GUSTAVO POLACOW KORN

CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM PREGAS VOCAIS DE INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO POLACOW KORN

CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM PREGAS VOCAIS DE INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador:
Profª. Drª. Noemi Grigoletto De Biase

Coorientador:
Prof. Dr. João Roberto Maciel Martins

São Paulo
2009

Korn, Gustavo Polacow

Concentração de ácido hialurônico em pregas vocais de indivíduos jovens e idosos. / Gustavo Polacow Korn. – São Paulo, 2009.

xii, 42f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Título em inglês: Concentration of hyaluronic acid in human vocal folds in young and old subjects.

1. Cordas Vocais. 2. Ácido Hialurônico 3. Análise Quantitativa. 4. Idoso. 5. Cadáver.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

Chefe do Departamento:
Prof. Dr. Paulo Augusto de Lima Pontes, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia, do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Coordenador do Curso de Pós-graduação:
Prof. Dr. Luc Louis Maurice Weckx, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia Pediátrica, do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Dedicatória

Aos meus pais, Davi e Célia,
minha profunda gratidão pelo carinho, dedicação,
amor, admiração e incentivo, ensinando-me os valores essenciais da vida.

À minha irmã Sandra,
pela convivência e apoio sempre que precisei.

À memória saudosa
dos meus avós paternos
Samuel e Rebeca, e minha avó materna Hilda.

Ao meu avô
materno, Tuia,
pelo amor sempre presente.

À minha noiva, Andrea Mifano,
pelo carinho, amor, admiração,
companheirismo e incentivo em todos os momentos.

Agradecimentos

À Profª. Drª. NOEMI GRIGOLETTO DE BIASE, orientadora, pelo rigor científico, conhecimento e contribuição na minha formação, além do valioso incentivo e inestimável amizade.

Ao Prof. Dr. JOÃO ROBERTO MACIEL MARTINS, coorientador, pela participação constante e direta em todos os momentos da análise do material, rigor científico, conhecimento e contribuição na minha formação, além da contínua amizade.

À Profª. ELSA YOKO KOBAYASHI, pela amizade, apoio, incentivo e auxílio em todos os momentos necessários.

Ao Prof. Dr. LUC LOUIS MAURICE WECKX, coordenador do programa de pós-graduação do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP-EPM, pelo constante apoio e incentivo. Abrindo todas as portas, mostrou a melhor disposição para ajudar em tudo o que fosse preciso, impulsionando minha carreira do ponto de vista acadêmico-profissional.

Ao Prof. Dr. PAULO AUGUSTO DE LIMA PONTES, por todos os ensinamentos, contribuição à minha formação, amizade, apoio e incentivo contínuos. Exemplo de mestre e profissional, porém de magnitude difícil de ser atingida. Permanecerei eternamente seu devedor pela abertura de portas no campo da otorrinolaringologia, como mestre dedicado e magnânimo ao compartilhar seus conhecimentos.

Aos Profs. Drs. HELOÍSA HELENA CAOVILLA GANANÇA E MAURÍCIO MALAVASI GANANÇA, expoentes na Otoneurologia, pela amizade e apoio. Acreditando no meu potencial, abriram as portas do Departamento, orientaram-me na dissertação do mestrado e mantêm continuamente seus apoios incondicionais. Indubitavelmente são responsáveis pelo meu contínuo interesse na Otoneurologia.

Ao colega de pós-graduação, SUNG WOO PARK, por todo o apoio e auxílio na coleta de material para esse estudo.

Ao Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO GONÇALVES PASQUALUCCI, Diretor do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital – SP, e ao Sr. NILTON FONTES NEUMAN, por todo o apoio e auxílio na viabilidade de obtenção de laringes para o presente estudo.

Aos funcionários do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital – SP, Srs. MARCOS WEINBERGER, JOILSO ALVES DE SOUZA, DOUGLAS GONÇALVES, JOÃO TEIXEIRA PRADO, OSVALDO PEREIRA DE MORAIS, ROGERIO VIEIRA FLOR, PAULO SOUZA CAETANO, JOSÉ ALCIDES OMENA, MARCOS FERRAZ DE CAMPOS, ROBSON PATERNO GREGÓRIO, pelo auxílio na obtenção das laringes.

À biomédica, ALINE MENDES, por todo o apoio e auxílio no processamento do material.

À minha secretária DANIELE CRISTINA VELOSO, pelo apoio incondicional, incentivo e amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação, Srª. MARIA JOSÉ DA SILVA e Srta. ADALVA GOMES DE LIMA, pelo apoio incondicional, incentivo e amizade.

Às Srªs. PAULA GOLDENSTEIN STRASSMANN, SILVIA REGINA LAMAS e PRISCILA NEGREIROS, pelo incentivo e amparo no tratamento estatístico.

À CAPES, pelo seu apoio financeiro.

"AOS MORTOS QUE

ANONIMAMENTE ENSINAM OS VIVOS"

Índice

Dedicatória.....iv
Agradecimentos.....v
Lista de figuras ix
Lista de tabelas.....x
Lista de abreviaturas xi
Resumo xii

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. OBJETIVO..... 10

3. MÉTODO 12

4. RESULTADOS 23

5. DISCUSSÃO..... 32

6. CONCLUSÕES..... 37

7. REFERÊNCIAS 39

ANEXO

Abstract

Bibliografia consultada

Lista de figuras

Figura 1. Unidade dissacarídica básica dos glicosaminoglicanos 3

Figura 2. Obtenção da laringe durante a necropsia 13

Figura 3. Laringe isolada 14

Figura 4. Transporte sob refrigeração até o laboratório 14

Figura 5. Local de dissecção auxiliado por sistema de vídeo 16

Figura 6. Decorticação assistida por vídeo.....16

Figura 7. Prega vocal após a decorticação da cobertura evidenciando-se o ligamento vocal 17

Figura 8. Lavagem das placas.....18

Figura 9. Adição de 100µl da sonda biotinilada (1mg/ml) 1:10.000 em tampão de ensaio 19

Figura 10. Placas agitadas por 2 horas 19

Figura 11. Mesmo equipamento utilizado para adição de 100µl/poço de estreptavidina marcada com európio, e para adição de uma solução de Enhancement.....20

Figura 12. Fluorímetro modelo Victor 2 com a placa para a leitura do AH. 21

Figura 13. Processo de leitura do fluorímetro Victor 2 21

Figura 14. Curva de concentração do AH 22

Figura 15. Box-plot da concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas por sexo e faixa etária na cobertura e no ligamento.....27

Figura 16. Box-plot da concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas por sexo e faixa etária na camada muscular. 28

Figura 17. Intervalo de confiança da média de AH (µg/g de peso seco) para sexo e faixa etária na cobertura e no ligamento. 29

Figura 18. Intervalo de confiança da média de AH (µg/g de peso seco) para sexo e faixa etária no músculo. 29

Lista de tabelas

Tabela 1. Medidas da concentração de AH segundo o sexo observado no estudo de Lebl et al., 2007. 7

Tabela 2. Análise descritiva geral da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.....24

Tabela 3. Análise descritiva por sexo da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.....24

Tabela 4. Análise descritiva por faixa etária da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.....25

Tabela 5. Análise descritiva por sexo e faixa etária da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.....26

Tabela 6. Comparações por sexo e faixa etária com relação à concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas. 28

Tabela 7. Comparação da concentração do AH (µg/g de peso seco) nas regiões: Cobertura, Ligamento e Músculo.....30

Tabela 8. Comparação da concentração do AH (µg/g de peso seco) nas regiões: Lâmina, Ligamento e Músculo, por sexo e faixa etária.....31

Lista de abreviaturas

AH	Ácido hialurônico
BSA	Albumina sérica bovina/ bovine serum albumin
GAG(s)	Glicosaminoglicanos
LP	Lâmina própria
PV	Prega vocal
PPVV	Pregas vocais

Resumo

Objetivo: avaliar comparativamente a concentração de ácido hialurônico na cobertura, ligamento e músculo de prega vocal normal de homens e mulheres, jovens e idosos. **Método:** Utilizou-se uma proteína de ligação ao ácido hialurônico (AH) obtida de cartilagem nasal bovina em um ensaio fluorimétrico. Placas de ELISA contendo a proteína de ligação adsorvida em sua superfície foram sequencialmente incubadas com: amostras de material da porção medial da cobertura, ligamento e músculo da prega vocal de 19 indivíduos jovens e 20 idosos, de ambos os sexos, proteína de ligação conjugada com biotina e estreptavidina ligada a europio. Após a liberação de europio em solução de enhancement, a fluorescência final foi mensurada com auxílio de um fluorímetro. **Resultado**: Comparação estatisticamente significante: (1) Maior concentração de AH na cobertura e no ligamento em relação ao músculo em toda a amostra; (2) Maior concentração de AH no ligamento em relação ao músculo nos jovens dos sexos masculino e feminino, considerando-se separadamente cada grupo. Dados sem significância estatística: (3) Maior concentração de AH no ligamento em relação às demais porções; (4) Maior quantidade de AH nas mulheres jovens na cobertura e menor no ligamento em comparação com homens jovens; (5) Queda nos valores de AH com o envelhecimento sendo mais pronunciada na cobertura no sexo feminino e em todas as porções no sexo masculino; (6) Diminuição dos valores de AH foi observada nos indivíduos idosos do sexo masculino, em todas as porções, mantendo a diferença entre os sexos na cobertura. **Conclusão:** Do estudo de concentração de ácido hialurônico em pregas vocais de jovens e idosos, podemos concluir que: há maior concentração de AH na cobertura e no ligamento em relação ao músculo em toda a amostra; é encontrada maior concentração de AH no ligamento em relação ao músculo nos jovens de ambos os sexos, considerando-se separadamente cada grupo.

1. INTRODUÇÃO

A prega vocal (PV) humana é uma estrutura complexa constituída pela mucosa e pelo músculo, adaptados para a fonação. A mucosa contém uma camada de epitélio, composto por células escamosas não queratinizadas, e a lâmina própria (LP), localizada mais profundamente. A camada muscular subjacente é formada pelo músculo tireo-aritenóideo (Butler et al., 2001).

A LP pode ser estratificada em três camadas de tecido conectivo, baseadas na distribuição de fibras elásticas e de colágeno: (1) camada superficial, também denominada espaço de Reinke, frouxa e complacente, que contém poucos componentes fibrosos; (2) camada intermediária, abundante em fibras elásticas; (3) camada profunda, abundante em fibras colágenas. As camadas intermediária e profunda formam o ligamento vocal (Hirano, 1981; Butler et al., 2001).

A vibração das PPVV depende principalmente da estrutura e composição da matriz extracelular da camada superficial da LP, sendo que uma alteração na sua composição pode resultar em uma perda da vibração normal. Assim, a LP tem uma importante participação na produção vocal, bem como o formato e a tensão das PPVV que determinam sua vibração (Thibeault, 2005).

O ácido hialurônico (AH) é um dos componentes mais proeminentes entre as proteínas intersticiais da matriz extracelular, que apresenta importantes funções biológicas e mecânicas nos tecidos. Na LP, apresenta relevante impacto biológico e mecânico nas propriedades das PPVV (Ward et al., 2002).

O AH é um polissacarídeo linear formado por resíduos de ácido glucurônico e N-acetil-glucosamina que se alternam, como demonstrado na figura 1. Descoberto em 1934 por Meyer e Palmer (1934), o nome deriva de *hyalos*, que significa vítreo, pois esse composto foi inicialmente isolado no corpo vítreo do olho (Laurent, 1987). As cadeias de AH formam uma rede emaranhada tridimensional, que apresenta importantes propriedades fisiológicas: (1) resistência ao fluxo de água por meio dos compartimentos do tecido, sendo uma das funções do AH a formação de barreiras contra mudanças rápidas no conteúdo de água; (2) pressão osmótica, um importante fator na homeostase de água no tecido, fortemente dependente da concentração em regiões semidiluídas; (3) efeito de exclusão, de forma que, quanto mais estreita a rede da cadeia e maior o tamanho da molécula de soluto, maior a exclusão; (4) e

efeito no transporte molecular, sendo que a rede de polissacarídeo age como uma peneira ou um filtro para as outras moléculas que estão se difundindo por meio do compartimento ao longo do espaço extracelular. Além disso, o AH está envolvido em atividades celulares como: (1) controle da morfogênese e da diferenciação; (2) interação com leucócitos; (3) fenômenos inflamatórios, tumorigênese e cicatrização tecidual (Laurent, 1987; Laurent et al., 1995; Thibeault et al., 2004; Santos et al., 2005; Passerotti et al., 2006; Almond, 2007; Itano, 2008).

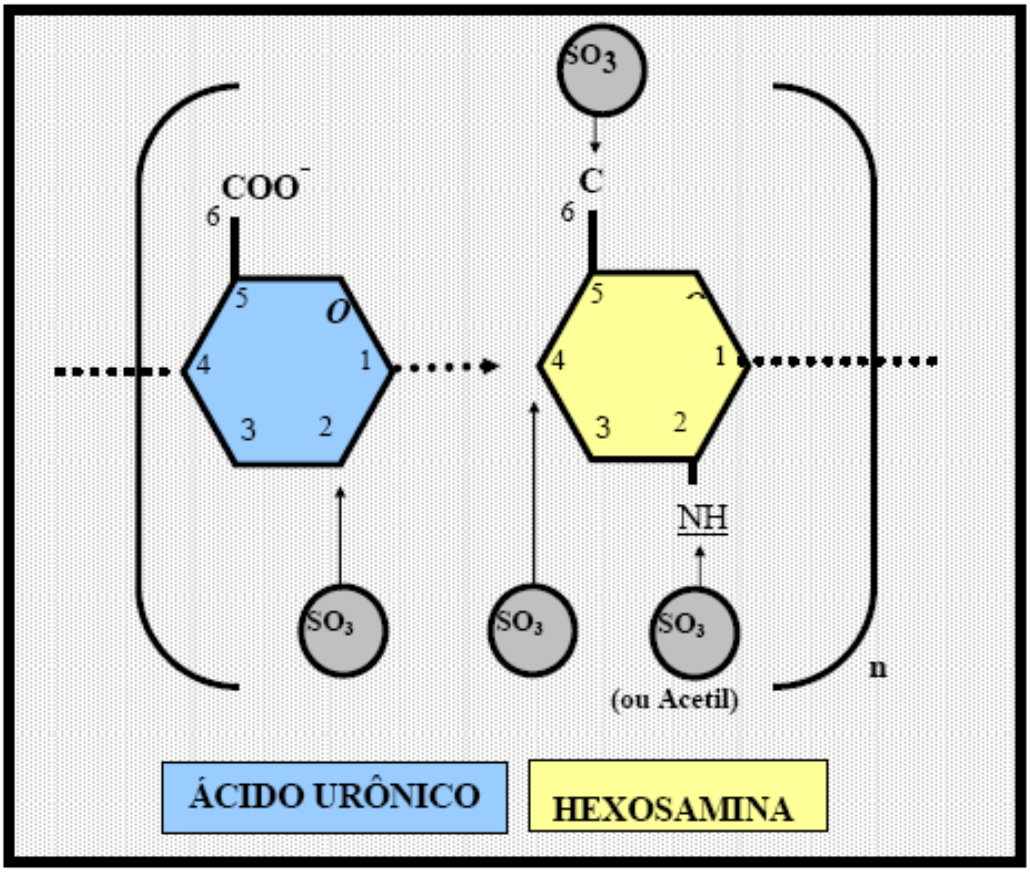

Figura 1. Unidade dissacarídica básica dos glicosaminoglicanos

O AH é um membro da família de macromoléculas denominada glicosaminoglicanos (GAGs), antigamente chamadas de mucopolissacarídeos (Jeanloz, 1960). Entre os GAGs, o AH é o que apresenta a estrutura mais simples, constituída por um polissacarídeo linear formado por uma sequência repetida de até 25000 unidades de dissacarídeos de ácido glucurônico e N-acetil-glucosamina. (Butler et al., 2001). É considerado como singular entre os GAGs, pois não é

sulfatado ou modificado de nenhuma forma ao longo do seu comprimento (Almond, 2007). O AH apresenta um alto peso molecular (>10^6), carrega uma alta densidade de cargas negativas (devido aos grupamentos carboxilas das glucosaminas) e tende a formar um emaranhado randomizado de estrutura em espiral, tornando a matriz extracelular altamente hidratada (Chan et al., 2001).

Estima-se que a quantidade total de AH no adulto esteja em torno de 20 gramas. É produzido na face interna da membrana plasmática de fibroblastos e outros tipos celulares e extruída diretamente para a matriz extracelular, no que difere de outros polissacarídeos extracelulares que são produzidos no complexo de Golgi. A síntese ocorre pela ação da enzima ácido hialurônico sintase, que adiciona açúcares sequencialmente. A degradação ocorre por meio de enzimas denominadas hialuronidases que quebram os polímeros de AH em fragmentos menores (Almond, 2007).

O AH apresenta uma importante função biomecânica no desempenho fonatório da PV, devido a sua estrutura e suas características moleculares. Em solução, o AH forma uma malha de cadeia polissacarídea volumosa polarizada que atrai e regula o conteúdo de água na matriz extracelular. Dessa forma, influencia o tamanho do tecido pelo preenchimento de espaço. Além disso, a propriedade viscoelástica torna a PV preparada para a absorção de choque pelo trauma vibratório na borda livre da PV durante a fonação (Butler et al., 2001).

O método de determinação do AH foi dividido por Laurent em 3 gerações: (primeira geração) mensuração da quantidade de hexosamina ou ácido hexurônico, possibilitando a determinação em torno de 100µg de polissacarídeo; (segunda geração) emprego de uma enzima específica, em particular a hialuronidase do *Streptomyces hyalurolyticus*, resultando em dissacarídeos insaturados, possibilitando quantificar na ordem de 1 µg; (terceira geração) emprego de proteínas com afinidade específica para o AH que podem ser utilizadas analogamente como anticorpos, estendendo o limite de detecção para 1ng, técnica desenvolvida por Tengblad (Laurent, Tengblad, 1980; Laurent, 1987).

Até o momento da redação da tese, apenas três estudos avaliaram a concentração do AH na LP das PPVV (Hammond et al., 1997; Butler et al., 2001, Lebl et al., 2007).

Hammond et al. (1997) realizaram um estudo das características do AH na LP de dezoito PPVV humanas normais (dez homens e oito mulheres, com idade entre 20 e 60 anos), obtidas em até 24 horas *pos mortem*. Foi utilizado um método indireto no qual um corte histológico foi incubado com um reagente para AH ("Müller Mowry colloidal iron") e outro corte submetido ao mesmo processo e tratado com hialuronidade testicular bovina. Os cortes foram analisados por um sistema computadorizado de análise de imagens na qual a subtração da imagem com e sem o tratamento enzimático representou a quantificação do AH. Por esse método indireto, foi observado que: (1) a quantidade de AH na LP é maior nas PPVV masculinas do que nas femininas (3:1); (2) houve grande variação entre os indivíduos, com algumas mulheres apresentando maior concentração da AH na LP do que homens.

Butler et al. (2001) avaliaram a distribuição do AH ao longo de toda a espessura da LP, verificando variações quanto ao sexo e a idade. Foram avaliadas 25 PPVV (obtidas em até 24 horas *pos mortem*): nove homens adultos (34 a 52 anos), sete mulheres adultas (21 a 41 anos), quatro homens idosos (65 a 77 anos) e cinco mulheres idosas (65 a 82 anos). Utilizou-se um sistema de análise de imagens digital, em que foi desenhado um vetor nos cortes cuja direção se dava ao longo de toda a espessura da LP, e as medidas foram realizadas em pequenos quadrados de mesma área dispostos em pontos correspondentes a 15%, 40%, 60% e 80% do comprimento do vetor. Nesse estudo, os valores obtidos nos cortes submetidos ao tratamento pela hialuronidase foram subtraídos dos valores correspondentes nos cortes sem o tratamento enzimático, utilizando-se o mesmo método indireto do estudo de Hammond et al., 1997. Dessa forma, os resultados representaram a proporção do AH em quatro regiões distintas da LP. Observou-se que: (1) as mulheres apresentaram relativamente menos AH na camada mais superficial; (2), porém, apresentaram mais AH nas camadas mais profundas; (3) houve grande variação entre os indivíduos, especialmente na camada superficial no grupo adulto feminino; (4) os homens apresentaram uma distribuição mais homogênea do AH ao

longo das camadas da LP; (5) não houve diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos etários, porém com tendência no grupo geriátrico masculino a apresentar menos AH ao longo da LP.

Da mesma forma, Chan et al. (2001) também observaram o importante papel do AH na determinação das propriedades biomecânicas da cobertura da PV. A presença de GAGs altamente hidratados na matriz extracelular da PV contribui para a manutenção de uma viscosidade ideal, que facilita a fonação, e uma rigidez ideal, importante para a manutenção do controle da frequência vocal fundamental. Neste estudo, as propriedades de viscosidade dinâmica e tensão elástica foram quantificadas por um reômetro em amostras teciduais da camada superficial da LP de cinco PPVV, obtidas em até 18 horas *pos mortem*, com e sem tratamento enzimático com hialuronidase testicular bovina. O tratamento enzimático resultou no decréscimo da tensão elástica em média de 35% e aumento da viscosidade dinâmica de 70% da cobertura da PV (em frequência maior que 1 Hz). Entretanto, houve variações individuais destes parâmetros.

Ward et al. (2002), em um artigo de revisão, referem-se à importância do papel do AH na viscosidade do tecido, absorção de choque e preenchimento de espaço. Essas propriedades são especialmente importantes nas PPVV devido ao constante trauma causado pela ação vibratória da fonação.

Em nosso meio, Lebl et al., em 2007, avaliaram a concentração e a disposição do AH na LP da PV em homens e mulheres adultos, utilizando oito PPVV masculinas e oito PPVV femininas, entre 38 e 68 anos, empregando um método de avaliação direta na pesquisa do AH. Observou-se que: (1) homens e mulheres diferem quanto à concentração média de AH, em todas as seis regiões pesquisadas; (2) as mulheres apresentam média maior que os homens em todas as regiões e a concentração total de AH nas mulheres é aproximadamente o dobro da dos homens (conforme a tabela 1); (3) a maior quantidade de AH encontra-se na região das máculas flavas; (4) a camada superficial da LP apresenta menos AH do que no ligamento vocal; (5) o AH também se encontra nos tecidos dispostos ao redor dos vasos, fibras musculares e na cápsula das glândulas; (6) não há AH no epitélio da PV.

Tabela 1. Medidas da concentração de AH segundo o sexo observado no estudo de Lebl et al., 2007.

Sexo	Média (µg/mg)	Desvio-padrão (µg/mg)
Feminino	8,410	5,562
Masculino	4,480	2,895

Alguns estudos na literatura avaliaram outros componentes da LP em relação à faixa geriátrica.

Hirano et al. (1989), em um estudo histológico de 64 laringes humanas (30 homens e 34 mulheres), de indivíduos entre 70 e 104 anos, observaram as seguintes tendências com o envelhecimento: (1) encurtamento da parte membranosa da PV em homens; (2) espessamento da mucosa no gênero feminino; (3) espessamento da cobertura da PV no gênero feminino; (4) desenvolvimento de edema na camada superficial da LP em ambos os gêneros; (5) adelgaçamento da camada intermediária da LP e seus contornos deteriorados no gênero masculino; (6) fibras elásticas na camada intermediária menos densas e atrofiadas no gênero masculino; (7) espessamento da camada profunda da LP no gênero masculino; (8) fibras colágenas na camada profunda mais densas e fibróticas no gênero masculino.

Sato, Hirano (1997) supõem que as mudanças na estrutura da camada superficial da LP com o envelhecimento sejam responsáveis por uma das mais importantes causas de alteração vocal com o passar da idade. Ao estudarem as características morfogênicas das fibras elásticas na camada superficial da LP das PPVV de idosos, utilizando 10 laringes humanas (5 indivíduos idosos e 5 adultos), verificaram que: (1) a substância amorfa aumentou em quantidade e as microfibrilas tornaram-se menos numerosas; (2) as fibras apresentaram-se em várias direções, em ramos, formando uma complexa rede, as superfícies ásperas, com variação no tamanho das fibras; (3) as fibras presentes nas PPVV dos indivíduos idosos não foram facilmente digeridas pela elastase se comparadas aos adultos mais jovens.

Hammond et al. (1998) estudaram em 19 laringes humanas a mudança na distribuição de elastina relacionada ao gênero e à idade. Nesse estudo, foi observado que: (1) não houve diferenças relacionadas ao gênero; (2) as pregas das crianças apresentaram 23% da elastina encontrada em adultos, e nas pregas de indivíduos idosos apresentaram 879% da elastina encontrada em adultos; (3) a camada intermediária, local da LP com maior quantidade de elastina presente, apresentou-se maior nos indivíduos geriátricos do que nos adultos e crianças; (4) o diâmetro das fibras aparentou ser maior nas PPVV dos indivíduos geriátricos, ao passo que nos indivíduos pediátricos parecia ser menor e em forma de espiral.

Sato, Hirano (1998) estudaram as mudanças nas glândulas laríngeas humanas de 5 idosos e 3 jovens. Observaram que as mudanças morfológicas que ocorrem com a idade não influenciam apenas a quantidade, mas também a qualidade da secreção, acarretando diminuição da lubrificação das PPVV e alteração parcial da função laríngea.

Hammond et al. (2000) estudaram 38 laringes humanas de homens e mulheres, nas idades adultas, geriátricas e infantis. Observou-se: (1) aumento no conteúdo de colágeno da infância para a faixa geriátrica; (2) as pregas da faixa pediátrica apresentaram 51% do colágeno encontrado na faixa adulta e geriátrica; (3) não houve diferença significante entre as PPVV na faixa adulta e geriátrica; (4) pregas do gênero feminino, tanto adultas como idosas, apresentaram 59% do colágeno encontrado nas pregas de adultos e idosos do gênero masculino; (4) o padrão de distribuição de colágeno demonstrou que a maior parte deste estava situada na camada profunda da LP.

Sato et al. (2002) estudaram 12 laringes humanas de homens e mulheres, sendo 10 provenientes de indivíduos idosos e 2 de adultos jovens. Observou-se que nas mucosas envelhecidas: (1) nos homens, houve aumento das fibras colágenas e diminuição das reticulares; (2) as fibras colágenas, com alta densidade, formam um feixe; (3) houve diminuição do espaço entre as fibras colágenas e o espaço intersticial da matriz extracelular; (4) houve diferença no diâmetro das fibrilas colágenas e irregularidade do contorno das mesmas; (5) houve presença de fibrilas colágenas torcidas; (6) ocasionalmente, densas massas de fibras colágenas e tecido fibroso foram observadas na mucosa; (7) ocasionalmente, houve aumento das fibras

colágenas em toda a extensão da camada profunda para a camada superficial da mucosa, podendo-se concluir que não havia estrutura em camadas.

Em nosso meio, Ximenes Filho et al. (2003) estudaram 20 laringes humanas e fragmentos de pele de homens e mulheres, sendo 10 provenientes de indivíduos do gênero masculino e 10 do gênero feminino. Observou-se: (1) nas PPVV diminuição da espessura da LP e da densidade de células no epitélio, como função da idade; (2) na pele, redução da espessura do córion e da densidade de células no epitélio; (3) mudanças mais evidentes no sexo masculino.

Kahane (1987) cita que existem diferenças entre os gêneros no envelhecimento da laringe, sendo que as mudanças na laringe masculina são mais acentuadas e ocorrem antes do que na laringe feminina. No sexo masculino algumas mudanças histológicas são verificadas a partir da terceira década, evidenciando-se mais claramente a partir da quinta ou sexta décadas de vida. As alterações nas mulheres somente acontecem mais tardiamente, depois da quinta década.

Apesar da existência de alguns artigos sobre componentes da LP da PV humana, apenas no estudo de Butler et al. (2001) foi pesquisado o AH em indivíduos idosos. Porém, foi utilizado um método indireto. Um estudo usando método direto e específico para a pesquisa de AH, não apenas na LP, mas também no músculo vocal traria contribuição importante para o conhecimento da participação do AH na produção vocal. Dessa forma, surgiu o interesse em pesquisar o AH em todas as porções da PV (LP, tanto a camada superficial como o ligamento vocal, e no músculo).

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar comparativamente a concentração de ácido hialurônico na cobertura, ligamento e músculo de prega vocal normal de homens e mulheres nos grupos de jovens e de idosos.

3. MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê em Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (protocolo 0036/07), conforme anexo.

Para este estudo prospectivo utilizamos 20 pregas vocais (PPVV) obtidas em necropsias de 20 cadáveres (10 homens e 10 mulheres), com idade igual ou superior a 60 anos, e 19 pregas vocais obtidas em necropsias de 19 cadáveres (10 homens e 9 mulheres), com idades entre 18 e 50 anos, sem história de intubação prévia próxima do óbito, sem lesão de laringe envolvida na *causa mortis*, com menos de 12 horas de óbito. Também foram excluídos casos conhecidos de septicemia, doenças infecciosas como HIV, hepatites e quadros de alcoolismo. O local de obtenção das laringes foi o Serviço de Verificação de Óbitos da FMUSP. Após a retirada, o material foi imediatamente transportado em um recipiente com gelo até o laboratório de dissecção de peças (Figuras 2, 3 e 4), sendo que o tempo total, desde a constatação do óbito até o final do processamento do material no laboratório, não ultrapassou 12 horas.

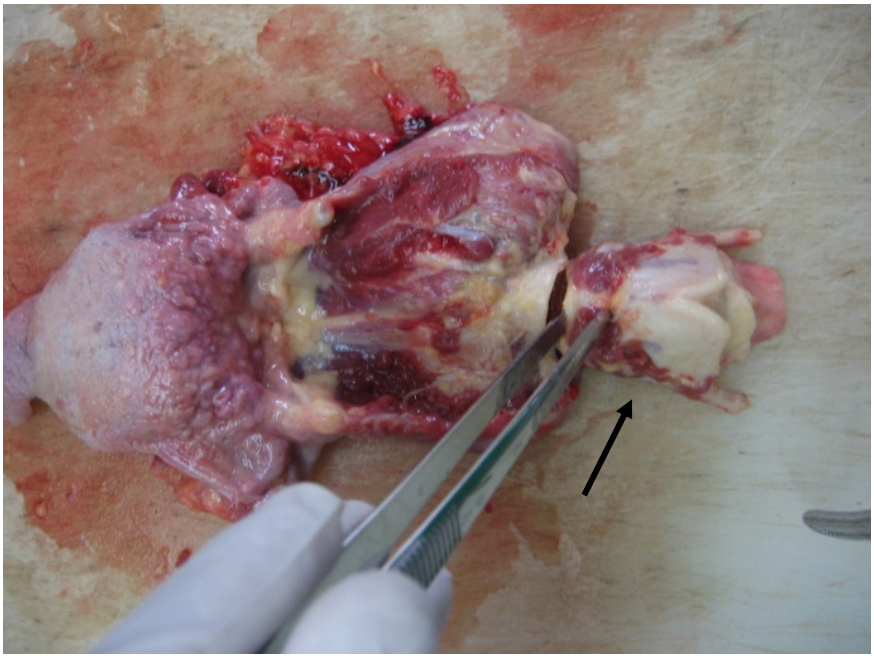

Figura 2. Obtenção da laringe durante a necropsia

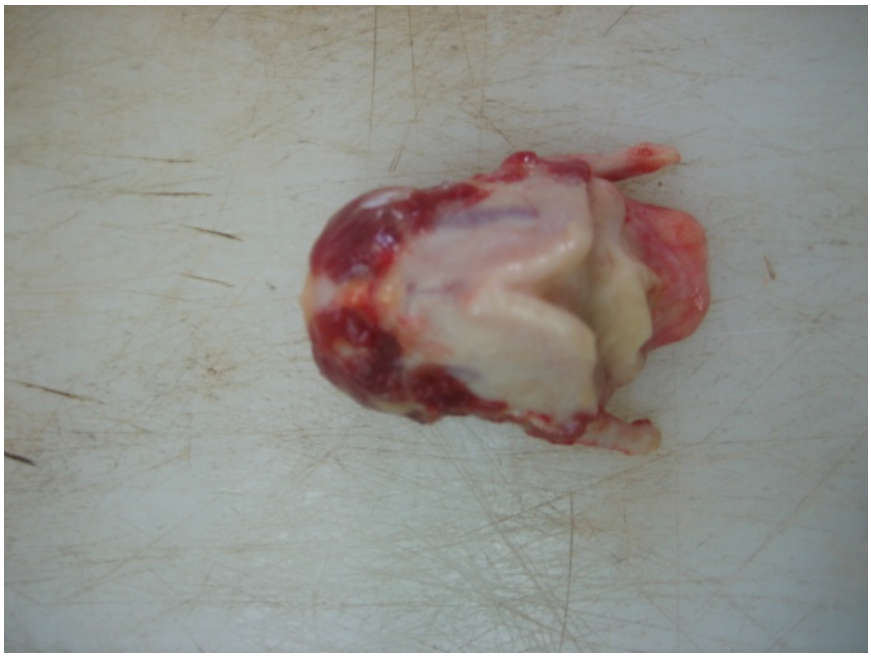

Figura 3. Laringe isolada

Figura 4. Transporte sob refrigeração até o laboratório

As peças foram avaliadas e dissecadas em um sistema adaptado por câmera, fonte de luz e monitor (figura 5), com aumento de 25 vezes, e foram excluídas aquelas nas quais se observaram lesões ou alterações estruturais mínimas diferenciadas. Foi utilizada de cada indivíduo a PV esquerda ou direita, obtida de forma alternada, destinada ao processo de quantificação do ácido hialurônico (AH). A dissecção e o processo de quantificação do AH foram realizados no Infar (Instituto de Farmacologia) da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (Unifesp/ EPM) (Figuras 5, 6 e 7).

Para o preparo da amostra, das 39 PPVV (20 masculinas e 19 femininas) foram retirados três fragmentos visando ao estudo das respectivas regiões: (1) porção membranosa (contendo cobertura, isto é, camada superficial da lâmina própria e epitélio) da prega vocal; (2) porção membranosa, ligamento vocal; (3) porção membranosa, músculo vocal, com o auxílio do sistema adaptado de vídeo.

Após a cordotomia, realizada por incisão longitudinal na borda livre da prega vocal com uso de tesoura, foi identificado o ligamento vocal e retirado material da cobertura (1), do ligamento vocal (2) e do músculo vocal (3).

A quantificação da cobertura representou o valor do AH na camada superficial da lâmina própria, uma vez que em estudo pregresso verificou-se por análise em lâmina a ausência de AH no epitélio (Lebl et al., 2007).

Os fragmentos foram excisados da porção média para evitar área das máculas flavas nas extremidades, áreas com maior número de fibroblastos e maior concentração de AH, conforme constatado em estudo prévio (Lebl et al., 2007).

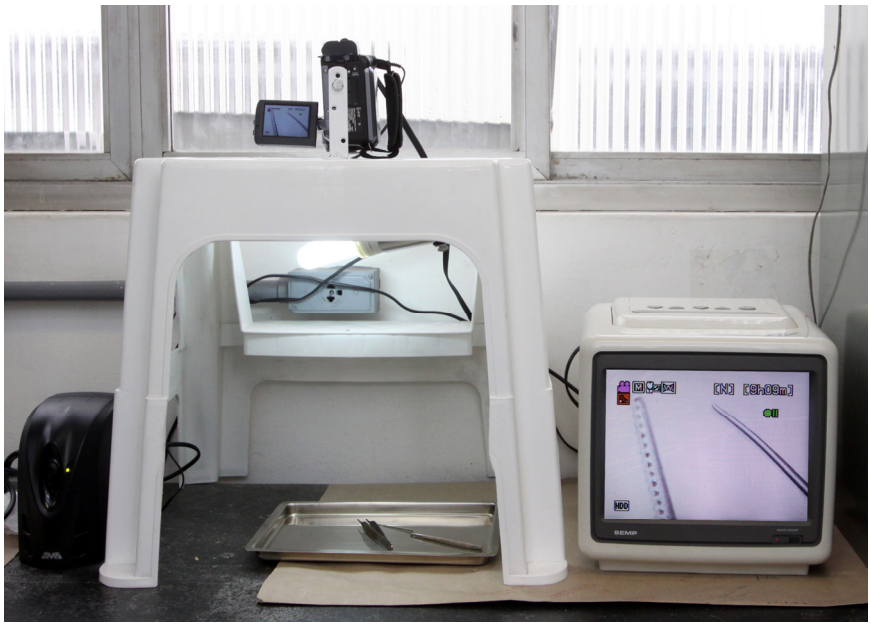

Figura 5. Local de dissecção auxiliado por sistema de vídeo

Figura 6. Decorticação assistida por vídeo

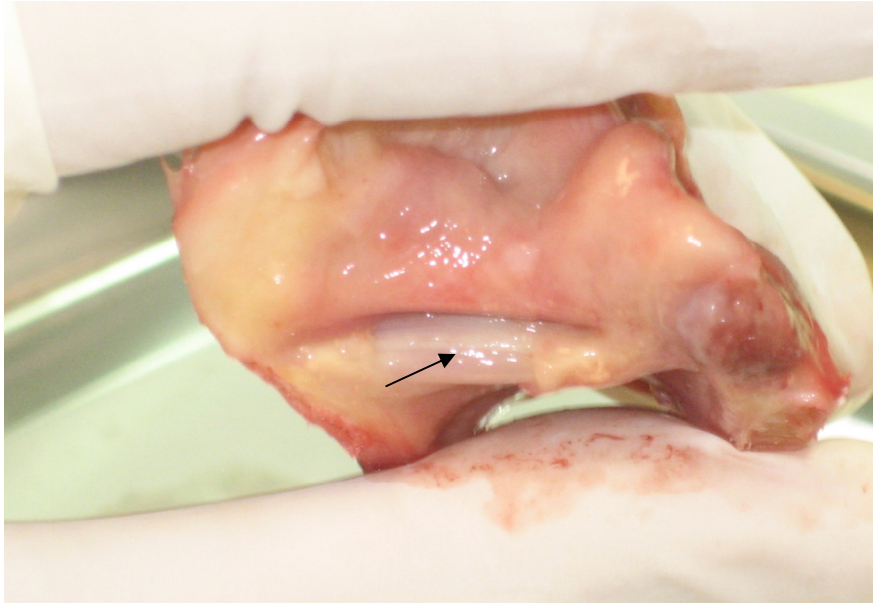

Figura 7. Prega vocal após a decorticação da cobertura evidenciando-se o ligamento vocal

O método de quantificação do AH foi desenvolvido na Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (Martins et al., 2003). Trata-se de um método fluorométrico para a determinação de AH em fluídos biológicos, utilizando-se para tal "sondas" de ligação ao AH. A sonda é isolada da cartilagem nasal bovina e é constituída da região globular do agrecam (um proteoglicano formado por um esqueleto proteico ao qual se ligam cadeias de queratam sulfato e condroitim sulfato) e pela proteína de ligação do AH (Tengblad, 1979). O agrecam, proteoglicano abundante em cartilagens, foi a primeira proteína em que se observou ligação específica com o AH. Ele é o representante de uma classe de compostos que apresentam capacidade de se ligar especificamente ao AH e que são denominadas hialaderinas (Laurent et al., 1995; Tammi et al., 2002). A sonda é usada tanto imobilizada em placas de ELISA, à semelhança de um anticorpo de captura, como sonda biotinilada, funcionando nesse último caso como um anticorpo secundário marcado.

A quantificação do AH, baseada no preparo da amostra e quantificação por método fluorométrico, seguiu o protocolo utilizado por Lebl et al. (2007).

Os fragmentos das três regiões (cobertura, ligamento e músculo) de cada prega vocal foram mergulhados em acetona para remoção de resíduos lipídicos e água. A acetona foi trocada após período de 12 horas e removida após outras 12 horas. O restante da acetona foi evaporado após período de uma hora em estufa a 50°C, para a obtenção do "pó cetônico" das amostras, que foi pesado. Ao pó cetônico, foi adicionado maxatase (protease alcalina; Biocon do Brasil Industrial Ltda – RJ, Brasil) 4mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05M + NaCl 1M, pH 8,0 (na proporção de 100µl de enzima para cada 10mg de pó seco). A mistura foi incubada a 60°C por 24 horas e, após esse período, a maxatase foi inativada por aquecimento a 100°C, durante 20 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e o AH dosado no sobrenadante, conforme descrito a seguir. À placa de ELISA com a sonda adsorvida foram adicionados 100µl/poço de solução padrão de AH de cordão umbilical humano (Sigma Chemical Co – St. Louis, Mo, USA) em várias concentrações (0 a 500µg/L), diluídas no tampão de ensaio Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 + albumina bovina sérica 1% (BSA; Amersham Life Science Ltd – Buckinghamshire, Inglaterra), além das soluções das amostras obtidas dos tecidos diluídas no mesmo tampão de ensaio (1:500), em triplicatas. Em seguida, procedeu-se à incubação a 4°C, 12 horas, sendo a placa então lavada com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M, pH 7,75) por nove vezes (Figura 8).

Figura 8. Lavagem das placas

Após a lavagem, foi adicionado 100µl da sonda biotinilada (1mg/ml) 1:10.000 em tampão de ensaio (Figura 9) e a placa foi agitada por duas horas (Figura 10).

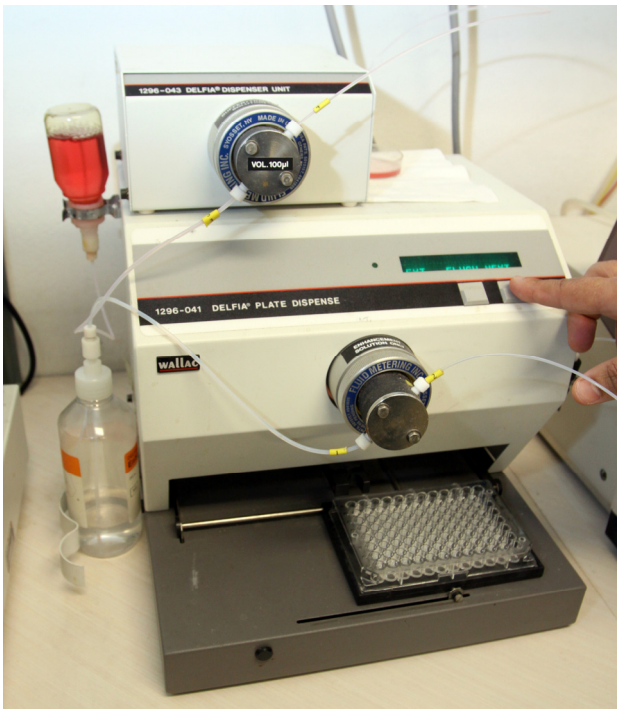

Figura 9. Adição de 100µl da sonda biotinilada (1mg/ml) 1:10.000 em tampão de ensaio

Figura 10. Placas agitadas por 2 horas

Segue-se nova etapa de lavagem (nove vezes), após a qual foi adicionado 100µl/poço de estreptavidina marcada com európio (Wallac- Turku, Filand) diluída 1:10.000 em tampão de ensaio. A placa foi então mantida sob agitação por 30 minutos, lavada nove vezes com tampão de lavagem e, por fim, adicionada uma solução de Enhancement (Perkin-Elmer life science- Wallac Oy – Turku, Filand), 200µl/poço (Figura 11).

Figura 11. Mesmo equipamento utilizado para adição de 100µl/poço de estreptavidina marcada com európio, e para adição de uma solução de Enhancement.

Após 5 minutos de agitação o európio foi liberado para a solução e a fluorescência emitida lida num fluorímetro (Victor 2- Wallac Oy, Turku- Filand) (Figuras 12, 13 e 14). As concentrações do AH foram expressas em µg/g de peso seco.

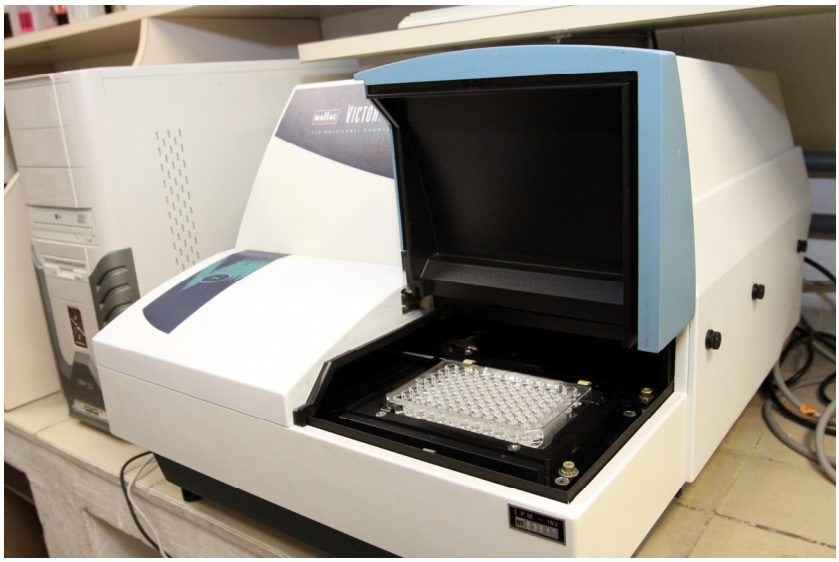

Figura 12. Fluorímetro modelo Victor 2 com a placa para a leitura do AH.

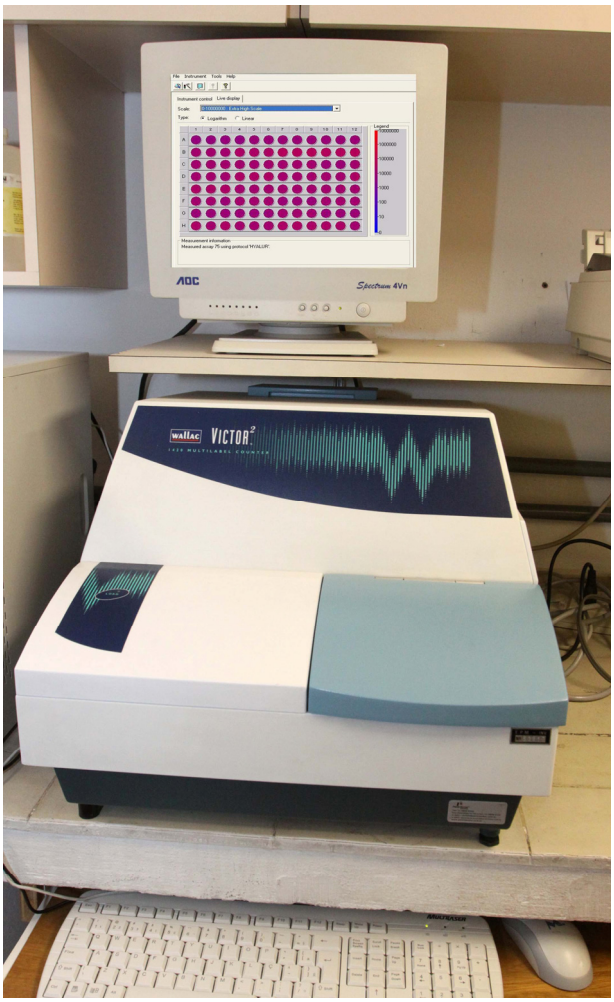

Figura 13. Processo de leitura do fluorímetro Victor 2

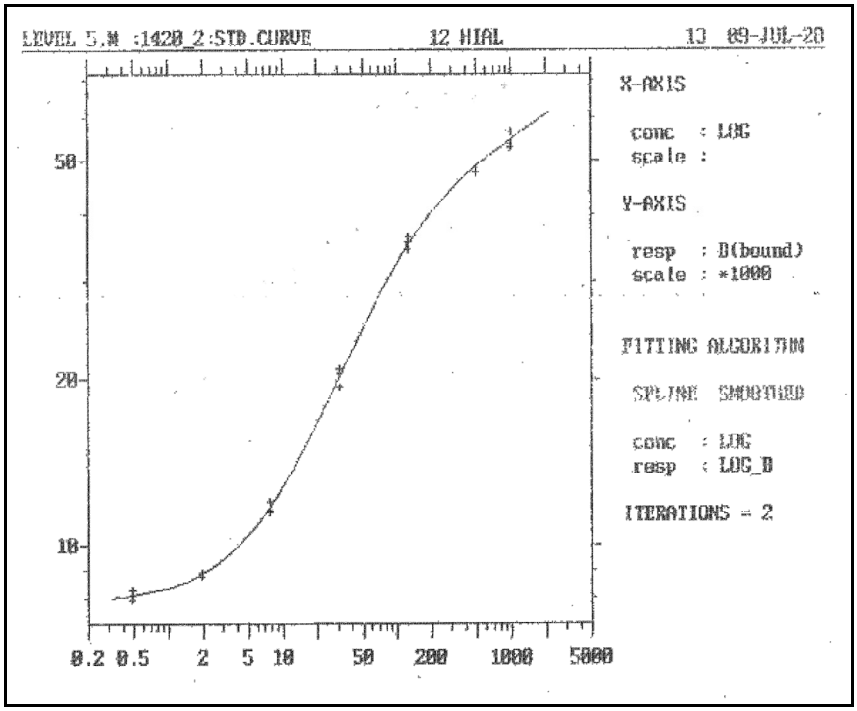

Figura 14. Curva de concentração do AH

As análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SPSS for Windows versão 15.0.

Os dados foram resumidos através de estatísticas descritivas, por região da laringe (cobertura, ligamento e músculo), onde foram apresentados: número de observações válidas (n), média, mediana, desvio-padrão (DP), valores mínimo e máximo.

O modelo de Análise de Variância (ANOVA) foi utilizado para comparar sexo e faixa etária com relação à concentração do AH em cada região (cobertura, ligamento e músculo). O teste T pareado foi utilizado para comparar a concentração do AH entre as regiões.

Como a suposição de Normalidade do modelo ANOVA não foi satisfeita, foi utilizada transformação ln nos dados para normalizar os mesmos.

Foi utilizado um nível de significância de 5% (α = 0,05). Os testes estatísticos foram bilaterais.

4. RESULTADOS

De acordo com os resultados da Tabela 2, observa-se que, em média, há maior concentração de AH no ligamento e menor concentração no músculo. Nota-se também uma grande variabilidade nos valores.

Tabela 2. Análise descritiva geral da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total
Cobertura	760,5	1066,9	27,2	545,2	6601,5	**39**
Ligamento	1015,0	1028,9	22,3	596,9	4648,8	**39**
Músculo	445,8	371,9	63,6	312,0	1750,8	**39**

Os resultados da Tabela 3 são análogos aos da Tabela 2 (em média, há maior concentração de AH no ligamento e menor concentração no músculo e há uma grande variabilidade nos dados em ambos os sexos).

Além disso, observa-se que, em média, as mulheres apresentam maior concentração de AH na cobertura e no ligamento do que os homens, sendo maior essa diferença na cobertura.

Tabela 3. Análise descritiva por sexo da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total
Feminino						
Cobertura	937,6	1461,8	27,2	546,6	6601,5	**19**
Ligamento	1032,7	745,2	101,2	843,1	2715,0	**19**
Músculo	440,4	241,3	111,1	374,8	916,7	**19**
Masculino						
Cobertura	592,3	437,3	100,6	478,7	1586,0	**20**
Ligamento	998,1	1261,1	22,3	383,7	4648,8	**20**
Músculo	451,0	470,4	63,6	230,7	1750,8	**20**

Os resultados da Tabela 4 também são análogos aos da Tabela 2 (em média, há maior concentração de AH no ligamento e menor concentração no músculo e há uma grande variabilidade nos dados).

Além disso, observa-se que, em média, os jovens apresentam maior concentração de AH do que os idosos, sendo maior essa diferença na cobertura e no ligamento.

