Ng J, Hanson D. The effects of rehydration on phonation in excised canine larynges. *J Voice.* 1999;13(1):51-9.

Jotz GP, Stefani MA, Pereira da Costa Filho O, Malysz T, Soster PR, Leão HZ. A morphometric study of the larynx. *J Voice*. 2014;28(6):668-72.

Kooli H, Zhioua A, Zekri S, Najeh D, Jaafoura MH, Ferjaoui M. Histology of the larynx. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2001;122(5):291-4.

Luo R, Kong W, Wei X, Lamb J, Jiang JJ. Development of Excised Larynx. *J Voice*. 2018; pii: S0892-1997(18)30150-4.

Melo ECM, Lemos M, Ximines Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113:2187-91.

Miranda SVV, Mello RJV, Silva HJ. Correlação entre o envelhecimento e as dimensões das pregas vocais. *Ver. CEFAC*. 2011; 13(3): 444-451.

Mobashir MK, Mohamed AERS, Quriba AS, Anany AM, Hassan EM. Linear measurements of vocal folds and laryngeal dimensions in freshly excised human larynges. *J Voice*. 2018;32(5):525-8.

Montes GS. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibers in tissues. *Ci Cult J Braz Ass Adv Sci*. 1992;44:224-33.

Müller J. *Von der stimme und sprache Handbuch der physiologie des menschen für vorlesungen*. Bd. 2. Hölscher: Koblenz, 1984. p. 133-247.

Neligan PC, Buck II DW. *Procedimentos básicos em cirurgia plástica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Netter, FH. Netter atlas de anatomia humana. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

Perazzo PSL, Duprat AC, Lancelotti C, Donati F. Estudo preliminar do comportamento histológico da prega vocal do coelho após injeção de ácido hialurônico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007;73(2):171-8.

Pinheiro TG. *Avaliação da frequência fundamental em laringes humanas excisadas com diferentes extensões de sinéquia glótica anterior* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Ramos HVL, Simões MJ, Pontes PAL, Neves LR, Barbosa LHF, De Biase NG, Oshima CTS. Imunohistoquímica como método de estudo das fibras elásticas em prega vocal humana. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005; 71(4):486-91.

Regner MF, Robitaille MJ, Jiang JJ. Interspecies comparison of mucosal wave properties using high-speed digital imaging. *Laryngoscope*. 2010;120(6):1188-94.

Rosen CA, Simpson B. *Operative techniques in laryngology*. Berlin: Springer, 2008.

Roy N, Merrill RM, Thibeault S, Parsa RA, Gray SD, Smith EM. Prevalence of voice disorders in teachers and the general population. *J Speech Lang Hear Res*. 2004;47(2), 281-93.

Sataloff RT, Spiegel JR, Heuer RJ, Baroody MM, Emerich KA, Hawkshaw MJ, Rosen DC. Laryngeal mini-microflap: a new technique and reassessment of the microflap saga. *J Voice*. 1995; 9(2):198-204

Schwartz SR, Cohen SM, Dailey SH, Rosenfeld RM, Deutsch ES, Gillespie MB, Granieri E, Hapner ER, Kimball CE, Krouse HJ, McMurray JS, Medina S, O'Brien K, Ouellette DR, Messinger-Rapport BJ, Stachler RJ, Strode S, Thompson DM, Stemple JC, Willging JP, Cowley T, McCoy S, Bernad PG, Patel MM. Clinical practice guideline hoarseness (dysphonia). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 141(3 Suppl 2): S1-S31.

Silva AR, Machado Junior AJ, Crespo NA. Anatomical study of minor alterations in neonate vocal folds. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2014;80(4):311-7.

Tsuji DH, et al. Bipedicled vocal fold flap in phonomicrosurgery: case report in 6 patients. In: Congress of Otorhinolaryngology Foundation, 18., 2019, São Paulo. *Int Arch Otorhinolaryngol*. São Paulo: Thieme, 2019. p. S7-S8.

Tsuji, DH. *Tireoplastia tipo I. Estudo experimental da vibração de pregas vocais com videoestroboscopia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.

Van Den Berg J, Tan TS. Results of experiments with human larynxes. *Pract Otorhinolaryngol (Basel)*. 1959;21(6):425-50.

Van Den Berg J. Myoelastic-aerodynamic theory of voice production. *J Speech Hear Res*. 1958;1(3):227-44.

Wening BM. Embryology, anatomy and histology of the larynx and trachea. In: *Autores: Atlas of head and neck pathology*. 3ª ed. Nova Iorque: Elsevier, 2008. p. 651-657.

Wierzbicka M, Sjogren EV, Dikkers FG. What more can be done to popularize phonosurgical ideas in everyday handling of vocal folds? *Otolaryngol Pol*. 2015;69(6):1-6.

Ximenes Filho JA, Melo ECM, Carneiro CG, Tsuji DH, Sennes LU. Correlação entre a altura e as dimensões das pregas vocais. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69(3):371-4.

Zeitels SM, Healy GB. Laryngology and phonosurgery. *N Engl J Med*. 2003;349(9):882-92.

APÊNDICE

Apêndice A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/03/2016, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 056/16 intitulado: "MICRORRETALHO BIPEDICULADO DE MUCOSA CORDAL EM FONOMICROCIRURGIA – ESTUDO EXPERIMENTAL EM LARINGES HUMANAS EXCISADAS" apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji

Pesquisador (a) Executante: Vanessa Mika Kinchoku

CEP-FMUSP, 28 de Março de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa