



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

# AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE EM CADÁVERES HUMANOS

Dissertação de Mestrado

*Deivis de Campos*

Porto Alegre  
2008

Deivis de Campos

# AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE EM CADÁVERES HUMANOS

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz

Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Porto Alegre, março de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Lúcia; pelo Amor..., Carinho... e  
Dedicação... nos momentos mais difíceis.

À minha esposa, Viviane; pelo carinho dedicado, compreensão,  
amor e cumplicidade durante todos estes anos.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Geraldo P. Jotz, definitivamente mais que um orientador, um grande amigo; pela confiança, incentivo, e instrução, desde o princípio desta minha trajetória.
- Ao Prof. Dr. Léder Leal Xavier pela sempre tão valiosa co-orientação; pela sua camaradagem e disposição em ajudar na construção desse trabalho. Agradeço também ao aprendizado e pelo exemplo de profissionalismo.
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Matilde Achaval Elena, por ter me recebido na UFRGS, pelo exemplo de caráter e profissionalismo, aliados a um grande amor pela ciência.
- Aos meus inestimáveis colegas do Laboratório de Anatomia Humana da UNISC: Manoel, Claiison, Rodrigo, Edson, Guilherme, Lucas e Bruno - pelo coleguismo e a camaradagem... Mas, principalmente pela alegria da convivência.
- Aos Funcionários do Departamento Médico Legal de Porto Alegre.
- Às alunas de Iniciação Científica da PUCRS; Thaís, Mariana, Lisiani e Laura pelo auxílio nos procedimentos morfométricos.
- Aos Professores do Laboratório de Anatomia Humana da UNISC, em especial à Prof<sup>a</sup> Leda, ao Prof. Léo, ao Prof. Pedro e à Prof<sup>a</sup> Taís, por terem sido grandes incentivadores.
- À Bióloga Márcia do Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC, pela mais gentil e paciente colaboração em todos os seus ensinamentos nas técnicas histológicas.
- Ao Prof. Alexandre Rieger, pelos seus valiosos ensinamentos em Biofísica, desde a época da graduação.
- Ao Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Ciências Morfológicas do ICBS, UFRGS.
- Aos professores, funcionários e colegas do PPG Neurociências, que fizeram parte da minha formação e que me adicionaram uma visão distinta sobre pesquisa, ciência e vida.

Obrigado!

*“Suba o primeiro degrau com fé. Você não precisa ver a escada inteira, apenas dê o primeiro passo”.*

Martin Luther King Jr.

## RESUMO

Estudos anatômicos prévios demonstram uma assimetria morfológica em termos de comprimento de fibras e diâmetro destas no Nervo Laríngeo Recorrente (NLR). Estas assimetrias provavelmente estão relacionadas aos diferentes tempos de chegada do impulso nervoso à musculatura laríngea controlada por cada NLR. Conhecer as diferenças morfológicas entre os nervos direito e esquerdo poderá fornecer subsídios para elucidar os motivos pelos quais tais diferenças não afetam na função simétrica da musculatura laríngea. O objetivo desta investigação é estimar alguns parâmetros morfométricos como a área intraperineural; perímetro intraperineural; área; perímetro; densidade (número de fibras/mm<sup>2</sup>) e o número total de fibras do NLR direito e esquerdo de humanos. Os nervos direito e esquerdo foram coletados em oito cadáveres do sexo masculino. Os nervos foram seccionados em parafina e corados com Hematoxilina-eosina. Todos os parâmetros morfométricos foram medidos a partir de imagens digitalizadas com o auxílio do software Image Pro-Plus 4.1.; sendo estas, obtidas de secções histológicas (10 µm) da parte distal do NLR (de ambos os lados). Nenhuma diferença estatística foi observada com relação à área intraperineural; perímetro intraperineural; densidade (número de fibras/mm<sup>2</sup>) e número total de fibras entre ambos os lados. Porém, a área e o perímetro de fibras do lado direito são estatisticamente maiores quando comparadas com o lado esquerdo, 21 e 11%, respectivamente. Nossos resultados são congruentes com estudos eletrofisiológicos prévios do NLR, demonstrando haver uma diferença morfológica entre os nervos direito e esquerdo; podendo esta ser a fundamentação morfológica para explicar a diferença na velocidade de condução do impulso nervoso à musculatura intrínseca da laringe, controlada

por cada nervo.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Preparação do Tecido para Histologia.....	15
3.2 Considerações Éticas.....	16
3.3 Avaliação Morfométrica.....	18
3.3.1 Quantificação da área e perímetro intraperineural total do NLR (PONTO 1).....	18
3.3.2 Quantificação do número de fibras nervosas do NLR (PONTO 1).....	19
3.3.3 Quantificação da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 1).....	19
3.3.4 Quantificação da área e perímetro intraperineural total do NLR (PONTO 2).....	23
3.3.5 Quantificação do número de fibras nervosas do NLR (PONTO 2).....	23
3.3.6 Quantificação da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 2).....	24
<b>4 ARTIGO.....</b>	<b>28</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>56</b>

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. (A) Nervo Laríngeo Recorrente direito; (B) Nervo Laríngeo Recorrente esquerdo; (C) Nervo Vago direito; (D) Nervo Vago esquerdo; (E) Artéria Subclávia e (F) Arco da Aorta.....5
- Figura 2. Representação esquemática da variabilidade no trajeto do segmento distal esquerdo do NLR, se aproximando da junção cricotireóidea.....7
- Figura 3. Laringe.....15
- Figura 4. Representação esquemática da metodologia histológica utilizada para avaliação morfométrica do NLR, em dois pontos de seu segmento em diferentes secções<sup>ABCD</sup>, bilateralmente.....17
- Figura 5. Fotomicrografia de secção transversal do NLR (PONTO 1).....17
- Figura 6. Delineamento (círculo azul) intraperineural para obtenção da área e perímetro intraperineural do NLR (PONTO 1).....20
- Figura 7. Cada quadrante (azul) representa um campo com área de  $1860 \mu\text{m}^2$ , usado para quantificar o número de fibras nervosas (PONTO 1).....20
- Figura 8. Delineamento de cinco fibras (círculos azuis) para obtenção da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 1).....20

Figura 9. Delineamento (círculo vermelho) intraperineural para obtenção da área e perímetro intraperineural do NLR (PONTO 2).....25

Figura 10. Cada quadrante (vermelho) representa um campo com área de  $1860 \mu\text{m}^2$ , usado para quantificar o número de fibras nervosas (PONTO 2)....25

Figura 11. Delineamento de cinco fibras (círculos vermelhos) para obtenção da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 2).....25

## ARTIGO

Figure 1. Schematic representation showing the region of the RLN that was studied in different sections (A to H), bilaterally.....43

Figure 2. Digitized images of sections of the RLN.....44

Figure 3. Comparison of intraperineural area (A); intraperineural perimeter (B); area (C); perimeter (D); density (E) and total number (F) of fibers between the right (R) and the left (L) RLN.....45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comprimento médio do NLR em diferentes espécies.....5

Tabela 2. Área, perímetro intraperineural e número de fibras do NLR (PONTO 1) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.....21

Tabela 3. Valores obtidos para área e perímetro das fibras do NLR (PONTO 1) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.....22

Tabela 4. Área, perímetro intraperineural e número de fibras do NLR (PONTO 2) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.....26

Tabela 5. Valores obtidos para área e perímetro das fibras do NLR (PONTO 2) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.....27

## ARTIGO

Table 1. Table showing the parameters of the subjects.....46

Table 2. The Pearson correlation coefficient (r) between the parameters, the

significant correlation is presented in bold.....47

## 1 INTRODUÇÃO

---

O nervo Vago, foi descrito por Marinus, no ano de 100 d.C., pela primeira vez. A denominação de Vagus foi dada por Domenico de Marchetti (1626-1688) da Universidade de Pádua, que reescreveu o nervo, dividindo-o em 16 partes. Tudo indica que Marchetti estudou as variações do trajeto do nervo e seus ramos, por isto o nome de Vagus, que em Latim significa errante, incerto, inconstante, confuso e desordenado (SKINNER, 1961).

Em 1807 o anatomista francês François Chaussier, chamou o então nervo Vago, de *Pneumogastrique* (Pneumogástrico, em Português). Referência a ser um nervo de pulmão e estômago. Pela atual terminologia anatômica da Federação Internacional de Associação de Anatomistas, optou-se pela terminologia de nervo Vago e não Pneumogástrico (REZENDE, 1992).

Zemlin (2000) referia que o nervo Vago (X par craniano) foi assim denominado devido ao seu trajeto errático, apresentando extensa distribuição de ramos nervosos através do pescoço e do tórax, estendendo-se até a cavidade abdominal. O nervo Vago emerge do crânio através do forame jugular, onde apresenta duas dilatações, os gânglios jugular (superior) e nodoso (inferior), tendo uma porção sensitiva, que inerva a dura-máter, a pele da parte posterior da orelha externa e o meato acústico externo, e uma porção motora, onde emite ramos faríngeo-esofágicos, laríngeos (ramos sensitivos e motores), ramos que inervam o pericárdio, o estômago, o pâncreas, o baço, os rins, o intestino e o fígado.

O gânglio jugular é arredondado e com cerca de 4 mm de diâmetro. O gânglio inferior é maior e alongado, medindo cerca de 25 mm de comprimento

e cerca de 5 mm de largura, no máximo (WILLIAMS et al., 1995). De acordo com Schnitzlein e colaboradores (1958) o nervo Vago do ser humano contém, no nível médio cervical, cerca de 16.500 fibras mielinizadas no lado direito e 20.000 no lado esquerdo, contadas em 17 pares de nervos.

Dentre os 12 pares de nervos cranianos, o nervo Vago (X), apresenta uma miríade de funções sensitivas e motoras que incluem sensibilidade somática e visceral (MARTIN, 1998), é o principal nervo da divisão craniana do parassimpático, innervando todas as vísceras torácicas e abdominais. Boa parte da sensibilidade dessas vísceras, bem como a da laringe, viaja por este nervo. O Vago é ainda um nervo motor para a laringe, onde é importante para os mecanismos da fonação (COSENZA, 1990).

O Vago desce no interior da bainha carótica, entre a veia jugular interna e, sucessivamente, as artérias carótidas interna e comum. Na base do pescoço, os Vagos direito e esquerdo, têm trajetos diferentes: o direito passa anteriormente à 1ª porção da artéria subclávia e o esquerdo situa-se entre a artéria carótida comum e a 1ª porção da artéria subclávia (GARDNER et al., 1988; DANGELO & FATTINI, 1998).

Ao longo de seu extenso trajeto, o X par emite numerosos ramos colaterais que, de acordo com as regiões de distribuição, classificam-se em (GARDNER et al., 1988; DANGELO & FATTINI, 1998; MACHADO, 1998; SOBOTTA, 2000):

1. O **ramo meníngeo**: origina-se do gânglio superior, é sensitivo e inerva a dura-máter da fossa craniana posterior.
2. O **ramo auricular**: origina-se do gânglio superior e recebe uma comunicação do nervo Glossofaríngeo (IX par craniano). É sensitivo e emerge

do crânio na fissura tímpano-mastóidea para inervar a superfície craniana da orelha externa, o assoalho do meato acústico externo e a membrana do tímpano.

3. Os **ramos faríngeos**: as fibras nervosas que os constituem são motoras e pertencem, na verdade ao nervo Acessório (XI par craniano), cuja raiz bulbar se acola ao Vago logo abaixo do gânglio inferior. Os ramos faríngeos participam, com ramos do nervo Glossofaríngeo e do simpático, da formação do plexo faríngeo que inerva os músculos da faringe (com exceção do estilofaríngeo) e do palato mole (exceto o músculo tensor do véu palatino). Os ramos faríngeos passam entre as artérias carótida interna e externa.

4. O **nervo laríngeo superior (NLS)**: está constituído de fibras nervosas do nervo Acessório e do Vago. Passa posterior e medialmente às artérias carótidas, externa e interna e divide-se em dois ramos:

a) **ramo interno**: é sensitivo e constituído por fibras nervosas do Vago. Em companhia da artéria tireóidea superior (ATS) perfura a membrana tireo-hióidea e inerva a mucosa da laringe desde a epiglote e porção posterior da língua até as pregas vocais.

b) **ramo externo**: é motor, constituído por fibras nervosas do nervo Acessório e também chamado nervo laríngeo externo, situa-se profundamente à artéria tireóidea inferior (ATI) e inerva o músculo constritor inferior da faringe (MCIF) e o cricotireóideo (da laringe).

5. Os **ramos caróticos**: são inconstantes e auxiliam o nervo Glossofaríngeo na inervação do seio e corpo caróticos.

6. Os **ramos cardíacos**: em número variável, nascem do Vago no pescoço e no tórax e se dirigem para o coração onde participam da formação do plexo

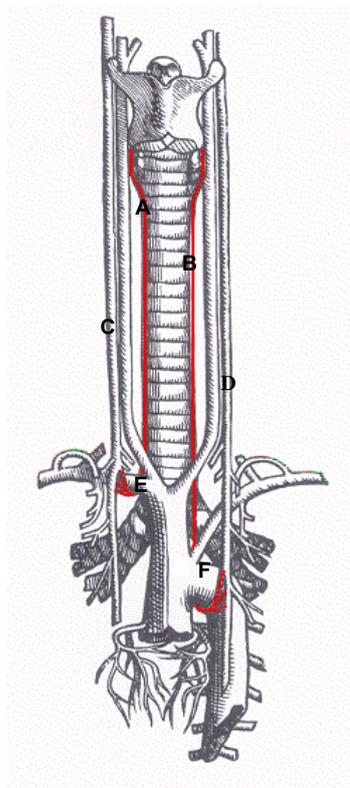
cardíaco com os ramos cardíacos do tronco simpático.

7. O **nervo laríngeo recorrente (NLR)**: abaixo do gânglio inferior, o Vago recebe o ramo interno do nervo Acessório, cujas fibras se distribuem juntamente com os ramos do Vago, formando o NLR, citado como um nervo predominantemente motor mais importante da laringe. Inerva a mucosa da laringe abaixo das pregas vocais (sensitivo) e todos os músculos intrínsecos da laringe (motor), com exceção do cricotireóideo. Sendo importante, por esta razão, no mecanismo da fonação. Sua origem é diferente à direita e à esquerda. O nervo direito origina-se anteriormente à primeira parte da artéria subclávia e passa em torno deste vaso. O nervo esquerdo origina-se no tórax, sobre o lado esquerdo do arco da aorta, e passa em torno deste vaso atrás da inserção do ligamento arterioso. Ambos os nervos recorrentes ascendem no interior do sulco traqueoesofágico, penetrando na laringe (Figura 1).

Tais diferenças macroscópicas são de tamanha complexidade que Alves (1965), descreve o NLR direito como um nervo cervical e o esquerdo, como um nervo cérvico-torácico. Uma disposição que se correlaciona com o desenvolvimento dos arcos aórticos no embrião. Antes de penetrar na laringe, o NLR geralmente se divide em dois ou mais ramos (GARDNER et al., 1988):

**1) Ramos colaterais do NLR:** a) ramos cardíacos médios: terminam no plexo cardíaco; b) ramos esofágicos; c) ramos traqueais; d) ramos faríngeos, para o MCIF; e e) ramo comunicante com o gânglio cervical inferior.

**2) Ramos terminais do NLR:** a) ramos musculares: distribuem-se para os músculos cricoaritenóideo lateral, tireoaritenóideo, cricoaritenóideo posterior e ariaritenóideo; b) ramo comunicante com o nervo laríngeo superior.



**Figura 1** – (A) Nervo Laríngeo Recorrente direito; (B) Nervo Laríngeo Recorrente esquerdo; (C) Nervo Vago direito; (D) Nervo Vago esquerdo; (E) Artéria Subclávia e (F) Arco da Aorta. Modificada de *De humani corporis fabrica epítome: tabulae sex*. Quarto livro, gravura 52, figura 2. (Vesalius, 2002).

De acordo com Harrison (1981), a evidente diferença entre o comprimento do NLR direito e esquerdo, é também encontrada em outras espécies (Tabela 1).

**Tabela 1** – Comprimento médio do NLR em diferentes espécies.

Espécie	NLR (esquerdo)	NLR (direito)	Diferença
<b>Humanos</b>	42.6 cm	32.2 cm	10.4 cm
<b>Girafa</b>	2 m	1.7 m	30 cm
<b>Cães</b>	38.2 cm	21.5 cm	16.7 cm

(Extraído de Harrison, 1981).

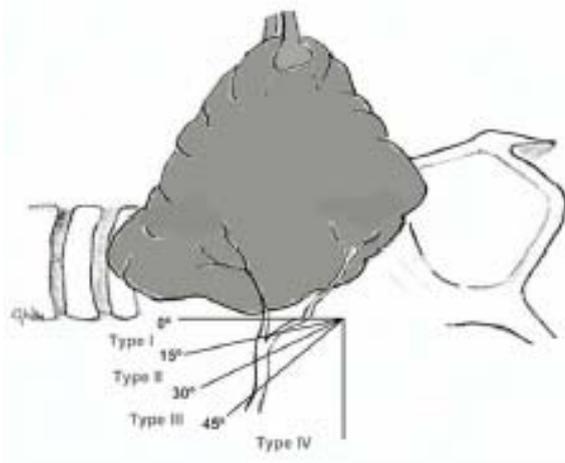
O NLR nem sempre se situa em uma posição protegida no sulco traqueoesofágico, mas pode estar ligeiramente anterior a ele (mais freqüentemente no lado direito) e pode ser acentuadamente lateral à traquéia no nível da parte inferior da glândula tireóide. No lado direito, o nervo está igualmente muitas vezes anterior, ou posterior ou entremeado com os ramos terminais da artéria tireóidea inferior, enquanto, no lado esquerdo, geralmente está posterior à artéria, embora ocasionalmente anterior a ela (WILLIAMS et al., 1995).

Em um estudo sobre a relação anatômica do NLR com a ATI Yalcxin (2006), usando 50 laringes humanas (100 lados), descreve a alta variabilidade da relação entre o NLR e a ATI, descrevendo 20 diferentes padrões de variabilidade. De acordo com seu estudo, a incidência da configuração anatômica difere completamente em ambos os lados; sendo que no lado esquerdo a localização mais freqüente do principal tronco do NLR, encontra-se posterior a ATI, e no lado direito situa-se anteriormente a ATI.

A direção pela qual o NLR se aproxima da junção cricotireóidea, também é de extrema variabilidade. Shindo e colaboradores (2005) classificam este trajeto em 4 diferentes categorias:  $\leq 15^\circ$  (Tipo I);  $> 15^\circ$  e  $\leq 30^\circ$  (Tipo II);  $> 30^\circ$  e  $\leq 45^\circ$  (Tipo III); e  $> 45^\circ$  (Tipo IV) (Figura 2). Estes autores realizaram 278 disseções: 149 direitas e 129 esquerdas. Dos 149 nervos do lado direito, 49% foram tipo II, 28.9% foram do tipo III, 17.4% foram tipo I, e 4.7% foram tipo IV. Similarmente ao lado direito, o trajeto mais comum do nervo esquerdo é do tipo II, com 50.4% demonstrando este padrão. O segundo e terceiro tipo mais comum do nervo esquerdo foi tipo I (26.4%) e tipo III (20.9%), respectivamente, o qual difere a partir da distribuição do lado direito. Somente 2.3% do nervo

esquerdo foi do tipo IV.

Os nervos da laringe são fornecidos por dois ramos do nervo Vago: NLS e NLR (MOORE & DALLEY, 2001), este último, o NLR, inerva a quase totalidade da musculatura intrínseca da laringe, donde sua grande importância na patogenia dos distúrbios da mobilidade. Portanto, em última análise, já é evidente que a origem, o comprimento, o trajeto e as relações deste importante ramo da parte cervical do nervo Vago variam segundo o lado considerado, motivo pelo qual devem ser estudados separadamente (FIGÚN & GARINO, 1994).



**Figura 2** – Representação esquemática da variabilidade no trajeto do segmento distal esquerdo do NLR, se aproximando da junção cricotireóidea. (Extraído de Shindo et al., 2005).

A paralisia do NLR frequentemente resulta de câncer (25%) e lesão durante cirurgia da tireóide, porção cervical do esôfago, coração e pulmões (20%). Devido ao seu maior trajeto no pescoço, as lesões do NLR esquerdo são muito mais comuns do que as do direito (MCMINN, 1990). Em geral, nos seres humanos, o NLR esquerdo é de 7 a 10 vezes mais afetado do que o direito (CUNNING, 1955).

Verificou-se que as causas mais citadas de lesão ao NLR são doenças

malignas (tumores esofágicos, tumores centrais, de tireóide e de mediastino), tumores benignos (centrais ou periféricos), traumas cirúrgicos (em ressecções cricotraqueais, tireoidectomias e outras), trauma por intubação, doenças inflamatórias, doenças sistêmicas e alterações idiomáticas (FAWCUS 1992; BROWN et al., 1996; CAVANAUGH & PARK, 2000; PROCACCIANTE et al., 2000).

De acordo com Crary e Glowaski (1996), dentre essas causas citadas, os traumas cirúrgicos são freqüentemente reconhecidos como uma das principais etiologias de lesão do NLR. Segundo esses autores, a cirurgia da glândula tireóide é o procedimento cirúrgico mais comum que resulta em paralisia de pregas vocais. Ressecções de pulmão, dissecações radicais de pescoço e/ou cirurgias da artéria carótida também podem resultar em danos a vários ramos do nervo vago contribuindo para paralisias de prega vocal. Cirurgias do esôfago cervical e abordagens cervicais para região anterior das vértebras cervicais podem causar dano de tração ao NLR.

Navarro e colaboradores (2003) comentam que a complexa inervação da laringe tem motivado o aparecimento de um grande número de pesquisas, em especial àquelas relacionadas ao NLR, definido na literatura como sendo um dos mais importantes ramos do nervo Vago, devido as suas relações anatômicas e funcionais.

Périé e colaboradores (1998) relataram que na lesão neural (paralisia unilateral do NLR e ou do nervo Vago), a prega vocal estaria usualmente fixada na posição paramediana na hemilaringe afetada. Ainda descreveram que, os principais sintomas dessa alteração seriam a disfonia, a diplofonia, a rouquidão e a soprosidade.

O NLR, em particular, tem recebido muita atenção devido a sua seqüela pós-operatória imediata. Danos a este nervo podem causar paralisia das pregas vocais e disfonia conseqüente, de forma permanente ou transitória (ESTRELA, 2005).

A morfometria do nervo Vago em humanos demonstra que a área do corte transversal e o perímetro dos axônios mielinizados sofrem uma significativa diminuição com a idade, apesar do número total de axônios permanecer o mesmo (LU et al., 2001).

Em um estudo sobre a morfometria do NLR Nakai e colaboradores (2000), descrevem que ao longo do processo de envelhecimento humano, ocorrem significativas mudanças na ultra-estrutura das fibras nervosas. O mesmo autor ressalta ainda que é a primeira vez que houve um estudo nesse sentido.

Sunderland e Swaney (1952) descreveram as variações na perda do tecido conjuntivo epineural ao redor dos fascículos do NLR direito, ao longo de seu comprimento em 4 cadáveres humanos. As medidas revelaram que aproximadamente 23 – 33% do nervo estão preenchidos por fascículos nervosos, no nível inferior ao músculo constritor inferior da faringe. Acima do músculo MCIF, o NLR apresenta uma área de secção contendo somente 10 – 15% de fascículos nervosos. A ramificação mais baixa do NLR, que supre o esôfago, traquéia e o MCIF, apresenta uma área de secção com 67% ocupada por fascículos nervosos.

Malmgren e Gacek (1981), medindo a quantidade de fascículos e tecidos epineurais ao redor do NLR, direito e esquerdo, em 28 indivíduos que passaram por laringectomia, verificaram que a quantidade de tecido epineural

é de 70 – 90% em secção através do nervo. O número de fascículos nervosos presente dentro desta secção pode variar de 1 a 11. Os autores não descrevem os componentes do tecido epineural, mas as largas proporções destes tecidos indicam uma função protetora do nervo. Este estudo foi restrito a porção distal do nervo ao nível da cartilagem cricóide.

Tiago e colaboradores (2002) descrevem alguns estudos em que a avaliação morfométrica do NLR do lado esquerdo apresenta uma predominância das fibras mielínicas de maior diâmetro, quando comparada com o lado direito, e que isso pode estar relacionado a uma velocidade de condução mais rápida do impulso nervoso já que este nervo possui um trajeto mais longo. Os mesmos autores também descrevem outros estudos onde não são encontradas diferenças nas frequências das fibras mielínicas no NLR quando comparados os dois lados.

Moore e Dalley (2001) e Gardner e colaboradores (1988), ressaltam que os músculos intrínsecos da laringe possuem ação combinada em seus movimentos, ou seja, estes grupos musculares não podem ser contraídos voluntariamente de um só lado (Machado, 1998). Tais descrições sugerem que o NLR, direito e esquerdo, apesar de possuir assimetria, tanto nas suas origens, quanto em suas formas, desempenham uma ação orquestrada nos músculos intrínsecos da laringe.

De um modo geral, a literatura carece de comentários que esclareçam como os NLR, direito e esquerdo, mesmo possuindo origens e comprimentos distintos (DANGELO & FATTINI, 1998), possam controlar de forma simétrica os músculos responsáveis pela fonação.

A aplicação de novas tecnologias na cirurgia da glândula tireóide, aliada

à visualização intra-operatória dos nervos da laringe tem permitido uma significativa redução da paralisia laríngea pós-operatória (THOMUSCH et al., 2003). O sucesso para o uso adequado destes métodos ainda depende do conhecimento minucioso da inervação laríngea (KRUSE et al., 2006).

Recentes estudos utilizando histoquímica e microscopia tem fornecido novos entendimentos a cerca da inervação laríngea, bem como, o surgimento de novas teorias, que sustentam novas reformulações, acerca da distribuição das fibras sensoriais e motoras da laringe (MARANILLO et al., 2005).

Diversos autores, entre eles Navarro e colaboradores (2003), comentam que os estudos correlacionados à histologia com a clínica se fazem necessários para confirmação ou nova formulação de teorias que acarretem modificações do comportamento vocal (disfonia) e do processo de deglutição (disfagia) observadas na Clínica Otorrinolaringológica e de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (ESTRELA, 2005).

Navarro e colaboradores (2003), também chamam atenção para a importância do uso de tecidos humanos na pesquisa científica, citando que tais procedimentos permitem a detecção de alterações inerentes ao processo de envelhecimento que não conseguimos detectar quando utilizamos modelos animais com período de sobrevivência relativamente curto. A avaliação histológica de nervos sensoriais em outras espécies (ratos) não evidencia diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas diferentes faixas etárias. O mesmo estudo na espécie humana, que apresenta uma sobrevivência maior, já detecta algumas diferenças.

A complexa inervação da laringe, aliada as dificuldades na comprovação funcional dos ramos nervosos para a laringe, tem motivado o

surgimento de um vasto número de pesquisas, especialmente àquelas relacionadas ao NLR, definido na literatura como um dos mais importantes ramos do nervo Vago. Sabe-se que lesões do NLR, por cirurgias de pescoço, traquéia, esôfago ou coração, acarretam em modificações do comportamento vocal (disfonias) e do processo de deglutição (disfagia). Considerando a importância deste nervo no que se refere ao controle do mecanismo da fonação, torna-se imprescindível seu conhecimento histomorfológico, que proporciona mais segurança nos procedimentos cirúrgicos, próximo a esta via nervosa (BARKMEIER & LUSCHEI, 2000).

Embora existam diversos estudos descrevendo a anatomia macroscópica (SCHWEIZER, 1997); vascular (MOREAU et al., 1998); clínica (PREMACHANDRA et al., 1990); junção neuromuscular (GAMBINO et al., 1990); alterações morfológicas com o processo de envelhecimento (NAKAI et al., 2000) em relação ao NLR, há uma relevância clínica e/ou fisiológica muito grande em se avaliar o padrão histomorfológico do NLR, bilateralmente.

A avaliação morfométrica no NLR, direito e esquerdo, poderia enriquecer a literatura da neurobiologia da voz, bem como possuir uma grande aplicabilidade clínica, uma vez que poderá elucidar os motivos pelos quais tais diferenças morfológicas nos nervos não afetam na função simétrica da musculatura intrínseca da laringe. E ainda as dificuldades na comprovação funcional dos ramos nervosos para a laringe tornam este assunto extremamente intrigante e desafiador para o pesquisador que pretenda ingressar em este campo.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo Geral

-Estudar a morfometria do Nervo Laríngeo Recorrente direito e esquerdo, em cadáveres humanos, através da microscopia óptica e métodos morfométricos.

### 2.2 Objetivos Específicos

-Avaliar a morfometria de ambos os Nervos Laríngeos Recorrentes, a fim de verificar se o padrão histológico é ou não semelhante, bilateralmente.

-Analisar as reais diferenças morfológicas que poderiam explicar a função simétrica desempenhada na musculatura responsável pela fonação humana, através da aferição e quantificação dos seguintes dados morfométricos: **(1) área e (2) perímetro de secção transversal intraperineural, (3) área e (4) perímetro das fibras nervosas, (5) densidade das mesmas, (6) número total de fibras nervosas e a (7) correlação destes parâmetros morfológicos com outros parâmetros dos indivíduos como a idade, o peso, a altura e o Índice de Massa Corporal (IMC).**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

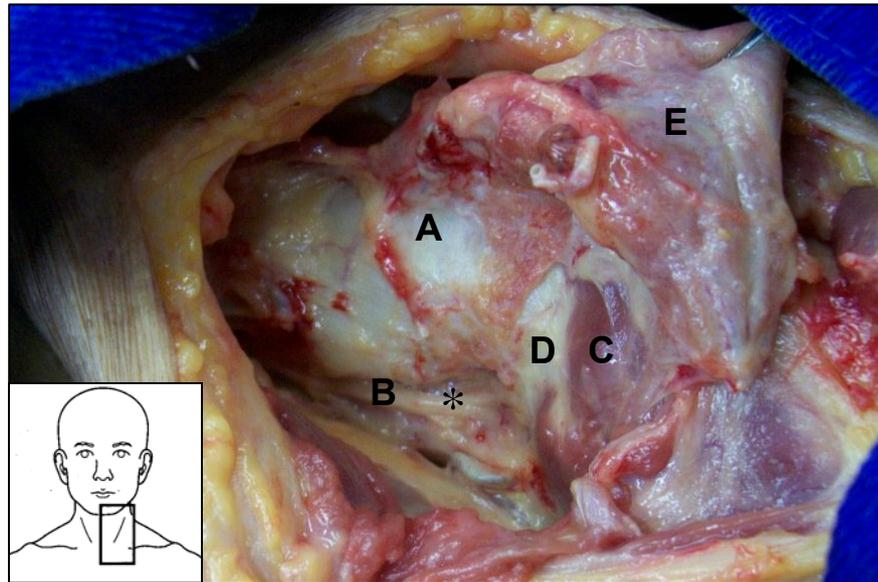
Para este estudo, foram utilizados oito cadáveres adultos do sexo masculino com idade superior a 18 anos, que sofreram óbito por causas extracervicais e com menos de 24 horas *post-mortem*, todos provenientes do Departamento Médico Legal (DML) de Porto Alegre – RS. Através da ficha de óbito, foram obtidas informações pregressas dos cadáveres, sendo utilizado como critério de exclusão, indivíduos portadores de disfunções que poderiam influenciar nos resultados.

Para iniciar o processo de dissecação da região cervical, o tecido dessa região foi previamente lavado com ácido acético e o cadáver era colocado em posição de hiperextensão cervical. Realizou-se uma incisão cervical longitudinal seguindo a linha da necropsia, abrindo-se as estruturas plano a plano. A dissecação do NLR se estendeu profundamente em direção ao seu ponto de entrada na laringe (junção cricótireóidea).

Após, realizada a dissecação, o NLR foi marcado com tinta preta da marca Nankin<sup>®</sup>, 1 cm antes de entrar na laringe, nível da borda inferior da 3<sup>a</sup> cartilagem traqueal, em ambos os lados. Depois de realizada a marcação; foi extraído um fragmento de 2,5 cm de seu segmento previamente marcado, bilateralmente (Figura 3).

Os fragmentos foram cortados para avaliação morfométrica em dois pontos: **(PONTO 1)** um cm antes de penetrar na laringe (marcação) e **(PONTO 2)** um cm abaixo do ponto de marcação, nível da borda inferior da 5<sup>a</sup> cartilagem traqueal; em ambos os pontos foram feitas quatro secções<sup>ABCD</sup> cada uma com espessura de 10 µm. Os intervalos entre as secções representam

100 µm em ambos os pontos, bilateralmente (Figura 4).



**Figura 3** - Laringe. Dissecção profunda da região ântero - lateral esquerda. A, traquéia; B, NLR; C, músculo cricotireóideo; D, cartilagem cricóide; E, glândula tireóide rebatida e o ponto de marcação do NLR para avaliação morfométrica (\*).

### **3.1 Preparação do Tecido para Histologia**

No preparo do tecido para microscopia óptica, foram obedecidas as seguintes etapas:

#### **1ª Etapa: Coleta do Material**

O material coletado foi lavado em soro fisiológico.

#### **2ª Etapa: Fixação**

Os fragmentos dos nervos foram imediatamente colocados em frascos individuais, identificados, com solução fixadora Bouin (ácido pícrico – ácido acético – formalina) por 24 horas.

### **3ª Etapa: Tratamento pós-fixação - Desidratação**

Os fragmentos dos nervos foram colocados em água corrente durante 24 horas. Posteriormente, o material foi transferido para as seguintes concentrações crescentes de etanol: 50%, 70%, 80%, 90% e 100%.

### **4ª Etapa: Diafanização**

Dois banhos de xilol (15 minutos cada).

### **5ª Etapa: Impregnação em parafina**

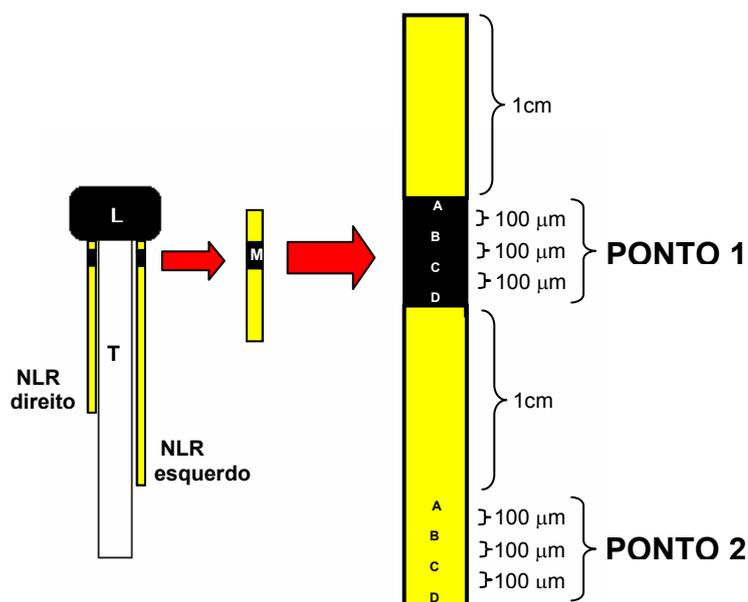
O material permaneceu durante 3 horas em parafina líquida (aproximadamente 56°C).

Os blocos obtidos após a impregnação em parafina foram aparados e cortados em micrótomo rotativo da marca Leica<sup>®</sup>, modelo RM2125RT na espessura de 10 µm. Em seguida as seções foram colocadas em lâminas de vidro previamente albuminizadas, secadas e coradas pelo método convencional de hematoxilina-eosina.

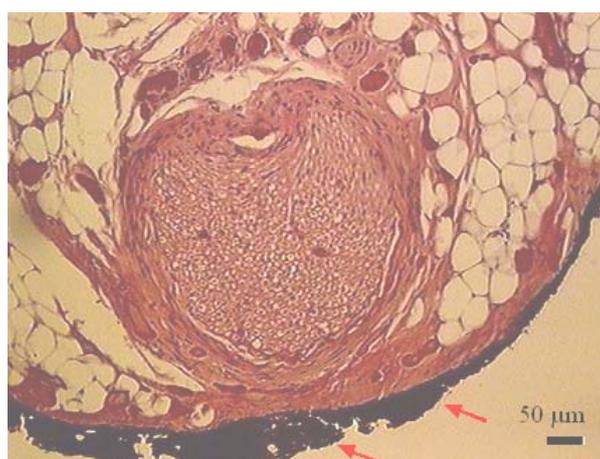
## **3.2 Considerações Éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (ANEXO A). Encontram-se em anexo o modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) que foi assinado, em duas vias, um pelo responsável familiar do sujeito, e outro, na ausência deste último, pela autoridade legal responsável

pelo sujeito, respeitando os preceitos da Lei, principalmente no que diz respeito aos princípios de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça, equidade e sigilo. A amostra foi composta exclusivamente por indivíduos sob a responsabilidade legal do DML.



**Figura 4** – Representação esquemática da metodologia histológica utilizada para avaliação morfológica do NLR em dois pontos de seu segmento em diferentes secções<sup>ABCD</sup>, bilateralmente. O **PUNTO 1** situa-se a nível da borda inferior da 3<sup>a</sup> cartilagem traqueal e o **PUNTO 2** a nível da borda inferior da 5<sup>a</sup> cartilagem traqueal. L, Laringe; T, Traquéia; M, Marcação.



**Figura 5** – Fotomicrografia de secção transversal do NLR (PUNTO 1). Detalhe para os resquícios da marcação com tinta preta Nankin® (setas).

### **3.3 Avaliação Morfométrica**

Todos os procedimentos da avaliação morfométrica foram realizados no Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As secções histológicas foram avaliadas em microscópio de luz da marca Nikon®, modelo Eclipse E600, com objetiva de 10 e 40x e aumento final de 100 e 400x, respectivamente; acoplado ao Software Image-Pro Plus 4.1.

Para que fosse garantida a padronização bilateral da análise morfométrica do NLR (PONTO 1), foram consideradas apenas as secções histológicas que apresentavam resquícios da marcação (tinta preta) agregada ao tecido epineural (Figura 5).

#### **3.3.1 Quantificação da área e perímetro intraperineural total do NLR (PONTO 1):**

Para obter as medidas da área e perímetro do nervo, as imagens foram digitalizadas (10x); sendo avaliadas quatro secções por lâmina (nervo), bilateralmente (Ver Tabela 2). O procedimento utilizado para a aferição destas medidas foi através do delineamento intraperineural do NLR, a partir das imagens digitalizadas (Figura 6). No software IPP 4.1 foi obtido o valor da área e perímetro intraperineural total do NLR. A estimativa da área intraperineural foi utilizada para o cálculo da densidade e número total de fibras do nervo.

### **3.3.2 Quantificação número de fibras nervosas do NLR (PONTO 1):**

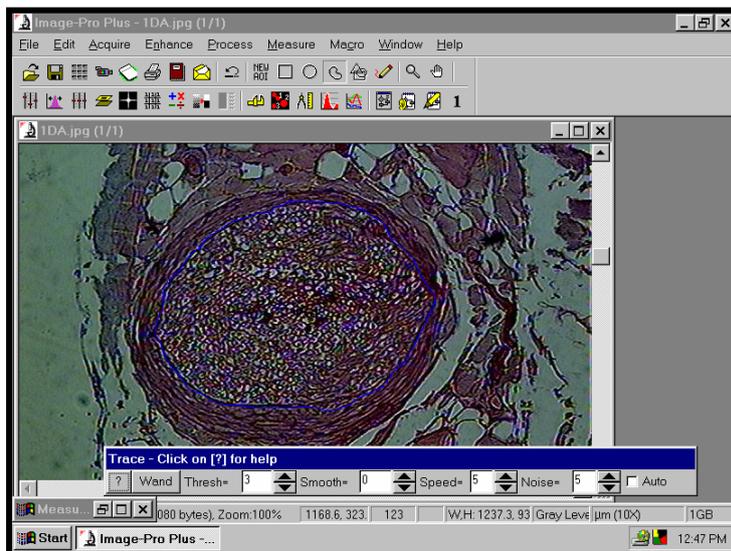
As imagens do nervo foram digitalizadas (40x). Foram avaliados quatro campos por secção, com área do campo de  $1860 \mu\text{m}^2$  (Ver Tabela 2); os campos foram sobrepostos na parte superior, inferior, esquerda e direita da área intraperineural do NLR. Para evitar erro de amostragem, foram incluídas as fibras localizadas sobre as linhas superior e esquerda e excluídas as fibras localizadas sobre as linhas inferior e direita que delimitavam o campo (Figura 7). A densidade e o número total de fibras contadas puderam ser obtidos através das seguintes equações:

**Densidade de fibras** = número total de fibras contadas / área do campo X número de campos analisados

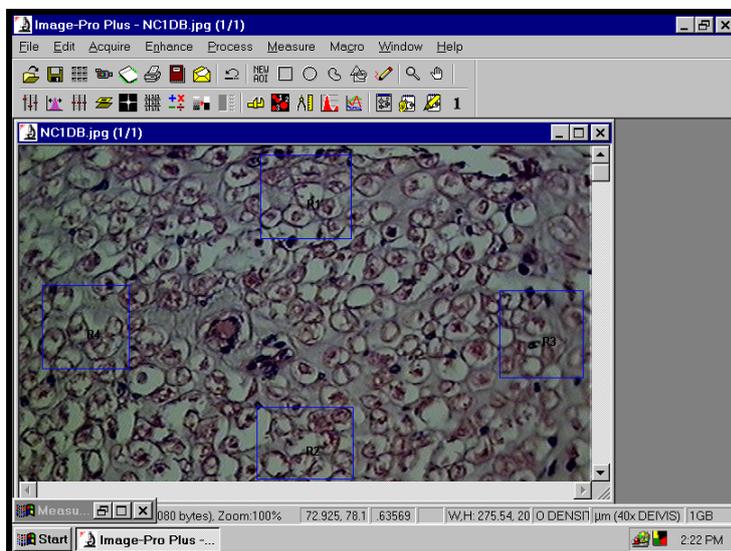
**Número total de fibras** = densidade de fibras X área intraperineural estimada

### **3.3.3 Quantificação da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 1):**

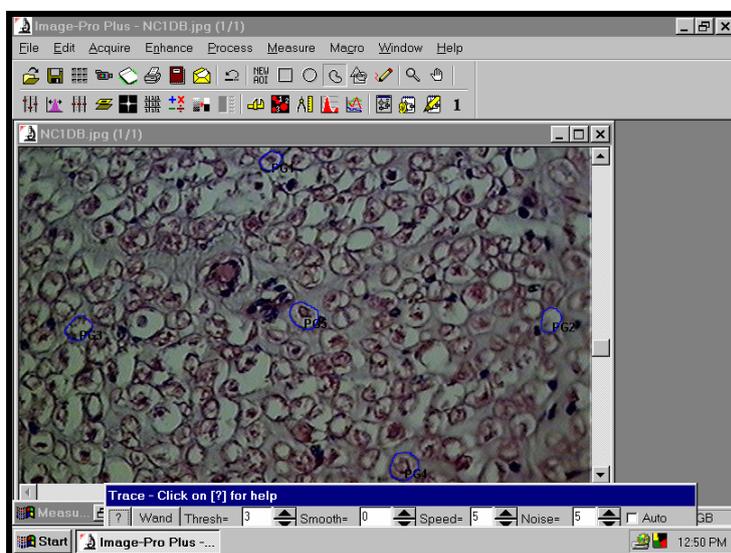
Para obter as medidas da área e perímetro das fibras, as imagens foram digitalizadas (40x); sendo avaliadas cinco fibras por secção. Foram escolhidas para a avaliação das medidas as fibras situadas na parte superior central, inferior central, esquerda central, direita central e o centro do NLR (área intraperineural). O procedimento utilizado para a aferição destas medidas foi através do delineamento das fibras (Figura 8). Assim como na aferição da área e perímetro intraperineural total do NLR, foi possível obter o valor da área e perímetro das fibras do NLR (Ver Tabela 3).



**Figura 6** – Delineamento (círculo azul) intraperineural para obtenção da área e perímetro intraperineural do NLR (PONTO 1). Aumento de 10x.



**Figura 7** – Cada quadrante (azul) representa um campo com área de  $1860 \mu\text{m}^2$ , usado para quantificar o número de fibras nervosas (PONTO 1). Aumento de 40x.



**Figura 8** - Delineamento de cinco fibras (círculos azuis) para obtenção da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 1). Aumento de 40x.

**Tabela 2** – Área, perímetro intraperineural e número de fibras do NLR (**PONTO 1**) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.

Secção (NLR)	Área intraperineural ( $\mu\text{m}^2$ )				Perímetro intraperineural ( $\mu\text{m}$ )				Número de fibras			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1 D	204667.4	206266.8	213863.9	226197.6	2010.10	1986.910	2090.445	2133.028	Q1 11 Q2 10 Q3 11 Q4 12	Q1 10 Q2 11 Q3 10 Q4 11	Q1 10 Q2 10 Q3 12 Q4 12	Q1 11 Q2 11 Q3 11 Q4 10
1 E	42318.34	39050.37	39938.49	41114.96	981.3437	871.3280	868.7521	884.3548	Q1 14 Q2 15 Q3 14 Q4 12	Q1 12 Q2 14 Q3 13 Q4 13	Q1 16 Q2 12 Q3 13 Q4 16	Q1 12 Q2 13 Q3 13 Q4 15
2 D	57354.87	316851.2	293571.1	303963.9	1087.899	2373.760	2338.739	2406.706	Q1 10 Q2 9 Q3 8 Q4 9	Q1 11 Q2 8 Q3 8 Q4 8	Q1 9 Q2 10 Q3 9 Q4 7	Q1 6 Q2 7 Q3 7 Q4 7
2 E	299419.5	307401	322003.1	261145.7	2419.492	2346.360	2508.831	2258.066	Q1 11 Q2 10 Q3 13 Q4 12	Q1 10 Q2 14 Q3 12 Q4 13	Q1 13 Q2 14 Q3 15 Q4 10	Q1 14 Q2 13 Q3 11 Q4 10
3 D	222206.9	195636.3	195820.8	177808.5	1979.702	1941.728	1954.691	1912.308	Q1 8 Q2 8 Q3 8 Q4 7	Q1 9 Q2 8 Q3 8 Q4 8	Q1 7 Q2 8 Q3 9 Q4 8	Q1 7 Q2 8 Q3 7 Q4 8
3 E	198739	172964.3	194694.4	233979.2	1966.215	1820.703	1892.530	2152.735	Q1 11 Q2 10 Q3 10 Q4 12	Q1 12 Q2 15 Q3 13 Q4 12	Q1 10 Q2 12 Q3 12 Q4 10	Q1 10 Q2 12 Q3 15 Q4 16
4 D	143260.3	113633.2	145501.7	147397.2	1727.226	1609.035	1765.446	1755.728	Q1 11 Q2 12 Q3 11 Q4 10	Q1 11 Q2 10 Q3 10 Q4 11	Q1 11 Q2 11 Q3 10 Q4 12	Q1 11 Q2 12 Q3 12 Q4 11
4 E	168243	304456	223783.2	165855.4	2079.205	2596.479	2105.144	1848.974	Q1 15 Q2 14 Q3 14 Q4 13	Q1 14 Q2 14 Q3 16 Q4 10	Q1 16 Q2 13 Q3 15 Q4 15	Q1 16 Q2 13 Q3 15 Q4 12
5 D	197589.4	228377.6	150761.3	259184.9	1946.467	2105.503	1711.625	2175.565	Q1 11 Q2 10 Q3 10 Q4 11	Q1 10 Q2 11 Q3 12 Q4 9	Q1 11 Q2 11 Q3 11 Q4 12	Q1 11 Q2 13 Q3 11 Q4 12
5 E	134978.9	148762	113610.2	174513.7	1736.188	1729.519	1531.905	1803.90	Q1 12 Q2 13 Q3 15 Q4 13	Q1 12 Q2 12 Q3 10 Q4 12	Q1 12 Q2 10 Q3 12 Q4 12	Q1 13 Q2 12 Q3 15 Q4 13
6 D	290330.7	284767.4	309769.3	282368.3	2516.554	2312.948	2499.093	2276.968	Q1 10 Q2 8 Q3 9 Q4 9	Q1 10 Q2 10 Q3 10 Q4 11	Q1 8 Q2 8 Q3 7 Q4 9	Q1 7 Q2 8 Q3 8 Q4 9
6 E	236651.3	236420.6	180588.2	171088	2059.684	2031.025	1786.722	1752.636	Q1 14 Q2 10 Q3 12 Q4 11	Q1 12 Q2 13 Q3 11 Q4 12	Q1 12 Q2 12 Q3 13 Q4 14	Q1 14 Q2 13 Q3 12 Q4 15
7 D	54636.68	69319.50	59819.30	68373.70	994.4493	1115.829	1052.256	1087.862	Q1 11 Q2 12 Q3 11 Q4 12	Q1 10 Q2 10 Q3 12 Q4 11	Q1 10 Q2 8 Q3 9 Q4 10	Q1 10 Q2 11 Q3 10 Q4 10
7 E	262891.2	262983.5	225528.7	226478.3	2170.425	2096.493	1918.351	1924.201	Q1 12 Q2 13 Q3 11 Q4 14	Q1 13 Q2 13 Q3 14 Q4 12	Q1 11 Q2 13 Q3 13 Q4 14	Q1 14 Q2 13 Q3 12 Q4 11
8 D	246771.3	238717	231165.5	222932.5	1999.734	1960.417	1949.669	1914.217	Q1 13 Q2 13 Q3 12 Q4 11	Q1 15 Q2 10 Q3 16 Q4 14	Q1 19 Q2 14 Q3 16 Q4 14	Q1 15 Q2 13 Q3 19 Q4 15
8 E	80310.84	79412.54	89062.86	88515.81	1172.089	1144.789	1213.949	1206.101	Q1 21 Q2 19 Q3 22 Q4 19	Q1 19 Q2 18 Q3 25 Q4 22	Q1 27 Q2 24 Q3 21 Q4 18	Q1 25 Q2 20 Q3 21 Q4 17

D, direito; E, esquerdo. Avaliação da área e perímetro intraperineural através de quatro secções<sup>ABCD</sup> do NLR. Avaliação do número de fibras através de quatro campos<sup>01234</sup> por secção. Cada campo representa 1860  $\mu\text{m}^2$ .

**Tabela 3 – Valores obtidos para área e perímetro das fibras do NLR (PONTO 1) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.**

Secção (NLR)	Área das fibras ( $\mu\text{m}^2$ )				Perímetro das fibras ( $\mu\text{m}$ )			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1 D	114.0307	81.23260	126.0440	166.0882	46.83040	39.58777	48.57711	53.23071
	175.8133	140.5362	111.1704	133.2901	57.16081	51.99273	47.52288	52.45757
	180.9618	128.5229	169.9020	143.2058	57.77836	44.02946	54.17899	52.79117
	139.7735	78.56298	130.6205	146.8289	50.24603	36.96771	51.37805	50.24890
	110.2170	139.0107	160.1770	148.7357	44.72194	50.57962	52.50720	53.45548
1 E	91.52969	136.3411	71.50757	102.9709	39.04514	48.03448	34.67837	42.71943
	135.0063	131.5739	100.6827	134.2435	48.57711	49.08871	40.97272	47.52288
	109.2634	108.3101	89.81351	110.5984	45.70125	43.41191	40.97272	43.08118
	93.43656	131.9553	114.7935	92.86450	40.35517	47.70376	45.08369	39.91849
	105.4498	172.5716	94.38999	82.37672	44.72194	56.54038	41.25668	36.86175
2 D	322.0701	178.1015	130.6205	200.4119	80.63541	57.30778	48.32131	59.49404
	337.8971	166.4696	231.3032	269.8219	78.37710	56.35950	65.12408	69.89936
	349.7197	229.3963	250.9439	161.1304	79.53036	65.24576	69.02601	54.94639
	212.0438	225.5825	231.4938	220.0526	60.26143	64.65924	66.81159	62.65386
	331.0324	232.8286	298.6156	264.4827	77.57867	64.73416	74.01033	66.54007
2 E	152.1681	231.4938	244.0792	158.4608	51.01629	64.91504	66.73667	51.37805
	169.3299	189.1614	241.0282	107.1660	55.92570	59.49404	66.33102	42.53855
	174.2878	220.8154	213.5693	111.3611	57.51969	62.62570	55.08051	43.15611
	173.1437	171.9955	218.3364	131.5739	57.05485	52.14545	60.57643	47.77868
	127.5695	168.7579	198.8864	160.9397	47.88463	57.20469	59.41911	52.7630
3 D	249.6091	162.0838	188.5893	200.6026	68.62037	52.06647	58.05945	58.54576
	157.5073	175.2412	158.8421	196.7888	50.68557	57.77836	54.48825	62.65673
	182.8687	177.9108	174.0971	216.8110	56.46546	54.49112	55.51718	61.37199
	183.4408	203.2722	233.4007	256.6645	59.74984	56.64634	64.89357	63.78588
	150.4519	202.8908	193.1658	219.2899	53.56143	62.03918	57.90674	65.78839
3 E	155.0284	166.0882	139.0107	181.5339	51.84576	56.07554	52.86609	57.41661
	121.8489	140.5362	108.5008	106.0219	44.62555	48.24639	44.21034	44.46614
	110.5984	154.4564	127.5695	156.9353	43.84858	54.50971	48.90783	54.25391
	163.9907	168.1858	102.0175	210.7090	50.01839	54.07303	43.15611	58.90751
	151.2147	118.6072	164.5628	211.4717	50.17397	48.83291	53.81723	63.19649
4 D	103.5430	145.8754	112.5052	119.1793	47.37303	53.01880	47.70376	46.85856
	109.6449	143.0151	128.3323	106.4033	43.51786	54.50971	47.80971	43.15611
	135.1970	115.5562	138.4387	115.7469	46.67769	44.28526	47.70376	45.36766
	99.15716	111.9332	133.0994	148.5451	42.10188	44.46614	51.73693	50.76049
	114.9842	100.8733	126.2347	116.8910	43.80470	42.28275	49.19466	45.77617
4 E	151.2147	112.3146	121.2768	118.7979	52.28244	48.06551	45.33949	46.46865
	135.5784	144.7313	118.7979	117.6538	51.19717	52.07053	46.90532	48.17147
	106.7846	128.5229	117.6538	116.7004	42.56959	47.95955	46.21285	46.0630
	116.5097	141.6803	114.0307	103.1616	45.90742	51.37805	45.59529	42.64164
	101.4454	159.4142	97.25030	84.47428	42.97523	55.76724	41.59028	33.62413
5 D	187.2545	207.0859	140.7269	142.4431	62.40093	65.81656	53.77048	50.61065
	168.1858	207.8487	130.6205	133.4808	55.77585	62.80657	47.73192	49.45046
	156.1725	180.1991	140.9176	154.4564	52.42941	59.23824	50.94137	52.30773
	259.1434	182.2966	128.5229	147.7823	70.36707	60.69811	48.14043	51.12225
	231.1125	168.7579	148.1637	162.8466	62.91253	58.72377	51.55893	53.30563
5 E	157.3167	107.5474	119.5607	125.6626	53.56143	46.21285	45.59529	46.90532
	99.72922	80.27917	96.67823	139.5828	43.15611	43.41191	47.08620	48.65203
	115.7469	104.3057	100.6827	117.0817	47.62883	44.90282	46.13792	47.26708
	92.86450	82.37672	84.09290	97.63167	41.00376	37.73510	41.66520	42.97523
	95.72480	107.1660	91.14832	108.5008	42.90031	45.18965	41.84608	43.15611
6 D	102.5895	163.9907	158.4608	157.5073	43.59278	54.17899	51.14754	52.43228
	149.1171	128.5229	147.7823	204.2256	49.94634	53.12189	50.57269	59.23824
	137.2945	137.4852	168.7579	176.5760	46.83040	49.63134	54.50971	58.92844
	187.8266	233.210	183.4408	166.8510	58.57105	65.27679	59.08552	54.38516
	181.1525	157.5073	183.0594	175.8133	55.95099	50.01839	57.59461	54.25655
6 E	120.1327	116.1283	136.7225	100.4920	43.82712	44.57209	49.94347	46.13505
	148.9264	121.6582	132.3367	134.6249	54.25391	45.51631	46.57460	50.50469
	144.5406	170.0927	129.0950	138.6293	52.27957	57.52256	45.80720	51.81473
	131.1926	196.7888	126.0440	141.6803	46.63093	57.33881	46.13792	49.30062
	162.2745	147.4009	141.2990	100.6827	53.04984	49.47863	49.45046	45.29560
7 D	91.52969	121.4675	102.3988	123.9465	37.84116	45.06799	43.54316	46.90532
	113.8401	152.5495	103.1616	150.8333	41.15360	51.15041	42.09782	50.76049
	117.8445	135.7690	126.2347	114.2214	46.75548	49.73443	45.72941	43.00626
	126.8068	99.53854	100.8733	159.2235	46.49968	40.02158	41.15360	50.68557
	119.9420	128.7136	74.36787	141.4896	46.16609	49.40370	34.08897	50.09905
7 E	139.0107	160.9397	122.6116	67.12177	47.73192	40.6420	47.59374	33.18746
	92.67381	134.4342	105.4498	87.52527	40.97272	47.55391	45.18965	34.34764
	150.0706	110.9797	110.5984	78.56298	51.30313	45.36766	42.64164	35.47680
	120.3234	103.1616	102.3988	93.05518	42.06375	42.10188	39.48181	41.33448
	126.6161	134.2435	142.4431	70.17276	45.44258	50.09905	50.53573	36.78683
8 D	145.713	140.893	64.465	71.853	50.127	49.569	35.027	35.545
	89.810	119.340	114.349	77.994	37.755	46.311	44.141	39.169
	132.722	135.829	124.306	100.820	46.637	48.760	47.432	43.312
	81.321	116.918	79.878	45.455	37.087	47.692	38.436	28.748
	93.456	103.927	90.569	59.729	38.642	41.855	40.734	31.921
8 E	57.492	59.107	85.211	58.569	31.715	32.837	42.039	31.823
	56.391	84.502	113.933	55.217	30.388	38.016	45.341	32.006
	64.954	91.352	75.645	85.456	35.027	38.597	35.987	40.237
	52.526	73.076	73.223	77.798	34.142	35.080	36.063	37.757
	65.810	62.850	67.963	61.113	35.836	35.447	34.531	31.952

D, direito; E, esquerdo. Em cada secção<sup>ABCD</sup> está representada a avaliação de cinco fibras.

### **3.3.4 Quantificação da área e perímetro intraperineural total do NLR**

#### **(PONTO 2):**

Para obter as medidas da área e perímetro do nervo no PONTO 2, as imagens foram digitalizadas (10x); sendo avaliadas em quatro secções por lâmina, bilateralmente (Ver Tabela 4). O procedimento utilizado para a aferição destas medidas foi através do delineamento intraperineural do NLR, a partir das imagens projetadas no computador (Figura 9). Com o software IPP 4.1 foi possível estimar o valor da área e do perímetro intraperineural total do NLR. A obtenção da área intraperineural foi necessária para o cálculo da densidade e número total de fibras do nervo a partir de amostragem representativa. Ao final obteve-se as medidas de 8 secções por nervo (**PONTO 1 + PONTO 2**).