Tabela 4. Análise descritiva por faixa etária da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total
Idoso						
Cobertura	583,0	472,1	174,2	478,7	1759,8	**20**
Ligamento	852,6	902,6	22,3	402,2	2932,9	**20**
Músculo	406,2	289,0	74,2	316,5	1025,8	**20**
Jovem						
Cobertura	947,4	1447,8	27,2	580,4	6601,5	**19**
Ligamento	1185,9	1146,6	104,5	795,6	4648,8	**19**
Músculo	487,5	447,4	63,6	307,1	1750,8	**19**

Tabela 5. Análise descritiva por sexo e faixa etária da concentração do AH (µg/g de peso seco) de acordo com as porções da PV.

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total
Feminino e Jovem						
Cobertura	1139,3	2071,5	27,2	546,6	6601,5	**9**
Ligamento	1070,8	681,7	225,1	843,1	2212,5	**9**
Músculo	441,2	270,8	141,1	522,2	916,7	**9**
Feminino e Idoso						
Cobertura	756,1	618,2	174,2	547,6	1759,8	**10**
Ligamento	998,4	833,6	101,2	873,7	2715,0	**10**
Músculo	439,6	226,5	111,1	354,8	841,9	**10**
Masculino e Jovem						
Cobertura	774,6	555,0	100,6	867,2	1586,0	**10**
Ligamento	1289,6	1480,3	104,5	643,2	4648,8	**10**
Músculo	529,2	575,4	63,6	257,4	1750,8	**10**
Masculino e Idoso						
Cobertura	409,9	147,5	220,5	387,4	589,5	**10**
Ligamento	706,7	988,8	22,3	312,6	2932,9	**10**
Músculo	372,8	350,0	74,2	230,7	1025,8	**10**

De acordo com os dados da Tabela 5, observa-se que há uma grande variabilidade nos dados e:

- Mulheres jovens têm maior concentração de AH na cobertura e menor concentração no músculo;
- Mulheres idosas, homens jovens e homens idosos têm maior concentração de AH no ligamento e menor concentração no músculo;
- Na comparação entre mulheres jovens e idosas, observa-se que há uma grande queda na concentração de AH na cobertura;

- Na comparação entre homens jovens e idosos, observa-se que há uma grande queda na concentração de AH em todas as regiões (cobertura, ligamento e músculo);
- Na comparação entre mulheres e homens jovens, observa-se que há uma grande queda na concentração de AH na cobertura e um grande aumento na concentração de AH no ligamento;
- Na comparação entre mulheres e homens idosos, observa-se que há uma grande queda na concentração de AH na cobertura e no ligamento.

As figuras abaixo ilustram os resultados da Tabela 5.

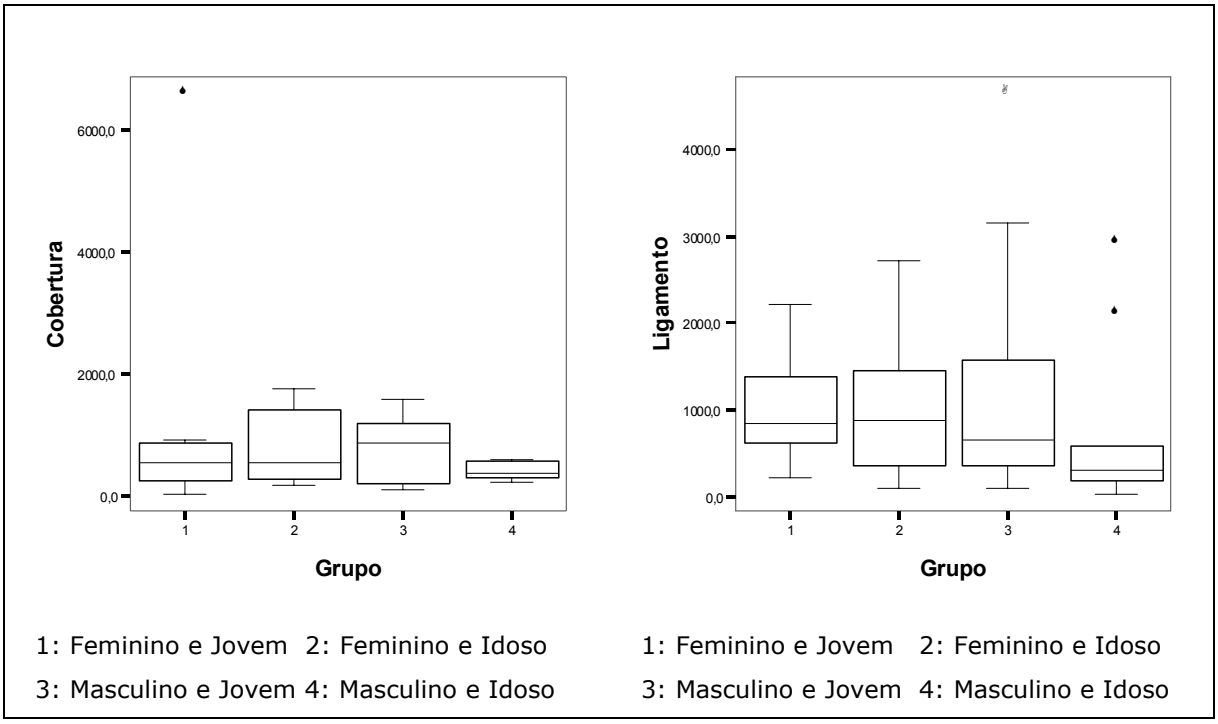

Figura 15. Box-plot da concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas por sexo e faixa etária na cobertura e no ligamento

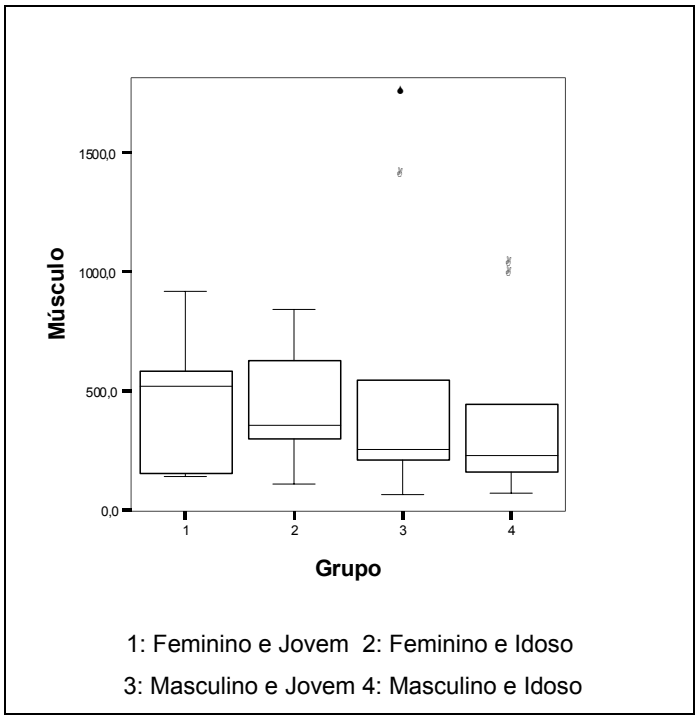

Figura 16. Box-plot da concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas por sexo e faixa etária na camada muscular.

Tabela 6. Comparações por sexo e faixa etária com relação à concentração do AH (µg/g de peso seco) em PPVV humanas.

Comparações	p-valor		
	Cobertura	Ligamento	Músculo
Sexo	0,832	0,187	0,381
Faixa etária	0,904	0,107	0,730
Interação (Sexo e Faixa etária)	0,374	0,384	0,555

De acordo com os resultados da Tabela 6, ao nível de significância de 5%, observa-se que não existe diferença significativa entre sexo e faixa etária, com relação à concentração de AH, para nenhuma região.

As figuras 17 e 18 confirmam o resultado da Tabela 6.

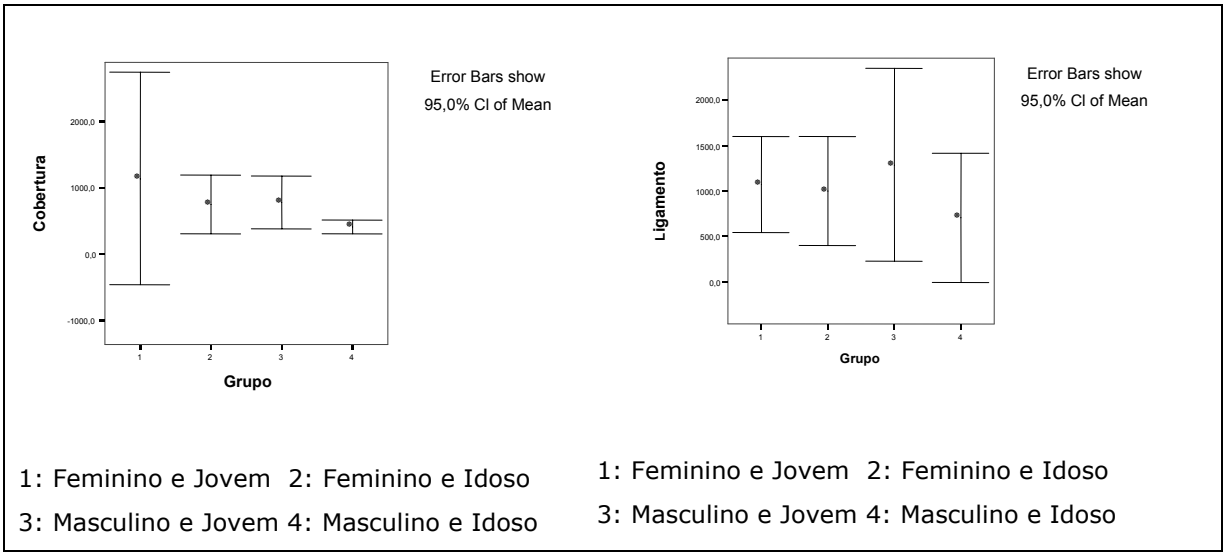

Figura 17. Intervalo de confiança da média de AH (µg/g de peso seco) para sexo e faixa etária na cobertura e no ligamento.

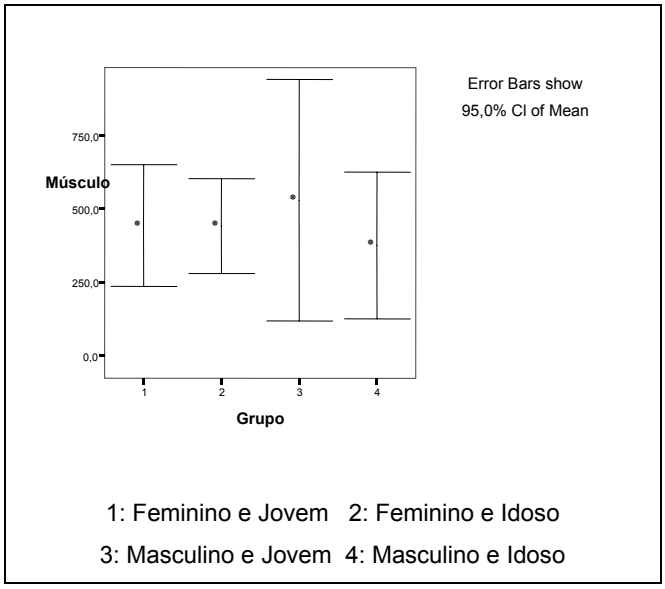

Figura 18. Intervalo de confiança da média de AH (µg/g de peso seco) para sexo e faixa etária no músculo.

Em relação à cobertura, o grupo feminino e jovem foi o que apresentou maior variação em relação à média. Assim como o grupo feminino jovem apresentou maior variação em relação ao masculino jovem, a mesma comparação foi encontrada entre idosos masculinos e femininos. O grupo de idosos do sexo masculino apresentou menor variabilidade, sendo o limite superior do intervalo de confiança baixo em relação aos demais grupos na cobertura. Por outro lado, o grupo masculino jovem foi o que apresentou maior variação em relação à média de AH no ligamento e no músculo.

Tabela 7. Comparação da concentração do AH (µg/g de peso seco) nas regiões: Cobertura, Ligamento e Músculo

Comparações	Média	Erro padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total	p-valor
Cobertura – Ligamento	-254,5	179,5	-3062,8	-132,9	4531,7	39	0,216
Cobertura – Músculo	314,7	167,9	-667,8	68,6	6017,6	39	0,025*
Ligamento – Músculo	569,1	143,2	-945,0	196,3	2945,2	39	0,003*

Legenda:

* Estatisticamente significante

De acordo com os resultados da Tabela 7, verifica-se que, ao nível de significância de 5%, existe diferença significativa de concentração de AH entre cobertura e músculo e entre ligamento e músculo. Em ambos os casos, a concentração de AH é menor no músculo.

Tabela 8. Comparação da concentração do AH (µg/g de peso seco) nas regiões: Lâmina, Ligamento e Músculo, por sexo e faixa etária

Comparações	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Total	p-valor
Fem. Jovem								
Cobertura - Ligamento	68,5	1756,2	585,4	-1632,2	-519,5	4531,7	9	0,133
Cobertura - Músculo	698,0	2025,9	675,3	-336,4	-20,7	6017,6	9	0,691
Ligamento - Músculo	629,6	515,6	171,9	16,6	596,0	1485,9	9	**0,001***
Fem. Idoso								
Cobertura - Ligamento	-242,3	562,7	177,9	-1039,2	-209,1	539,6	10	0,517
Cobertura - Músculo	316,5	602,3	190,5	-667,8	204,0	1385,0	10	0,227
Ligamento - Músculo	558,8	791,8	250,4	-392,1	448,6	2057,5	10	0,085
Masc. Jovem								
Cobertura - Ligamento	-514,9	1107,7	350,3	-3062,8	-139,5	328,7	10	0,084
Cobertura - Músculo	245,4	530,7	167,8	-589,5	64,8	991,5	10	0,097
Ligamento - Músculo	760,4	1246,1	394,1	-712,4	188,8	2945,2	10	**0,026***
Masc. Idoso								
Cobertura - Ligamento	-296,8	916,7	289,9	-2355,4	20,0	471,4	10	0,556
Cobertura - Músculo	37,1	330,8	104,6	-473,5	63,0	512,1	10	0,217
Ligamento - Músculo	333,9	925,4	292,6	-945,0	133,7	2035,1	10	0,844

Legenda:

* Estatisticamente significante

De acordo com os resultados da Tabela 8, verifica-se que, ao nível de significância de 5%, existe diferença significativa de concentração de AH entre ligamento e músculo para os jovens tanto do sexo feminino quanto do sexo masculino. Em ambos os casos, a concentração de AH é menor no músculo.

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, observamos que, em média, há maior concentração de AH no ligamento e menor no músculo (Tabela 2). Até o momento da redação dessa tese, não encontramos estudos que tenham quantificado as três regiões (cobertura, ligamento, e músculo) em relação a sexo e idade. Gray et al. (1999) e Lebl et al. (2007) observaram, em lâminas submetidas ao estudo histoquímico, que a marcação de AH na LP foi mais intensa respectivamente na camada intermediária e no ligamento do que na cobertura.

De acordo com o sexo, observamos que, em relação à cobertura, as mulheres apresentam maior concentração de AH do que os homens. Essa diferença, apesar de grande, não atingiu significância estatística (Tabela 3), talvez pela grande variabilidade dos resultados em todos os indivíduos e em todas as regiões, em especial no grupo jovem feminino (Figura 18). Essa grande variabilidade também foi observada em outros estudos (Hammond et al., 1997; Butler et al., 2001, Lebl et al., 2007). No estudo de Hammond et al. (1997), a variabilidade na quantificação do AH em adultos jovens foi de 3 vezes no sexo masculino e 32 vezes no sexo feminino.

A maior concentração de AH na cobertura de pregas vocais de mulheres jovens (Tabela 5) também foi observada no estudo de Lebl et al. (2007), que utilizou o mesmo método direto de quantificação do AH (Tabela 1). Porém, esses resultados contrariam os obtidos nos estudos de Hammond et al. (1997) e Butler et al. (2001), que encontraram maior quantidade de AH na camada superficial nos homens. Uma hipótese para explicar essas diferenças na camada superficial deve considerar os métodos utilizados. Nos estudos de Hammond et al. (1997) e Butler et al. (2001), foi utilizado um método histológico indireto em que se utilizou um reagente para mucopolissacarídeos e glicoproteínas em tecidos tratados e não tratados com hialuronidase testicular. Nesse método, a diferença entre a intensidade da coloração adquirida nos grupos representaria a quantidade de AH presente no tecido (Hammond et al., 1997; Butler et al., 2001). Em nosso estudo e no estudo de Lebl et al. (2007), foi utilizado um método direto de detecção de AH das PPVV após proteólise dos tecidos. Desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, trata-se de um método fluorométrico para a determinação de AH em fluidos biológicos, utilizando para tal proteínas de ligação ao AH isoladas de cartilagem bovina que reconhecem

especificadamente o AH. É importante frisar que esse método não sofre interferência pela presença de outros GAGs, ou mesmo quando na solução há grande quantidade de proteínas (Martins et al., 2003). Os estudos que utilizaram método indireto fizeram uso da hialuronidade testicular bovina, que pode também degradar outros GAGs, especialmente o condroitim sulfato.

Em relação ao ligamento e músculo, observamos valores muito próximos de AH nas mulheres em relação aos homens (Tabela 3). Butler et al. (2001), ao compararem a quantidade de AH na LP quanto ao sexo, observaram no sexo feminino maior valor na região mais profunda da LP em relação ao sexo masculino.

Quanto à camada muscular, até o presente momento da redação da tese, não encontramos outros estudos que tivessem quantificado AH para comparação.

Em relação à faixa etária, observou-se uma queda importante do AH na cobertura e no ligamento nos grupos de idosos (Tabela 4). No sexo feminino, na comparação entre jovens e idosos, observa-se grande queda do AH na cobertura. No sexo masculino, em comparação semelhante, observa-se queda em todas as regiões (Tabela 5). Butler et al. (2001) não observaram diferenças no sexo feminino, porém notaram diminuição dos valores de AH no sexo masculino, em toda a extensão da LP, embora sem diferença significativa (Butler et al., 2001).

Na comparação entre jovens do sexo feminino e masculino houve uma importante queda da concentração de AH na cobertura e um grande aumento no ligamento (Tabela 5). Essa variação foi inversa à encontrada por Butler et al. (2001). A hipótese para explicar a diferença baseia-se na utilização de métodos distintos, conforme discutido previamente (Butler et al., 2001).

Na comparação entre idosos do sexo feminino e masculino, observa-se menor concentração de AH na cobertura e no ligamento no sexo masculino (Tabela 5). No estudo de Butler et al. (2001), essa grande diferença somente foi observada na região mais profunda da LP.

Na cobertura, destaca-se, no grupo idoso do sexo masculino, a pequena variação em relação à média e o limite superior do intervalo de confiança abaixo dos demais grupos (Figura 18).

Outros resultados merecem ser comentados, apesar de não serem encontrados na literatura estudos para comparação. As mulheres jovens, como um grupo, apresentaram maior concentração de AH na cobertura e menor concentração no músculo. As mulheres idosas, homens jovens e homens idosos apresentaram maior concentração no ligamento e menor no músculo (Tabela 5).

Na comparação da concentração de AH nas diferentes regiões, observou-se que existe diferença significativa entre a cobertura e o músculo (maior na cobertura) e entre ligamento e músculo (maior no ligamento) (Tabela 7). Na semelhante comparação por grupos, observou-se que diferença significativa foi verificada apenas nos grupos jovens masculinos e femininos entre o ligamento e o músculo (Tabela 8).

Acreditamos que a grande variabilidade das concentrações entre as laringes estudadas, associada ao número de laringes disponíveis, possa justificar a ausência de significância estatística na grande maioria das comparações (Tabela 6; Figuras 15,16,17 e 18).

No estudo de Chan et al. (2001), os autores sugeriram que a presença de AH na matriz extracelular das PPVV contribui para a diminuição da viscosidade do tecido, dessa forma facilitando a fonação, uma vez que leva a uma diminuição do esforço para a produção vocal. Além disso, pode contribuir para uma elasticidade tecidual importante para o controle da frequência fundamental e auxílio na produção de sons de frequências mais altas (Chan et al., 2001). Os autores também evidenciaram grande variabilidade nos resultados. Como as mulheres apresentam aproximadamente o dobro da frequência fundamental dos homens (Behlau et al., 2001), entende-se que a maior quantidade de AH encontrada na cobertura de laringes nas mulheres no presente estudo (Tabela 3) e no estudo de Lebl et al. (2007), pode estar relacionada com essa característica fisiológica. Além disso, a maior quantidade de AH pode servir como um fator de proteção, uma vez que se relaciona à absorção de impacto, maior no sexo feminino devido à maior frequência fundamental. Na senescência, observa-se diminuição da frequência fundamental nas mulheres e um aumento nos homens (Mueller et al., 1984; Behlau et al., 2001). Em nosso estudo, observamos diminuição da concentração de AH nos idosos tanto no sexo feminino como no masculino, sendo uma importante queda na cobertura no

sexo feminino e no masculino em todas as porções (Tabela 5). Poder-se-ia questionar se a queda de AH em todas as porções no homem idoso poderia estar relacionada com o aumento da frequência fundamental, fato observado em estudos clínicos (Mysak, Hanley, 1958; Mysak, 1959; Hollien, Shipp, 1972; Mueller et al., 1984).