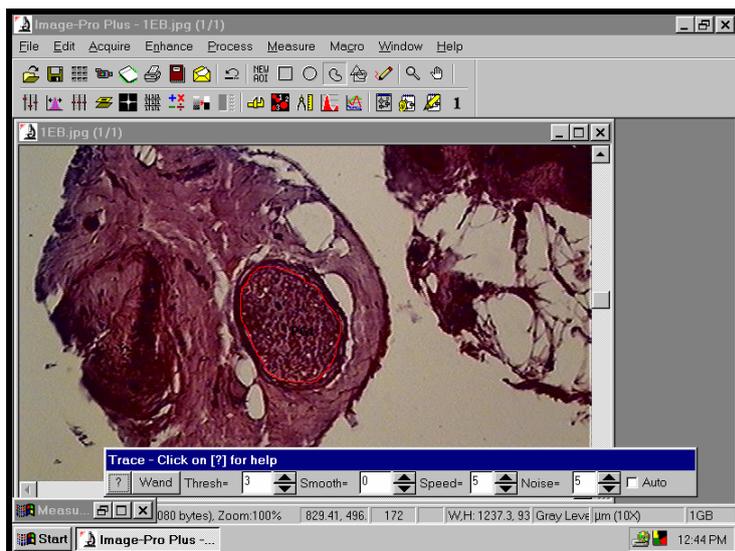
### **3.3.5 Quantificação do número de fibras nervosas do NLR (PONTO 2):**

As imagens do nervo foram digitalizadas a partir da objetiva de 40x. Foram avaliados cinco campos por secção, com área representativa do campo de  $1860 \mu\text{m}^2$  (Ver Tabela 4); os campos foram sobrepostos no centro da imagem; parte superior esquerda; superior direita; inferior esquerda e inferior direita da área intraperineural do NLR. Para evitar erro de amostragem, foram excluídas as fibras projetadas sobre as linhas inferior e direita que delimitavam o campo (Figura 10). Conhecendo a área intraperineural total obtida com a soma dos campos (**PONTO 1 + PONTO 2**) obteve-se um total de 36 campos avaliados por nervo, a partir desta avaliação foi estimada a densidade e o número total de fibras do NLR.

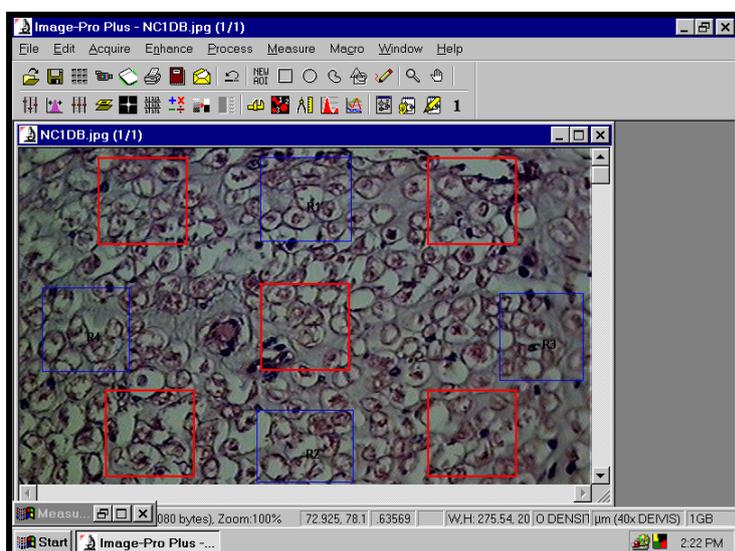
### **3.3.6 Quantificação da área e perímetro das fibras nervosas do NLR**

#### **(PONTO 2):**

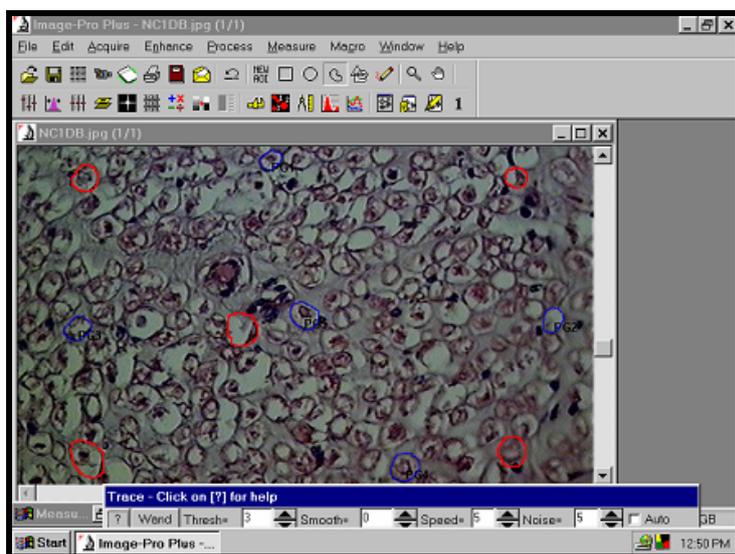
Para obter as medidas da área e do perímetro das fibras nervosas, as imagens foram digitalizadas para o computador a partir da objetiva de 40x; sendo avaliadas cinco fibras por secção (Ver Tabela 5). Foram escolhidas para a avaliação das medidas as fibras situadas em pontos onde não haviam sido avaliadas no PONTO 1 (próximo ao centro; na parte superior esquerda; superior direita; inferior esquerda e inferior direita) (Figura 11). O procedimento utilizado para a aferição destas medidas foi através do delineamento das fibras nas imagens projetadas no computador. A partir das fibras aferidas nos dois pontos (**PONTO 1 + PONTO 2**), obteve-se uma avaliação de 40 fibras por nervo.



**Figura 9** – Delineamento (círculo vermelho) intraperineurial para obtenção da área e perímetro intraperineurial do NLR (PONTO 2). Aumento de 10x.



**Figura 10** – Cada quadrante (vermelho) representa um campo com área de  $1860 \mu\text{m}^2$ , usado para quantificar o número de fibras nervosas (PONTO 2). Aumento de 40x.



**Figura 11** - Delineamento de cinco fibras (círculos vermelhos) para obtenção da área e perímetro das fibras nervosas do NLR (PONTO 2). Aumento de 40x.

**Tabela 4 – Área, perímetro intraperineural e número de fibras do NLR (PONTO 2) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.**

Secção (NLR)	Área intraperineural ( $\mu\text{m}^2$ )				Perímetro intraperineural ( $\mu\text{m}$ )				Número de fibras			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1 D	124626.7	122842	171390.2	178244.8	1373.927	1388.173	1675.909	1715.858	Q1 13 Q2 13 Q3 17 Q4 15 Q5 15	Q1 11 Q2 12 Q3 10 Q4 11 Q5 13	Q1 9 Q2 10 Q3 13 Q4 10 Q5 10	Q1 12 Q2 9 Q3 10 Q4 11 Q5 9
1 E	89322.74	101626	101952	104706.6	1208.980	1300.893	1330.305	1334.883	Q1 12 Q2 7 Q3 10 Q4 8 Q5 9	Q1 10 Q2 11 Q3 11 Q4 14 Q5 15	Q1 14 Q2 11 Q3 10 Q4 7 Q5 10	Q1 13 Q2 14 Q3 12 Q4 11 Q5 12
2 D	132049.7	138833	140287.9	140789.4	1471.042	1445.534	1463.168	1440.836	Q1 12 Q2 13 Q3 13 Q4 11 Q5 12	Q1 12 Q2 11 Q3 9 Q4 11 Q5 13	Q1 13 Q2 10 Q3 11 Q4 12 Q5 9	Q1 10 Q2 8 Q3 9 Q4 10 Q5 9
2 E	160170.7	146354.5	132015.2	135197.1	1634.701	1526.911	1504.272	1475.905	Q1 14 Q2 10 Q3 12 Q4 12 Q5 10	Q1 11 Q2 12 Q3 9 Q4 12 Q5 11	Q1 12 Q2 10 Q3 12 Q4 14 Q5 8	Q1 15 Q2 10 Q3 13 Q4 12 Q5 11
3 D	81660.07	75994.16	71635.56	77251.23	1196.433	1198.831	1157.540	1194.824	Q1 14 Q2 15 Q3 12 Q4 15 Q5 12	Q1 12 Q2 14 Q3 13 Q4 14 Q5 14	Q1 12 Q2 10 Q3 12 Q4 13 Q5 12	Q1 15 Q2 13 Q3 13 Q4 13 Q5 12
3 E	142209.1	175528.5	177215.2	176345.7	1654.982	1678.283	1708.035	1684.973	Q1 14 Q2 13 Q3 11 Q4 13 Q5 12	Q1 11 Q2 12 Q3 10 Q4 11 Q5 11	Q1 12 Q2 14 Q3 10 Q4 12 Q5 11	Q1 9 Q2 11 Q3 12 Q4 9 Q5 10
4 D	70016.95	67752.41	68875.38	70323.90	1055.158	1061.720	1020.977	1076.161	Q1 16 Q2 15 Q3 17 Q4 19 Q5 18	Q1 18 Q2 15 Q3 18 Q4 17 Q5 18	Q1 18 Q2 18 Q3 18 Q4 19 Q5 18	Q1 20 Q2 21 Q3 15 Q4 20 Q5 20
4 E	90673.95	91999.85	86272.23	92089.24	1212.073	1202.817	1186.107	1217.274	Q1 13 Q2 16 Q3 15 Q4 17 Q5 15	Q1 17 Q2 16 Q3 15 Q4 15 Q5 14	Q1 19 Q2 16 Q3 15 Q4 14 Q5 15	Q1 21 Q2 18 Q3 15 Q4 18 Q5 14
5 D	100230.1	103844.7	102872	101947.6	1254.248	1259.054	1258.972	1254.987	Q1 19 Q2 14 Q3 16 Q4 17 Q5 18	Q1 15 Q2 16 Q3 18 Q4 20 Q5 15	Q1 15 Q2 16 Q3 19 Q4 16 Q5 15	Q1 15 Q2 16 Q3 13 Q4 14 Q5 12
5 E	67060.19	64962.96	63505.35	65131.86	1102.809	1075.626	1086.775	1081.490	Q1 17 Q2 15 Q3 17 Q4 17 Q5 18	Q1 19 Q2 18 Q3 18 Q4 19 Q5 18	Q1 19 Q2 15 Q3 18 Q4 16 Q5 16	Q1 19 Q2 17 Q3 16 Q4 14 Q5 17
6 D	89576.29	90427.52	91262.53	90519.29	1344.536	1282.430	1357.270	1312.240	Q1 20 Q2 15 Q3 17 Q4 20 Q5 20	Q1 16 Q2 16 Q3 16 Q4 18 Q5 14	Q1 16 Q2 17 Q3 15 Q4 16 Q5 15	Q1 14 Q2 13 Q3 17 Q4 19 Q5 15
6 E	115132.2	113566.2	117820.4	117531.3	1315.613	1418.462	1377.648	1360.139	Q1 13 Q2 12 Q3 10 Q4 11 Q5 15	Q1 12 Q2 11 Q3 13 Q4 11 Q5 9	Q1 13 Q2 15 Q3 16 Q4 12 Q5 13	Q1 9 Q2 11 Q3 9 Q4 11 Q5 9
7 D	129246	129802.5	133353	165983.8	1443.655	1487.092	1422.411	1692.741	Q1 17 Q2 13 Q3 14 Q4 13 Q5 16	Q1 12 Q2 14 Q3 13 Q4 12 Q5 15	Q1 17 Q2 16 Q3 18 Q4 15 Q5 14	Q1 9 Q2 15 Q3 12 Q4 8 Q5 12
7 E	100197.7	98912.94	99574.70	100491.6	1256.861	1220.359	1228.214	1252.992	Q1 16 Q2 16 Q3 17 Q4 13 Q5 14	Q1 18 Q2 19 Q3 13 Q4 15 Q5 14	Q1 14 Q2 14 Q3 14 Q4 16 Q5 15	Q1 13 Q2 17 Q3 13 Q4 15 Q5 14
8 D	27271.8	26772.5	26941.2	272453.8	2072.029	2071.590	2071.881	2103.259	Q1 12 Q2 10 Q3 11 Q4 13 Q5 12	Q1 12 Q2 11 Q3 16 Q4 10 Q5 11	Q1 13 Q2 12 Q3 10 Q4 14 Q5 14	Q1 13 Q2 9 Q3 8 Q4 16 Q5 15
8 E	85920.19	86154.75	86612.80	84788.11	1291.219	1300.340	1291.342	1273.286	Q1 14 Q2 13 Q3 14 Q4 16 Q5 15	Q1 18 Q2 16 Q3 13 Q4 12 Q5 21	Q1 18 Q2 17 Q3 18 Q4 16 Q5 15	Q1 16 Q2 16 Q3 13 Q4 19 Q5 20

D, direito; E, esquerdo. Avaliação da área e perímetro intraperineural através de quatro secções<sup>ABCD</sup> do NLR. Avaliação do número de fibras através de cinco campos<sup>Q12345</sup> por secção. Cada campo representa 1860  $\mu\text{m}^2$ .

**Tabela 5 – Valores obtidos para área e perímetro das fibras do NLR (PONTO 2) nos oito indivíduos da amostra, através do Programa Image Pro-Plus 4.1.**

Secção (NLR)	Área das fibras ( $\mu\text{m}^2$ )				Perímetro das fibras ( $\mu\text{m}$ )			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1 D	77.138	72.856	124.233	99.376	34.035	34.862	44.510	41.672
	84.893	58.520	123.425	120.905	37.864	27.961	46.460	43.469
	80.147	106.226	142.288	97.272	36.689	43.218	46.981	39.109
	65.884	60.795	60.819	81.248	35.447	32.361	30.571	35.965
	24.195	44.941	135.658	76.550	18.662	26.893	41.755	35.934
1 E	131.695	58.813	96.489	117.236	44.927	30.853	39.138	43.042
	135.046	56.660	85.823	125.480	44.595	29.566	37.188	43.763
	72.024	36.526	82.006	103.538	32.862	25.276	37.279	40.446
	181.823	73.272	67.474	107.425	53.069	36.718	33.872	39.806
	116.795	84.081	79.951	98.765	44.767	35.404	35.688	38.256
2 D	82.031	111.535	69.431	64.832	35.907	44.324	32.707	34.325
	130.863	96.343	104.538	76.379	46.740	40.329	42.686	35.671
	70.850	76.722	105.444	83.988	33.009	35.751	38.365	35.619
	72.098	92.648	82.471	115.597	32.846	39.947	35.252	42.826
	81.884	69.407	80.979	92.869	38.680	34.035	36.247	39.048
2 E	57.639	75.474	51.488	84.673	30.875	34.025	27.280	38.696
	109.187	91.817	91.083	75.401	41.147	39.080	40.072	37.366
	90.716	67.963	95.083	64.563	35.022	32.859	41.013	33.042
	117.823	82.128	84.550	77.333	42.523	38.899	38.124	36.709
	97.835	63.095	76.771	74.789	41.703	29.762	35.728	36.796
3 D	79.266	85.358	54.116	61.700	36.157	37.996	30.853	32.806
	122.006	73.933	95.486	111.804	44.036	34.184	40.313	41.391
	64.636	61.774	122.373	37.211	34.683	34.083	45.024	24.498
	42.495	124.379	87.829	106.398	26.049	46.385	37.777	40.928
	63.731	71.657	103.829	73.174	31.485	35.673	40.061	36.557
3 E	25.590	90.177	100.030	87.266	20.690	37.994	36.783	38.673
	106.642	112.025	63.608	93.333	39.709	41.851	32.124	39.165
	43.327	67.792	84.844	75.278	24.818	34.600	34.225	33.619
	83.083	70.312	125.113	87.364	36.455	33.429	44.400	34.667
	134.802	99.474	59.988	116.967	44.078	42.372	31.315	42.883
4 D	62.238	115.988	69.920	51.327	33.592	43.701	36.774	30.464
	66.593	52.966	89.492	102.924	36.300	35.080	40.054	45.868
	84.135	100.477	65.884	76.232	38.673	41.122	36.073	38.597
	67.694	85.064	93.823	68.917	34.888	38.696	43.075	38.209
	94.581	75.719	95.070	58.618	39.815	37.033	43.205	32.395
4 E	82.985	104.465	54.043	53.211	41.887	43.290	31.380	30.075
	77.456	57.419	73.272	54.605	36.980	31.639	36.720	31.400
	59.303	55.926	62.361	57.174	33.181	32.891	33.592	31.876
	74.520	33.492	40.416	66.397	36.354	25.879	26.871	34.692
	91.083	45.309	43.743	45.480	47.120	29.427	28.954	29.266
5 D	110.728	108.893	74.716	109.064	44.769	45.533	38.597	43.366
	132.600	93.847	102.606	100.771	47.035	39.353	43.754	42.535
	118.606	125.358	125.480	124.918	46.849	49.019	47.110	51.575
	88.710	100.648	99.621	43.988	39.634	42.449	41.770	28.931
	79.193	77.333	62.850	121.199	37.896	37.400	32.998	46.668
5 E	69.700	70.679	72.587	64.318	35.652	37.713	37.163	36.019
	57.786	65.223	62.801	80.807	35.706	39.719	39.094	42.427
	47.510	70.410	68.355	86.924	36.202	37.346	39.169	42.472
	87.535	61.774	67.914	69.749	43.127	38.025	36.980	38.414
	54.972	51.205	70.410	47.731	36.408	33.203	38.597	31.510
6 D	103.119	80.024	69.945	93.896	42.794	40.787	35.782	40.215
	94.752	111.364	87.119	95.706	41.596	46.052	39.558	41.596
	112.074	83.890	85.554	91.817	43.160	38.673	38.048	39.612
	102.875	120.612	104.416	118.973	47.745	47.562	44.143	45.426
	99.572	123.964	95.340	103.462	39.504	49.935	40.917	43.419
6 E	103.853	128.954	69.798	120.710	44.724	49.859	37.194	46.472
	91.768	126.948	101.896	75.278	41.046	49.720	42.794	36.667
	78.434	99.401	64.758	111.902	35.965	38.673	32.891	45.480
	77.969	91.303	140.698	139.474	36.537	42.845	50.451	51.499
	82.593	94.777	113.713	142.019	37.346	40.237	44.219	51.358
7 D	113.933	152.367	174.802	128.269	44.871	52.460	56.236	49.309
	217.689	110.704	155.181	98.373	62.148	43.227	54.574	39.719
	182.337	123.817	168.514	184.955	57.045	51.705	53.852	60.906
	140.208	146.985	157.236	127.874	49.148	55.016	53.086	44.843
	131.450	141.652	166.337	150.826	47.531	51.153	56.732	50.194
7 E	94.092	101.431	110.214	90.862	40.841	39.482	48.197	42.566
	82.716	143.413	60.306	71.731	38.696	50.011	33.128	37.713
	83.376	103.804	59.523	89.492	40.215	41.641	31.693	39.590
	78.141	118.924	132.673	68.281	38.436	45.815	49.989	35.264
	59.939	86.581	93.113	95.804	33.203	39.277	39.395	40.993
8 D	79.242	196.918	82.495	144.685	37.420	59.731	37.087	49.224
	111.242	169.004	95.486	332.919	44.617	50.637	41.122	75.070
	114.275	114.178	149.652	176.123	44.217	44.326	50.161	55.059
	335.855	155.719	211.940	138.447	74.047	53.528	62.039	49.828
	83.327	183.707	136.710	177.273	38.383	54.144	49.591	54.252
8 E	72.098	94.312	89.395	71.290	37.789	41.122	41.402	40.993
	117.480	105.664	118.435	103.829	45.059	42.901	45.502	43.995
	68.355	75.890	95.535	72.660	38.544	36.957	40.939	36.848
	82.398	119.340	109.187	72.196	38.673	48.188	44.617	35.545
	89.321	132.967	74.960	111.095	39.040	47.819	37.194	44.823

D, direito; E, esquerdo. Em cada secção<sup>ABCD</sup> está representada a avaliação de cinco fibras.

**4 ARTIGO**

---

**Editorial Manager(tm) for The Laryngoscope (ANEXO C)**

**Manuscript Draft**

**Manuscript Number:**

**Title: Histological asymmetry of the human recurrent laryngeal nerve**

**Article Type: Original Study**

**Section/Category: Voice**

**Keywords: Larynx, Recurrent Laryngeal Nerve, Phonation.**

**Corresponding Author: Dr Leder Leal Xavier, Ph.D**

**Corresponding Author's Institution: PUCRS**

**First Author: Deivis De Campos**

**Order of Authors: Deivis De Campos; Mariana F Rodrigues; Geraldo P Jotz, M.D.; PhD; Leder Leal Xavier, Ph.D**

**Manuscript Region of Origin:**

**Abstract: Objectives/Hypothesis:** Histological studies of the human recurrent laryngeal nerves (RLNs) have described differences in fiber length and thickness between the right and left RLNs. This asymmetry is probably involved in the different times of arrival of the stimuli to the laryngeal musculature controlled by each nerve. Histological and structural differences between the right and left RLNs could explain the synchronicity of laryngeal musculature contraction despite the differing nerve lengths. The purpose of this investigation was to shed some light on this paradigm by obtaining estimates of some morphometric parameters such as intraperineural area; intraperineural perimeter; fiber area; fiber perimeter; fiber density (number of fibers/mm<sup>2</sup>) and total number of nerve fibers in the right and left RLN of humans. **Study Design:**

Morphological study of human recurrent laryngeal nerves. Methods: The right and left RLNs were studied in a total sample of eight human specimens obtained from necropsies, this tissue was embedded and sectioned in paraffin (10  $\mu\text{m}$ ) and stained with hematoxylin-eosin. The morphometric parameters were measured in digitized images obtained from histological sections of the distal part of the RLN (both sides) using Image Pro Plus Software 4.1. Results: No statistical differences between the two RLNs were observed in the intraperineural area; intraperineural perimeter; density (number of fibers/ $\text{mm}^2$ ) and total number of fibers. However, the area and perimeter of fibers of the right side were statistically larger when compared with the left side, 21 and 11%, respectively. Conclusions: The different time of arrival of the stimulus to the laryngeal musculature controlled by the RLN, shown in previous electrophysiological studies, could be partly explained by the morphological findings of the present study.

## **Histological asymmetry of the human recurrent laryngeal nerve**

Deivis de Campos<sup>1</sup>; Mariana Freitas Rodrigues<sup>4</sup>; Geraldo Pereira Jotz<sup>1,2,3</sup>;  
Léder Leal Xavier<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite 500, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite 500, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Faculdade de Medicina – Universidade Luterana do Brasil, RS, Brazil. Avenida Farroupilha 8001, 92.425-900, Canoas, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, 90.610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Footnotes to the title: Asymmetry of recurrent laryngeal nerve

Corresponding author: Dr. Léder Leal Xavier

Laboratório de Biologia Tecidual

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Faculdade de Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 6681

Porto Alegre/RS

90619-900 Brazil

Phone: +55(51)3320-3545

Fax: +55(51)3320-3612

E-mail: llxavier@pucrs.br

**\* Manuscript**

## INTRODUCTION

The recurrent laryngeal nerve (RLN) is a branch of the vagus nerve which follows a long course through the thoracic cavity and neck, it is primarily associated with motor innervations of the intrinsic laryngeal muscles,<sup>1</sup> responsible for breathing, voice production and airway protection during swallowing.<sup>2</sup>

The right and left RLNs display asymmetric lengths. In men, the average length of the left nerve is 43 cm while that of the right nerve is 32 cm, giving an average difference of 11 cm, although the range extends from 5.7 to 15 cm.<sup>3</sup> This asymmetry between the lengths of the RLNs also occurs in other animal species.<sup>4,5</sup>

This asymmetry arises because the right and left RLNs take different routes to the larynx, the left RLN travels with the vagus nerve until its branching point near the aortic arch in the thoracic cavity. After looping under the aortic arch, it ascends along the tracheo-oesophageal crease towards the larynx. The right RLN does not descend as far inferiorly as the left RLN. It branches from the vagus in the thoracic cavity near the subclavian artery. After looping around the subclavian artery, the right RLN travels towards the larynx along the tracheo-oesophageal groove.<sup>6</sup>

When the right and left RLNs are compared, the differences in parameters such as length and route to the larynx are well described, however, for some aspects such as the synchronicity of laryngeal musculature contraction there is little information available and some findings are controversial. One previous study showed that the arrival of motor impulses is

simultaneous in both sides of the laryngeal musculature<sup>4</sup> while other studies have shown a difference in this parameter between the right and left RLN.<sup>3,7,8</sup>

The answer to this question, whether the conduction of RLN is symmetric or asymmetric, could lie in, a possible difference between the right and left RLNs in terms of the nerve impulse conduction, any such difference would certainly be related to parameters such as nerve fiber length and diameter. Thus, the study of some histological/morphometric parameters of this nerve would be very important to the elucidation of this paradigm.

Furthermore, this nerve is clinically important, as it is easily damaged by trauma resulting from surgical procedures to the neck, trachea, oesophagus, or heart, so producing voice alterations, dysphagy and dyspnea.<sup>9</sup>

The aim of our study was to analyze some morphometric parameters: intraperineural area; intraperineural perimeter; fiber area; fiber perimeter; fiber density (number of fibers/mm<sup>2</sup>) and total number of fibers, that are involved in the intensity and velocity of nerve conduction in the right and left RLNs in humans. In addition, a correlation was made between these morphometric measurements and other parameters of the subjects [Age, Weight, Height and Body Mass Index (BMI)].

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Human tissue*

All the nerves analyzed were obtained in the Department of Legal Medicine from necropsies of eight males. The age, weight, height and body mass index (BMI) of the subjects are presented in Table I. This study was

approved by the Ethics Committee of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, RS - Brazil.

### *Histology*

The dissection of the RLN extended deeply towards the point where it enters the larynx (cricothyroid joint). The segments of RLN used in our histological analysis were obtained 1 and 2 cm below the cricothyroid joint (Fig. 1). These segments were fixed in a *Bouin* solution [picric acid (71.5%) - acetic acid (4.8%) - formalin (23.8%)] for 24 hours, they were embedded in paraffin wax and sectioned (10  $\mu\text{m}$ , with intervals of 100  $\mu\text{m}$ ) using a microtome (Leica), the sections were mounted onto slides, deparaffinized with xylene, rehydrated, and stained with hematoxylin-eosin (HE), washed in water, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared with xylene, covered with Entellan and coverslips. At least four sections were obtained from each segment and analyzed.

### *Morphometric measurements*

Digitized images of the RLN sections were obtained using an Olympus BX 50 microscope (10x and 40x) coupled to a video camera (Leica DC 300F) interfaced by Leica Image 50 (IM50) software. The images obtained were measured using Image Pro Plus Software (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

The digitized images of the RLN (10x) were displayed onto a high-resolution video monitor. The nerve fiber density (number of fibers/ $\text{mm}^2$ ) was estimated using a previously described protocol of planar morphometry.<sup>10</sup> Briefly, five squares, named areas of interest (AOI) measuring 1860  $\mu\text{m}^2$  were

overlaid onto each obtained image, the fibers located inside this square or intersected by the upper and/or left edge of the AOI were counted, the fibers intersected by the lower and/or right edge of the AOI were not counted. The fiber density was obtained using the following equation: Fiber density = (total number of fibers counted /AOI area X total number of AOIs). To estimate the intraperineural area and perimeter, the digitized images of the sections were outlined and the corresponding parameters were measured (8 images for each nerve). To estimate the fiber area and perimeter, the same delineation procedure was carried out in the fibers previously counted within the AOIs (Fig. 2A-F). The total number of fibers in each nerve was estimated by multiplying the fiber density by the total intraperineural area.

Since the tissue shrinkage factor caused by the fixation and paraffin wax embedding procedures could not be calculated,<sup>11</sup> in our study the area, perimeter and fiber density were not expressed in micrometers. The results were expressed as a percentage of the right nerve that was considered to be 100%. The calculation of total number of nerve fibers is not affected by the tissue shrinkage, thus it is expressed in numbers of nerve fibers/nerve.

### *Statistical analysis*

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 4.0 Software. The comparisons between the right and left RLNs from each subject were performed using a paired t test, ( $p < 0.05$ ). To analyze the correlation between the morphometric measurements (intraperineural area, intraperineural perimeter, fiber area, fiber perimeter, neuronal density and total number of fibers) with other parameters of the subjects [Age, Weight, Height and Body

Mass Index (BMI)] the Pearson's correlation coefficient was calculated ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

In all the histological sections, the qualitative analysis of the collected nerves demonstrates that the RLN presents a significant amount of epineurium/adipose (Fig. 2.AB).

With the use of HE staining the measured fibers were seen to have well defined boundaries. In all analyzed sections it was possible to visualize the variable caliber of the RLN fibers (Fig. 2.CDEF).

Quantitative comparison of the total intraperineural area demonstrated no statistically significant difference between the right and left nerves, ( $p=0.268$ ) (Fig. 3A). Similarly, there was no significant difference in the intraperineural perimeter ( $p=0.536$ ) (Fig. 3B).

Measurement of the fiber area demonstrated the existence of a significant difference between the right and left RLNs. The fiber area in the right nerve was found to be 21% larger than that on the left nerve ( $p=0.0023$ ) (Fig. 3C). There was also a significant difference between the fiber perimeter of the right and left nerves, the latter being found to be 11% smaller ( $p=0.0009$ ) (Fig. 3D).

Measurement of the fiber density in the right and left RLN showed no statistically significant difference ( $p=0.062$ ) (Fig. 3E).

The mean total number of nerve fibers in the right RLN was  $795.8 \pm 37.6$  fibers/nerve, and for the left RLN it was  $1204.8 \pm 49.3$  fibers/nerve. This difference was not statistically significant ( $p=0.158$ ) (Fig. 3F).

The values of Pearson's correlation coefficient are presented in Table II. The intraperineural perimeter of left RLN was positively correlated with BMI. The fiber area and perimeter of right RLN is correlated with weight and BMI.

## **DISCUSSION**

In the nerves collected for the present study, large portions of epineurium and adipose tissue were found in the distal part of the RLNs. This may result from the need for additional protection for the nerve within the laryngeal region. Extra padding surrounding the RLN could help to prevent damage resulting from, for example: blows to the neck; compression and elongation related to movements of the head such as flexion, extension and rotational movements and the elevation and depression that occur during swallowing and voice production.<sup>12</sup>

Although there is little evidence of blood vessels in the histological images obtained in the present study some blood vessels were seen together with the adipose tissue, which may represent ramifications of the inferior thyroid artery.<sup>13</sup>

The variation in the caliber of the RLN fibers found in our study is consistent with other studies performed in humans, and confirms that the human RLN contains fibers of various calibers, thus characterizing it as a mixed nerve.<sup>14</sup>

Our study is the first that carried out in a well delimited region of RLN, this precaution was taken to avoid misleading results. Previous investigations into nerve fiber density and diameter of RLNs, in both, humans and animals, have produced varying results. These results may indicate differences between

individuals within species or, more probably, a failure to section nerves at a specified position. It has been demonstrated that the numbers of both bundles and individual fibers depend upon the level at which sectioning is carried out. Moreover, this information lacking in many reports.<sup>4</sup> Evidence has been produced to show that the topography of the RLN is different depending on the location at which the section is made. Close to the insertion point of the RLN into the larynx, the topography was more uniform, while sections taken proximally revealed compartments comprising myelinated fibers of varying diameter size.<sup>14</sup> Physiological evidence is in accordance with this morphological differences in different portions of RLN. For example, differences in the velocity of conduction was found between distal and proximal portions of human RLN, distal conduction velocity was approximately 30 m/sec, while that of the proximal portion was approximately 65 m/sec.<sup>15</sup>

The main result found in our study is the significant difference in fiber area and perimeter between the right and left human RLN. A similar result was poorly described in a study involving RLN fiber analysis in humans, it was reported that the right RLN had fewer large fibers than the left in sections taken 6 and 9 cm below the lower border of the cricoid.<sup>16</sup> Another study suggests that in humans and giraffes, the left RLN contains more large, fast-conducting fibers.<sup>4</sup> In rats, no difference was found in the number of myelinated fibers between the right and left RLNs. However, the myelinated fibers of the right RLN were statistically larger in diameter than the fibers of the left RLN.<sup>5</sup> In horses, it was reported that the total number of fibers, mean fiber diameter and percentage of thickest fibers for the left RLN were significantly lower than those of the right RLN.<sup>17</sup> In fact, all these previous studies are in accordance, at least in part, with the results found in the present study.

## **CONCLUSION**

To our knowledge, the present study represents the first complete light-microscopic study of the human RLN using planar morphometry in a well defined region of this nerve, and as such contributes towards enhancing our understanding of phonation in general. The results of the present study seem to be consistent with those obtained in previous investigations involving both human<sup>7</sup> and animal<sup>5,8,17</sup> RLNs. It is interesting that the left RLN presents a slight delay in the impulse when compared to the right RLN,<sup>7,8</sup> probably because the left RLN is longer. However, probably this longer latency in the left RLN cannot be explained only by its longer length, but also by the reduced fiber area in comparison with the right RLN, reported in our study.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Márcia Goetze and Edson Fiedler A. Jr., for their assistance with the histological procedures. This work was supported by CNPq and CAPES.

## REFERENCES

1. Nakai T, Goto N, Moriyama H, Shiraishi N, Nonakan N. The human recurrent laryngeal nerve during the aging process. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2000;76:363-367.
2. Heavner SB, Rubin AD, Fung K, Old M, Hogikyan ND, Feldman EL. Dysfunction of the recurrent laryngeal nerve and the potential of gene therapy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:441-448.
3. Shin T, Rabuzzi DD. Conduction studies of the canine recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope* 1971;81:586-596.
4. Harrison DF. Fibre size frequency in the recurrent laryngeal nerves of man and giraffe. *Acta Otolaryngol* 1981;91:383-389.
5. Pascual-Font A, Merchan A, Maranillo E, Brillas A, Sanudo JR, Valderrama-Canales FJ. Morphometry of the recurrent laryngeal nerves of the rat. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2006;57:435-440.
6. Bowden REM. The surgical anatomy of the recurrent laryngeal nerve. *British Journal of Surgery* 1955;43:153-163.
7. Rodel RM, Olthoff A, Tergau F, Simonyan K, Kraemer D, Markus H, Kruse E. Human cortical motor representation of the larynx as assessed by transcranial magnetic stimulation (TMS). *Laryngoscope* 2004;114:918-922.

8. Steiss JE, Marshall AE. Electromyographic evaluation of conduction time and velocity of the recurrent laryngeal nerves of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1988;49:1533-1536.
9. Ishii K, Adachi H, Tsubaki K, Ohta Y, Yamamoto M, Ino T. Evaluation of recurrent nerve paralysis due to thoracic aortic aneurysm and aneurysm repair. *Laryngoscope* 2004;114:2176-2181.
10. Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Cunha C, Deonizio JMD, Netto CA, Achaval M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Research Protocols* 2005;16:58–64.
11. Schmitz C, Dafotakis M, Heinsen H, Mugrauer K, Niesel A, Popken GJ, Stephan M, Van de Berg WDJ, Hörsten SV, Korr H. Use of cryostat sections from snapfrozen nervous tissue for combining stereological estimates with histological cellular, or molecular analyses on adjacent sections. *J Chem Neuroanat* 2000;20:21-29.
12. Barkmeier JM, Luschei ES. Quantitative analysis of the anatomy of the epineurium of the canine recurrent laryngeal nerve. *J Anat* 2000;196:85-101.
13. Bülent Y. Anatomic configurations of the recurrent laryngeal nerve and inferior thyroid artery. *Surgery* 2006;139:181-187.

14. Carlsöö B, Izdebski K, Dahlqvist A, Domeij S, Dedo HH. The recurrent laryngeal nerve in spastic dysphonia. A light and electron microscopic study. *Acta Otolaryngol* 1987;103:96-104.
15. Atkins JP. An electromyographic study of recurrent laryngeal nerve conduction and its clinical applications. *Laryngoscope* 1973;83:796-807.
16. Tomasch J, Britton WA. A fibre analysis of the laryngeal nerve-supply in man. *Acta Anat* 1955;23:386-398.
17. Lopez-Plana C, Sautet JY, Pons J, Navarro G. Morphometric study of the recurrent laryngeal nerve in young normal horses. *Res Vet Sci* 1993;55:333-337.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Schematic representation showing the region of the RLN that was studied in different sections (A to H), bilaterally. Legends: L, larynx; W, windpipe.

**Fig. 2.** Digitized images of sections of the RLN. A, B – Images of intraperineural area estimation; C,D – Area of interest used to estimate fiber density and total number fibers; E,F - Images of fiber area and perimeter estimation. Legends: Fiber inclusion (•) and exclusion (X) in study. C, collagen fibrils; AT, adipose tissue; BV, blood vessel; AOI, area of interest.

**Fig. 3.** Comparison of intraperineural area (A); intraperineural perimeter (B); area (C); perimeter (D); density (E) and total number (F) of fibers between the right (R) and the left (L) RLN. Legends: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Table I.** Table showing the parameters of the subjects. Race, Age, Weight and Height, Body Mass Index (BMI), period between death and the collection of the fragment ( $\Delta t$ ) and Cause of Death.

**Table II.** The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) between the parameters, the significant correlation is presented in bold. Legend: R= Right RLN; L= Left RLN; BMI= Body Mass Index; NS= Not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Figure 1

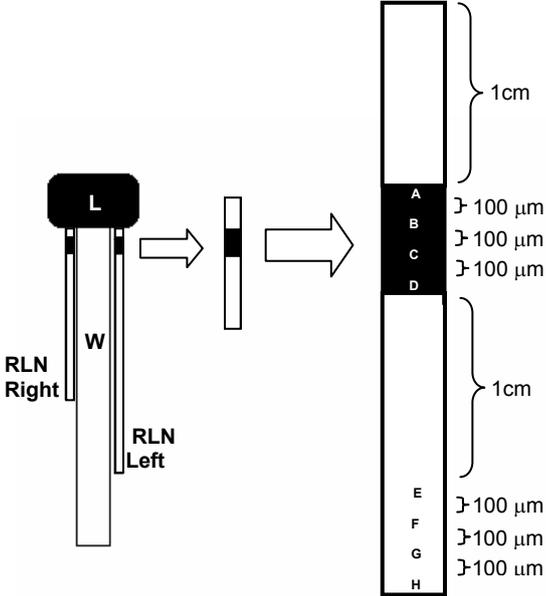


Figure 2

Right RLN

Left RLN

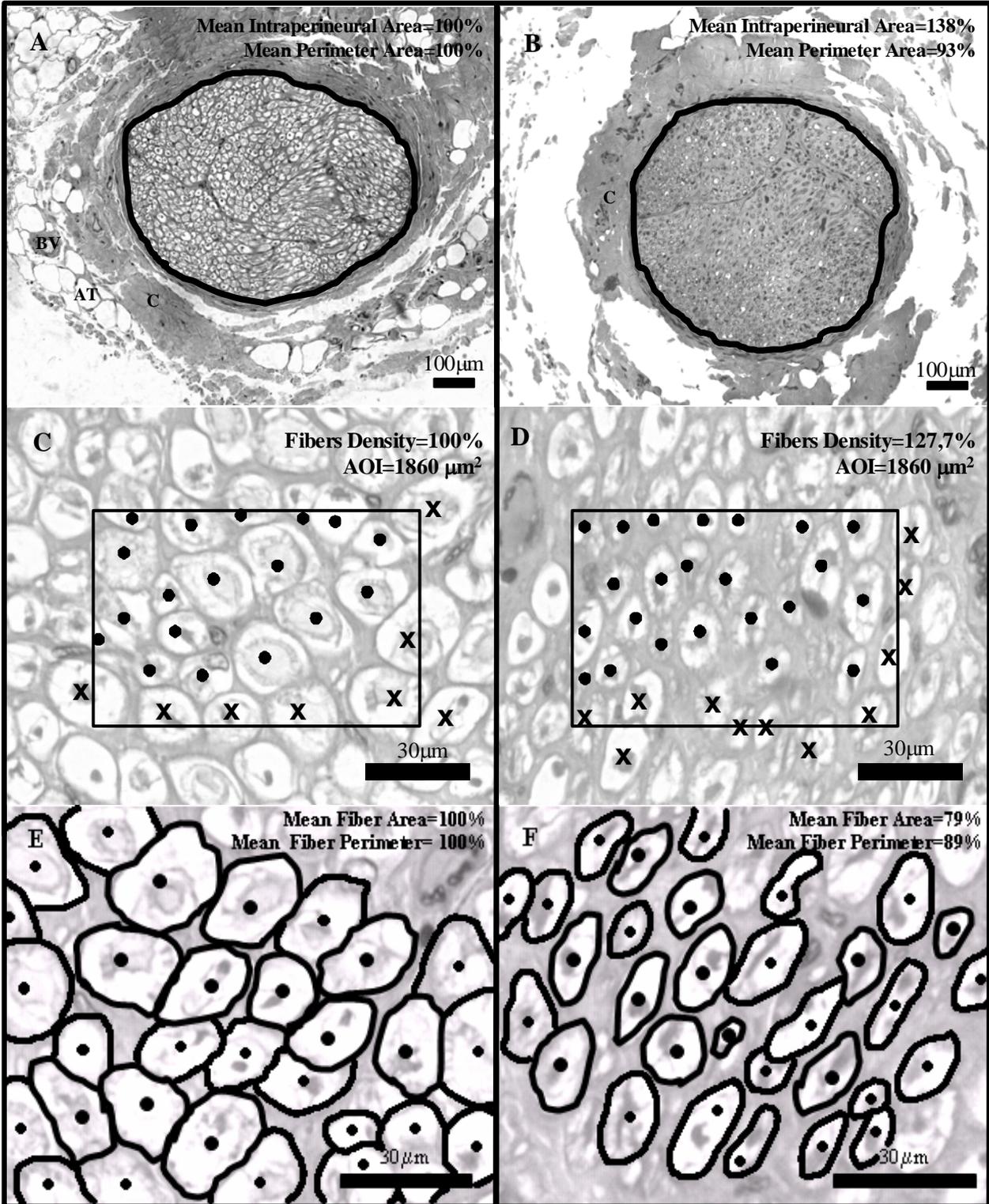


Figure 3

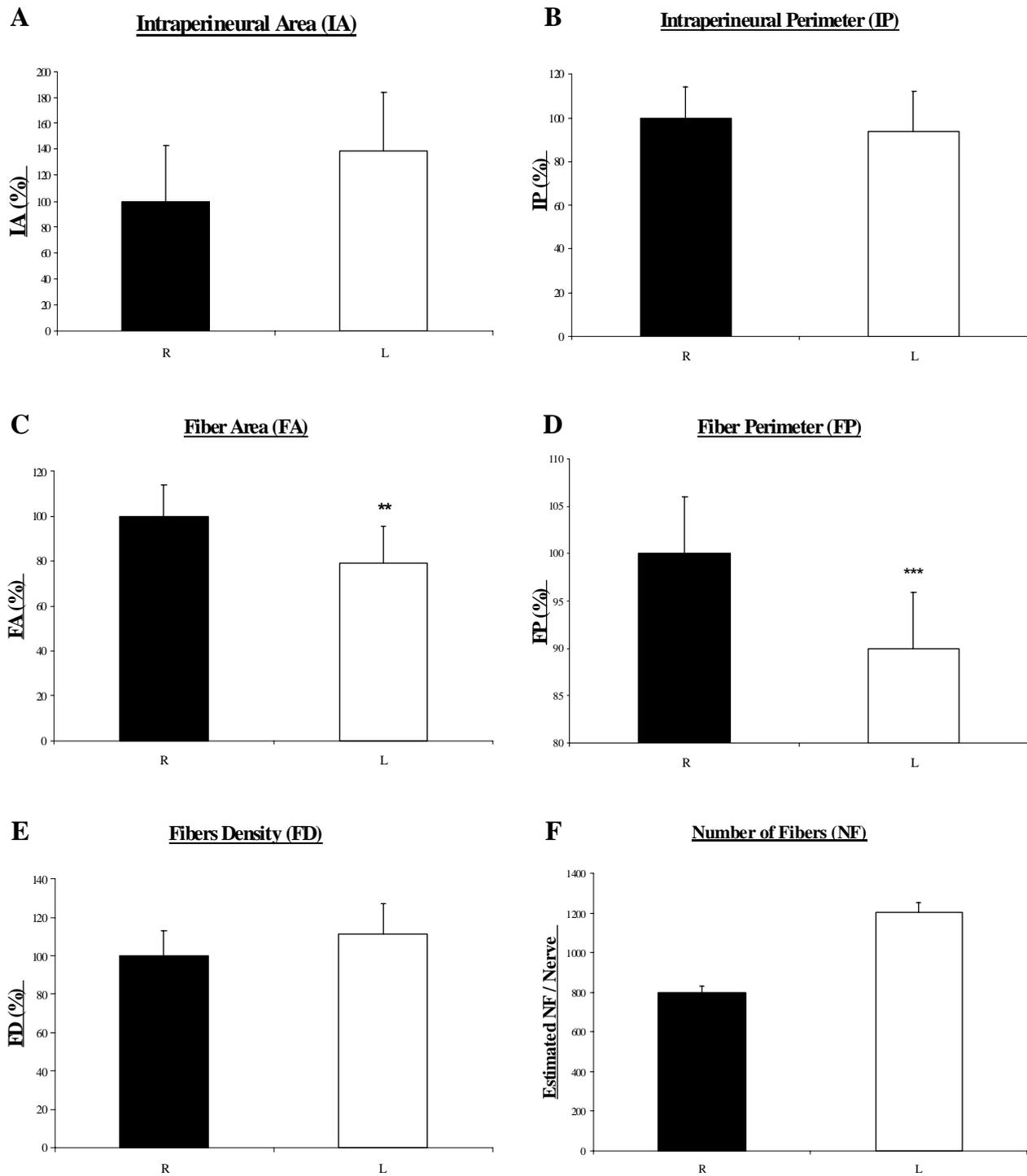


TABLE I

Subjects	Race	Age	Weight (Kg)	Height (m)	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	Δt (minutes)	Cause of the Death
1	White	47	42	1,65	15,44	195	Sudem death
2	Black	21	95	1,78	30,06	255	Gunshot
3	White	37	78	1,64	29,10	255	Sudem death
4	White	43	63	1,77	20,12	525	Hepatic carcinoma
5	White	67	72	1,72	24,40	760	Coronary thrombosis
6	White	82	72	1,74	23,78	465	Sudem death
7	White	45	63	1,63	23,71	350	Multiple trauma
8	Black	30	80	1,84	23,66	708	Gunshot
Total	-	48,85±19,98	70,62±15,47	172,12±7,58	23,78±4,64	439,12±213,35	-

TABLE II

	Age	Weight	Height	BMI
Intraperineural area (R)	r=-0.445 p=NS	r=0.2414 p=NS	r=-0.5065 p=NS	r=0.013 p=NS
Intraperineural area (L)	r=-0.278 p=NS	r=0.5691 p=NS	r=-0.2545 p=NS	r=-0.53 p=NS
Intraperineural perimeter (R)	r=0.017 p=NS	r=0.2334 p=NS	r=-0.5385 p=NS	r=-0.01 p=NS
Intraperineural perimeter (L)	r=-0.21 p=NS	r=0.6391 p=NS	r=-0.0144 p=NS	<b>r=0.76</b> <b>p=0.02*</b>
Fiber area (R)	r=-0.27 p=NS	<b>r=0.7902</b> <b>p=0.0196*</b>	r=0.0801 p=NS	<b>r=0.84</b> <b>p=0.007**</b>
Fiber area (L)	r=-0.085 p=NS	r=0.3603 p=NS	r=-0.241 p=NS	r=-0.50 p=NS
Fiber perimeter (R)	r=-0.049 p=NS	<b>r=0.8023</b> <b>p=0.0166*</b>	r=0.1422 p=NS	<b>r=0.84</b> <b>p=0.008**</b>
Fiber perimeter (L)	r=0.1948 p=NS	r=0.4315 p=NS	r=-0.1521 p=NS	r=0.55 p=NS
Fiber density (R)	r=0.49 p=NS	r=-0.2889 p=NS	r=-0.3153 p=NS	r=-0.43 p=NS
Fiber density (L)	r=-0.14 p=NS	r=0.0569 p=NS	r=-0.5878 p=NS	r=-0.19 p=NS
Total number of fibers (R)	r=-0.29 p=NS	r=-0.2889 p=NS	r=-0.3153 p=NS	r=-0.09 p=NS
Total number of fibers (L)	r=-0.28 p=NS	r=0.0569 p=NS	r=-0.5878 p=NS	r=0.43 p=NS

## 5 CONCLUSÕES

---

Os dados apresentados neste estudo mostram uma evidente assimetria entre os nervos laríngeos recorrentes direito e esquerdo; tanto em seu comprimento médio, quanto na área e perímetro total das fibras nervosas que os compõem. Frente a estes resultados, pode-se presumir que a velocidade de condução do impulso nervoso em ambos os nervos é diferente; pois não há nenhum indício morfológico que permita que ambos os nervos tenham velocidades iguais. Estes dados provêm evidências de que o nervo esquerdo deva apresentar um leve retardo em sua velocidade de condução do impulso elétrico, quando comparado ao nervo direito.

Não houve correlações significativas entre a idade e altura dos indivíduos que compõem a amostra, com os parâmetros morfométricos de ambos os lados. Entretanto, observou-se uma correlação positiva entre o peso dos indivíduos e a área e perímetro das fibras nervosas do lado direito, mostrando-se significativa, ou seja, à medida que o peso aumenta a área e o perímetro das fibras do lado direito também aumentam.

A correlação entre o Índice de Massa Corporal e os demais parâmetros morfométricos, mostrou-se somente significativa para o perímetro intraperineural do lado esquerdo e a área e perímetro das fibras do lado direito; sendo todas elas também positivas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALVES, E. Anatomia descritiva. São Paulo: Atheneu, 1965. 750 p.

BARKMEIER, J. M.; LUSCHEI, E. S. Quantitative analysis of the anatomy of the epineurium of the canine recurrent laryngeal nerve. *J. Anat.* 196:85-101, 2000.

CAVANAUGH, K., PARK, A.H. Recurrent laryngeal nerve monitoring during cricotracheal resection. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 109:654-7, 2000.

COSENZA, R. M. Fundamentos de neuroanatomia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 138 p.

CUNNING, D. S. Unilateral vocal cord paralysis. *Annals of Otology, Rhinology, & Laryngology.* 64:487-493, 1955.

CRARY, M.A., GLOWASKI, A.L. Vocal fold immobility. *In: BROWN, W., VINSON, B, CRARY, M. Organic voice disorders assessment and treatment.* San Diego: Singular, 1996.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 2ª

ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 671 p.

ESTRELA, F., Relação anatômica entre o ramo externo do nervo laríngeo superior e a glândula tireóide em cadáveres humanos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Neurociências – Mestrado e Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. 57 p.

FAWCUS, M. (Ed.) Voice disorders and their management. 2<sup>a</sup> ed. San Diego: Singular, 1992.

FIGÚN, M. E.; GARINO, R. R. Anatomia Odontológica Funcional e Aplicada. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Panamericana, 1994. 668 p.

GACEK, R.R.; LYON, M. J. Fiber components of the recurrent laryngeal nerve in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 85:480-91, 1976.

GAMBINO, D. R.; MALMGREN, L. T.; GACEK, R. R. Age-related changes in the neuromuscular junctions in the human posterior cricoarytenoid muscles: A quantitative study. *Laryngoscope.* 100:262-268, 1990.

GARDNER, E.; GRAY D. J.; RAHILLY R. Anatomia: estudo regional do corpo humano. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 815 p.

HARRISON, D. F. Fibre size frequency in the recurrent laryngeal nerves of man and giraffe. *Acta Otolaryngol.* 91:383-9, 1981.

YALCIN, B. Anatomic configurations of the recurrent laryngeal nerve and inferior thyroid artery. *Surgery.* 139:181-7, 2006.

KRUSE, E.; OLTHOFF, A.; SCHIEL, R. Functional anatomy of the recurrent and superior laryngeal nerve. *Langenbecks Arch Surg.* 391:4-8, 2006.

LU S.; GOTO, N.; GOTO, J.; TAJIMA, N.; ISHIKAWA, H. Morphometric analysis of myelinated axons in human vagus nerve. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 78(1):1-5, 2001.

MACHADO, A. *Neuroanatomia funcional.* 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 363 p.

MARANILLO, E.; LEON, X; ORUS, C.; QUER, M.; SANUDO, J. R. Variability in nerve patterns of the adductor muscle group supplied by the recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope.* 115:358-362, 2005.

MCMINN R.H.M. *Last s Anatomy.* ed. 8. New York, Churchill Livingstone, 1990.

MARTIN, J. H. Neuroanatomia: texto e atlas. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 574 p.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. Anatomia orientada para a clínica. 4ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara, 2001. 1021 p.

MOREAU, S.; GOULLET, R. M.; BABIN, E.; SALAME, E.; DELMAS, P.; VALDAZO, A. The recurrent laryngeal nerve: Related vascular anatomy. Laryngoscope. 108:1351-1353, 1998.

MORTELLITI, A. J.; MALMGREEN, L. T.; GACEK, R. R. Ultrastructural changes with age in the human superior laryngeal nerve. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 116:1062-9, 1990.

NAKAI T.; GOTO N.; MORIYAMA H.; SHIRAISHI N.; NONAKAN N. The human recurrent laryngeal nerve during the aging process. Okajimas Folia Anat Jpn. 76(6):363-7, 2000.

NAVARRO, J. A. C.; FILHO, J. T.; ANDREA, J. C.; SILVA, H. S.; BANHARA, M. R. Contribuição ao estudo anatômico da inervação dos músculos cricoaritenóideos posterior e lateral. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. 69 (6):740-743, 2003.

PÉRIÉ, S., LACCOURREYE, O., BOU-MALHAB, F., BRASNU, D. Aspiration in

unilateral recurrent laryngeal nerve paralysis after surgery. *Am. J. Otolaryngol.* 19(1):18-23, 1998.

PREMACHANDRA, D. J.; RADCLIFFE, G. J.; STEARNS M. P. Intraoperative identification of the recurrent laryngeal nerve and demonstration of its function. *Laryngoscope.* 100:94-96, 1990.

PROCACCIANTE, F., PICOZZI, P., PACIFICI, M., PICCONI, S., RUGERI, S., FANTINI, A., BASSO, N. Palpatory method used to identify the recurrent laryngeal nerve during thyroidectomy. *World J. Surg.* 24:571-3, 2000.

REZENDE, J. M. *Linguagem Médica.* 3 ed. São Paulo: AB Editora e Distribuidora de Livros Ltda, 1992.

SCHNITZLEIN, H. N.; ROWE, L. C.; HOFFMAN, H.H. The myelinated component of the vagus nerve in man. *Anat Rec.* 131:649-667, 1958.

SCHWEIZER, V.; DORFL, J. The anatomy of the inferior laryngeal nerve. *Clin Otolaryngol.* 22:362-369, 1997.

SHINDO, M. L., WU, J. C., PARK, E. E. Surgical Anatomy of the Recurrent Laryngeal Nerve Revisited. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 133:514-519, 2005.

SKINNER, H. A. The origin of medical terms. 2.ed. Baltimore, Williams, Wilkins, 1961. 313 p.

SOBOTTA, J. Atlas de Anatomia Humana. 21<sup>a</sup> ed. Volume 1. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. 405 p.

SUNDERLAND, S.; SWANEY, W. E. The intraneural topography of the recurrent nerve in man. *Anatomical Record*. 114:411-426, 1952.

THOMUSCH, O.; SEKULLA, C.; TIMMERMANN, W.; NEUMANN, H. J.; KRUSE, E.; MUHLIG, H. P.; HAMELMANN W. H.; RICHTER, C.; VO, J.; DRALLE, H. Intraoperative neuromonitoring in thyroid surgery – results of the German prospective multicentre study. *Eur Surg*. 35:240-245, 2003.

TIAGO, R. S. L.; MUNHOZ, M. S. L.; FARIA, F. P., GUILHERME, A. Aspectos histomorfométricos do nervo laríngeo superior. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 68 (2):157-165, 2002.

VESALIUS, Andreas. *De humani corporis fabrica: epítome: tabulae sex*. São Paulo: Ateliê Editorial, 2002. 262 p.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER H. L. *Gray*

Anatomia. 37 ed. Volume 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.  
1489 p.

ZEMLIN, W.R. Princípios de Anatomia e Fisiologia em Fonoaudiologia. 4<sup>a</sup> ed.  
Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 624 p.

## **ANEXOS**

ANEXO A

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**CARTA DE APROVAÇÃO**

pro.x.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2006589

**Título :** AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE EM CADÁVERES HUMANOS.

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
GERALDO PEREIRA JOTZ	PESQ RESPONSÁVEL	jotz.voz@terra.com.br	33163146
DEIVIS DE CAMPOS	PESQUISADOR	dcampos@unisc.br	
LEDER LEAL XAVIER	PESQUISADOR		33167604

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 10 , ata nº 76 , de 21/9/2006 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 8 de novembro de 2006

  
**LUIZ CARLOS BOMBASSARO**  
 Coordenador do CEP-UFRGS

ANEXO B**INSTITUTO GERAL DE PERÍCIAS – DEPARTAMENTO MÉDICO-LEGAL  
CONSETIMENTO LEGAL / TERMO DE COMPROMISSO**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I. A complexa inervação da laringe, aliada as dificuldades na comprovação funcional dos ramos nervosos para a laringe, tem motivado o surgimento de um vasto número de pesquisas, especialmente àquelas relacionadas ao nervo laríngeo recorrente, definido na literatura como um dos mais importantes ramos do nervo Vago. Sabe-se que lesões do nervo laríngeo recorrente acarretam modificações do comportamento vocal (disfonias) e do processo de deglutição (disfagia), observados na Clínica Otorrinolaringológica e de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Considerando a importância deste nervo no que se refere ao controle do mecanismo da fonação, propusemo-nos a realizar este trabalho, que tem por objetivo estudar a morfometria do nervo laríngeo recorrente bilateralmente, em cadáveres humanos. O uso de tecidos humanos permite a detecção de alterações inerentes ao processo de envelhecimento, que não podem ser detectadas quando se utiliza modelos animais com período de sobrevivência relativamente curto (ratos).

A importância de buscar conhecer melhor a morfometria do nervo laríngeo recorrente, está em procurar compreender melhor seus aspectos funcionais desempenhados sobre a laringe e, também, poder planejar com mais segurança atos cirúrgicos próximos a esta via nervosa.

II. Para este estudo, estudar-se-ão 20 (vinte) cadáveres humanos do sexo masculino, com idade superior a 18 anos, com menos de 24 horas de *pós-mortem*, e que tenham sofrido óbito por causas extracervicais. Os procedimentos experimentais exigirão a retirada de material biológico (será extraído um segmento de 1 (um) centímetro do nervo laríngeo recorrente, na altura da 1ª, 2ª e 3ª cartilagens traqueais, bilateralmente), para análise histológica. Salientando que a coleta do material não provocará desfiguramento no cadáver. Não haverá alteração no plano de dissecação da necropsia e nem no tempo de devolução do indivíduo para seus familiares.

III. Todos os procedimentos serão realizados na sala de necropsia do Departamento Médico Legal (DML) de Porto Alegre / RS.

IV. Este projeto não apresenta patrocinadores.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que, eu Dr. Francisco Silveira Benfica, Chefe da Seção de Ensino e Pesquisa – DML, na condição de responsável legal pelas pesquisas no Departamento Médico Legal, autorizo a realização dos procedimentos relacionados a este projeto de pesquisa nos corpos sob nossa responsabilidade, dentro dos preceitos éticos da Legislação Vigente.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e excluir este indivíduo sob minha responsabilidade legal da participação neste estudo;

- da garantia de que o indivíduo sob minha responsabilidade legal não será identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

O pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa: “Avaliação Morfométrica do Nervo Laríngeo Recorrente em Humanos” é o Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz, CRM 17270, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Instituição em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Os telefones de contato do referido pesquisador são: 51-33163146 / 81239869

---

Dr. Francisco S. Benfica  
Chefe da Seção de Ensino e Pesquisa – DML

---

Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz  
Pesquisador

(data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

**Observação:** o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do DML e outra com o Pesquisador Responsável.

ANEXO C

Page 1 of 1

**Leder Leal Xavier**

---

**De:** em.lscope.0.8a368.df3d03d1@editorialmanager.com em nome de The Laryngoscope **Enviada:** ter 29/1/2008 05:49  
**Para:** Leder Leal Xavier  
**Cc:**  
**Assunto:** Submission Confirmation for Histological asymmetry of the human recurrent laryngeal nerve  
**Anexos:**

Dear Dr Xavier,

Your submission entitled "Histological asymmetry of the human recurrent laryngeal nerve" has been received by The Laryngoscope.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://lscope.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Reviewer has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Jackie Lynch  
Senior Editorial Coordinator  
The Laryngoscope