Hirano et al. (1989), ao estudar a LP em indivíduos idosos, observaram diminuição da espessura da camada intermediária da LP em idosos do sexo masculino. Uma possível hipótese para essa diminuição seria uma queda importante da concentração do AH no ligamento entre homens jovens e idosos, conforme observado em nosso estudo, dado esse não evidenciado no sexo feminino (Tabela 5).

Poder-se-ia questionar se a grande queda de AH em todas as porções no idoso masculino, diferente da grande queda observada apenas na cobertura nos idosos do grupo feminino (Tabela 5), poderia justificar maior incidência de arqueamento ou atrofia de PPVV no homem idoso como também diminuição da espessura da LP. No estudo de Honjo, Isshiki, 1986, foi observada atrofia de PPVV em 67% dos idosos do sexo masculino e 26% do sexo feminino (Honjo, Isshiki, 1980). Ximenes Filho et al. (2003) observaram diminuição da espessura da LP em idosos, mais evidente no sexo masculino (Ximenes Filho et al, 2003). No estudo de Pontes et al, 2006, observou-se que os idosos do sexo masculino apresentaram maior porcentagem de arqueamento de PPVV (Pontes et al., 2006).

Sato, Hirano (1995), ao estudarem as alterações na mácula flava com o envelhecimento, notaram uma diminuição no número e na ativação dos fibroblastos que indicou uma diminuição na síntese dos componentes da mucosa da PV. Tal fato poderia explicar a diminuição do AH que ocorre com o avançar da idade, conforme observado em nosso estudo, principalmente no sexo masculino (Tabela 5).

6. CONCLUSÕES

Do estudo da concentração de ácido hialurônico em pregas vocais de jovens e idosos, podemos concluir que:

1- Há maior concentração de AH na cobertura e no ligamento em relação ao músculo.

2- Existe maior concentração de AH no ligamento em relação ao músculo nos jovens do sexo masculino e feminino, considerando-se separadamente cada grupo.

7. REFERÊNCIAS

Almond A. Hyaluronan. Cell Mol Life Sci. 2007 Jul;64(13):1591-6.

Behlau M, Azevedo R, Pontes P. Conceito de voz normal e classificação das disfonias. In: Behlau M. Voz: o livro do especialista. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 53-84.

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

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

Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. Laryngoscope. 1999 Jun;109(6):845-54.

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

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

Hammond TH, Gray SD, Butler JE. Age- and gender-related collagen distribution in human vocal folds. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2000 Oct;109(10 Pt 1):913-20.

Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states anatomical and physical studies. In: Ludlow CL, Hart MO, editors. Proceedings of the Conference on the Assessment of Vocal Pathology; 1979 Apr; Bethesda, MD. Rockville, MD: American Speech-Language-Hearing Association; 1981. p. 11-30. (ASHA Reports, 11).

Hirano M, Kurita S, Sakaguchi S. Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. Acta Otolaryngol. 1989 May-Jun;107(5-6):428-33.

Hollien H, Shipp T. Speaking fundamental frequency and chronologic age in males. J Speech Hear Res. 1972 Mar;15(1):155-9.

Honjo I, Isshiki N. Laryngoscopic and voice characteristics of aged persons. Arch Otolaryngol. 1980 Mar;106(3):149-50.

Itano N. Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. J Biochem. 2008 Aug;144(2):131-7.

Jeanloz RW. The nomenclature of mucopolysaccharides. Arthritis Rheum. 1960 Jun;3:233-7.

Kahane JC. Connective tissue changes in the larynx and their effects on voice. J Voice. 1987;1(1):27-30.

Laurent TC. Biochemistry of hyaluronan. Acta Otolaryngol Suppl. 1987;442:7-24.

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Functions of hyaluronan. Ann Rheum Dis. 1995 May;54(5):429-32.

Laurent UB, Tengblad A. Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. Anal Biochem. 1980 Dec;109(2):386-94.

Lebl MD, Martins JR, Nader HB, Simoes Mde J, De Biase N. Concentration and distribution of hyaluronic acid in human vocal folds. Laryngoscope. 2007 Apr;117(4):595-9.

Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. Anal Biochem. 2003 Aug 1;319(1):65-72.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. J Biol Chem [Internet]. 1934 [cited 2009 Sep 26];107:629-34. Available from: http://www.jbc.org/content/107/3/629.full.pdf

Mueller PB, Sweeney RJ, Baribeau LJ. Acoustic and morphologic study of the senescent voice. Ear Nose Throat J. 1984;63(6):292-5.

Mysak ED, Hanley TD. Aging processes in speech: pitch and duration characteristics. J Gerontol. 1958 Jul;13(3):309-13.

Mysak ED. Pitch and duration characteristics of older males. J Speech Hear Res. 1959 Mar;2(1):46-54.

Passerotti CC, Bonfim A, Martins JR, Dall'Oglio MF, Sampaio LO, Mendes A, et al. Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Eur Urol. 2006 Jan;49(1):71-5.

Pontes P, Yamasaki R, Behlau M. Morphological and functional aspects of the senile larynx. Folia Phoniatr Logop. 2006;58(3):151-8.

Santos VN, Leite-Mor MM, Kondo M, Martins JR, Nader H, Lanzoni VP, et al. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. Braz J Med Biol Res. 2005 May;38(5):747-53.

Sato K, Hirano M. Age-related changes of the macula flava of the human vocal fold. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1995 Nov;104(11):839-44.

Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997 Jan;106(1):44-8.

Sato K, Hirano M. Age-related changes in the human laryngeal glands. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1998 Jun;107(6):525-9.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Age-related changes of collagenous fibers in the human vocal fold mucosa. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2002 Jan;111(1):15-20.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):4581-4.

Tengblad A. Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding properties from cartilage. Biochim Biophys Acta. 1979 Jun 19;578(2):281-9.

Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. Laryngoscope. 2004 Apr;114(4):760-4.

Thibeault SL. Advances in our understanding of the Reinke space. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2005 Jun;13(3):148-51.

Ward PD, Thibeault SL, Gray SD. Hyaluronic acid: its role in voice. J Voice. 2002 Sep;16(3):303-9.

Ximenes Filho JA, Tsuji DH, do Nascimento PH, Sennes LU. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2003 Oct;112(10):894-8.

ANEXO

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIFESP PAULISTA

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de julho de 2007.
CEP 0036/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) GUSTAVO POLACOW KORN
Co-Investigadores: Noemi Grigoletto de Biasi (orientadora) e Paulo Augusto de Lima Pontes
Disciplina/Departamento: Cabeça e Pescoço/Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Fapesp.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Concentração e disposição do ácido hialurônico em pregas vocais de indivíduos idosos".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: GRUPO III - ESTUDO CLINICO OBSERVACIONAL COM CADÁVERES -.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.
OBJETIVOS: Avaliar a concentração e a disposição de ácido hialurônico na lâmina pr´ppria da prega vocal de homens e mulheres na faixa geriátrica.
RESUMO: Estudo prospectivo que será desenvolvido na Disciplina de Laringologia do Departamento de Otorrinolaringologia da UNIFESP. O projeto prevê a utilização de 40 pregas vocais obtidas em necrópsias de 20 cadáveres (10 homens e 10 mulheres). O local de obtenção das laríngeas será o Serviço de Verificação de Óbitos da FMUSP..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: O estudo pretende avaliar a participação do ácido hialurônico na lâmina própria dos indivíduos idosos, comparando homens e mulheres, e dessa forma, viabilizar a compreensão das alterações vocais encontradas na população geriátrica..
MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os preocedimentos e métodos que serão utilizados.
TCLE: Não se aplica.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: projeto financiado pela fapesp.
CRONOGRAMA: 24 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: DOUTORADO.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **16/7/2008** e **16/7/2009**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

UNIFESP
PAULISTA

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Antes do início do estudo solicitados uma carta de autorização assinada pelo Diretor do SVO, uma vez que o estudo envolve não somente a Seção de Laudos autorizada pelo Nilton Neuman

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

Abstract

Objective: to compare and evaluate hyaluronic acid (HA) concentration in the cover, vocal ligament, and vocal muscle of normal vocal folds, in young and elderly men and women. **Method:** A hyaluronic acid binding protein obtained from bovine nasal cartilage and determined by fluorometric assay was employed. ELISA plates coated with adsorbed binding protein were sequentially incubated with material samples from the middle portion of the cover, vocal ligament, and vocal muscle of 19 young subjects and 20 elderly ones, of both genders; biotin-conjugated binding protein; and streptavidin-europium conjugate. After europium release in an enhancement solution, final fluorescence was measured in a fluorometer. **Results:** Statistically significant comparisons: (1) Higher HA concentration in the cover and vocal ligament when compared to vocal muscle, in the whole sample; (2) Higher HA concentration in vocal ligament when compared to vocal muscle in young subjects of both genders, considering each group separately. Statistically non-significant data: (3) Higher HA concentration in vocal ligament when compared to the remaining portions; (4) Higher HA concentration in the cover of young women and lower concentration in vocal ligament when compared to young men; (5) HA value fall with aging, more prominent in the cover of women and in all portions of male subjects; (6) Lower HA concentration in elderly men, in all portions, keeping the difference between genders in the cover. **Conclusion:** From the hyaluronic acid concentration study in young and elderly subjects' vocal fold we can conclude that there is a higher HA concentration in the cover and vocal ligament when compared to vocal muscle, in the whole sample; a higher HA concentration in vocal ligament when compared to vocal muscle in young subjects of both genders, considering each group separately.

Bibliografia consultada

Ganança MM, Pontes PAL. Metodologia científica: normatização para redação de teses. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço; 2005. 42 p.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar a sua tese: estrutura e referências. 2a ed rev. ampl. São Paulo; 2005. 122 p.

Bussab WO, Morettin, PA. Estatística básica. 5a ed. São Paulo: Saraiva; 2003. 540p.

Fonseca JS, Martins, GA. Curso de estatística. 3a ed. São Paulo: Atlas; 1982. 320 p.

Montgomery DC, Peck EA. Introduction to linear regression analysis. New York: Wiley; 2006. 640 p.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo