



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

NEEMIAS SANTOS CARNEIRO

**CONCENTRAÇÃO DE FIBROBLASTOS EM PREGAS
VOCAIS DE IDOSOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - MEPAREM, da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu

Orientador: Profª Titular Drª Regina Helena Garcia Martins

2023

Neemias Santos Carneiro

**CONCENTRAÇÃO DE FIBROBLASTOS EM PREGAS
VOCAIS DE IDOSOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - MEPAREM, da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu

Orientador: Profª Titular Drª Regina Helena Garcia Martins

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carneiro, Neemias Santos.

Concentração de fibroblastos em pregas vocais de idosos
/ Neemias Santos Carneiro. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Regina Helena Garcia Martins
Capes: 40102025

1. Idosos. 2. Imuno-histoquímica. 3. Pregas vocais.
4. Voz - Envelhecimento. 5. Distúrbios da voz.
5. Fibroblastos. 6. Voz - Envelhecimento.

Palavras-chave: Idade vocal; Idosos; Imuno-histoquímica;
Pregas vocais; Presbilaringe.

A **Deus**, meu grande guia até o momento, Senhor e Salvador de minha vida! Aos meus pais **Elizabete e José Carlos** pelo cuidado, carinho e amor, que me proporcionaram. Por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos e me ajudarem a seguir cada passo até aqui.

AGRADECIMENTOS

Decidir no Brasil pela pesquisa é sinônimo de resiliência, visto a tantas dificuldades, portanto, quando se cava uma oportunidade para realizá-la há de se agarrá-la com afinco. Sinto-me honrado em poder participar na elaboração dessa dissertação, por mais árduo que fora o caminho, em outros momentos foi extremamente gratificante. Além do exercício do método científico, prestou-se para mim, como forma de reflexão sobre o mesmo à minha realidade vivida desde minha formação acadêmica.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a toda a equipe que sucedeu a este trabalho que lutou por toda coleta de dados, e a cada ajuda dedicada para que a linha de pesquisa se perpetuasse, em particular a **Dra Adriana Benito Pessin**, que através dos dados colhidos para seu pós-doutorado me cedeu todo material a ser estudado.

À minha grande companheira de vida, **Débora Cavalcante dos Santos Carneiro**, que vai além da parceria da vida, contudo esteve sempre presente em toda fomentação e concretização de meus maiores sonhos, só tenho gratidão, e todo amor para essa pessoa incrível que devo toda minha vida.

À minha família querida, que me apoiou espiritualmente e emocionalmente me suportando de todos os modos onde cada um poderia.

A minha orientadora, professora Titular **Dr^a Regina Helena Garcia Martins**, pela paciência e ajuda em cada processo, contribuindo com todo seu conhecimento e sabedoria, não somente na vida acadêmica, como em minha vida pessoal. Tenho não só gratidão como inspiração em minha profissão, levando amor em tudo que faz, parte do motivo de eu estar hoje nessa condição, devo a ela.

À minha coorientadora colaboradora, professora **Dr^a Claudia Helena Pelizon**, que foi de imensa importância para realização desse trabalho, ajudando na preparação das lâminas e imuno-histoquímica, fazendo tudo com amor, sempre passando o conhecimento.

À professora Dra. **Adriana Benito Pessin** e ao professor Dr. **Christiano Giacomo Carneiro** pela participação em minha banca de qualificação, pelos apontamentos que enriqueceram este trabalho.

Aos **professores** da disciplina de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pelos ensinamentos passados.

Aos meus **amigos**, que sempre estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, os presentes e os distantes fisicamente.

Aos **residentes** que conviveram estes três anos comigo, pela parceria, ajuda e apoio diário, bem como pelas trocas de experiências e ensinamentos.

Aos **funcionários** da enfermaria de otorrinolaringologia e ambulatórios, bem como da Divisão de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço pela atenção, disponibilidade e paciência.

Aos **pacientes** que me proporcionaram todo aprendizado técnico e humano, e me ajudaram a ser um ser humano melhor.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e Hospital das Clínicas de Botucatu** que tornou possível a realização de mais uma etapa em minha vida, me tornando especialista em Otorrinolaringologia, proporcionou que eu vivenciasse experiências acadêmicas ímpares, e conhecesse pessoas incríveis que levarei para sempre dentro do meu coração.

RESUMO

Concentração de fibroblastos em pregas vocais de idosos

Introdução: Na presbifonia observa-se aumento da matriz fibrosa extracelular e diminuição do ácido hialurônico na lâmina própria das pregas vocais. Sabe-se que os fibroblastos presentes na lâmina própria são responsáveis pela produção e renovação da matriz fibrosa, porém os motivos pelos quais esta é mais densa nas laringes de idosos não está bem esclarecidos. As hipóteses aventadas são: aumento na concentração de fibroblastos; manutenção do número dessas células, porém com aumento de sua atividade funcional; manutenção do número e da atividade funcional, porém diminuição da renovação das fibras. **Objetivo:** Estudar a concentração de fibroblastos nas pregas vocais de idosos. **Material e Métodos:** as pregas vocais de 13 cadáveres foram removidas e distribuídas em dois grupos por faixas etárias: Grupo Controle: n-5, 18-40 anos; Grupo de idosos: n-8, ≥ 75 anos). As pregas vocais foram dissecadas e preparadas para análise imuno-histoquímica utilizando o anticorpo SA100 A4 aos fibroblastos. Os locais analisados foram as máculas flavas e a porção medial (ou vibratória) das pregas vocais. O programa Avsoft-Bioview foi utilizado para quantificar a concentração de fibroblastos por área. **Resultados:** foi identificada maior concentração de fibroblastos nas máculas da laringe de adultos jovens e na porção medial das pregas vocais dos idosos. No entanto, esses resultados não determinaram diferenças estatisticamente significativas, permitindo concluir que não houve efeito da idade sobre a concentração de fibroblastos nas pregas vocais. **Conclusão:** neste estudo não foram constatadas diferenças quantitativas na concentração de fibroblastos nas laringes de idosos, quando comparada às laringes de adultos jovens, tanto nas máculas flavas como na porção medial das pregas vocais.

Palavras-chave: Presbifonia, Pregas vocais, Idosos, Fibroblastos, Imuno-histoquímica, Presbilaringe.

ABSTRACT

Concentration of fibroblasts in the vocal folds of elderly people

Introduction: In presbyphonia, there is an increase in the extracellular fibrous matrix and a decrease in hyaluronic acid in the lamina propria of the vocal folds. The fibroblasts are responsible for the production and turnover of the fibrous matrix, but the reasons why the matrix is denser in the larynges of the elderly are unclear. The hypotheses are: increase in the concentration of fibroblasts; maintenance of the number of these cells, but with an increase in their functional activity; maintenance of number and functional activity, but decrease in fiber turnover. **Objective:** Study the concentration of fibroblasts in the vocal folds of the elderly. **Material and Methods:** the vocal folds of 13 cadavers were removed and divided into two age groups: Control Group: n-5, 18-40 years; Group of elderly: n-8, ≥ 75 years). The vocal folds were dissected and prepared for immunohistochemical analysis using the SA100 antibody to fibroblasts. The sites analyzed were *maculae flavae* and medial (or vibratory) part of the vocal folds. The AVsoft Bioview program was used to quantify the concentration of fibroblasts per area. **Results:** a higher concentration of fibroblasts was identified in the macules of the larynx of young adults and in the medial part of the vocal folds of the elderly. However, these results did not determine statistically significant differences, allowing us to conclude that there was no effect of age on fibroblast concentration in the vocal folds. **Conclusion:** In this study, no quantitative differences were found in the concentration of fibroblasts in the larynges of the elderly, when compared to the larynges of young adults, both in the macula flava and in the medial portion of the vocal folds.

Key words: Presbyphonia, Vocal folds, Elderly, Fibroblasts, Immunohistochemistry, Presbylarinx.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1.** Representação das camadas da lâmina própria da prega vocal02
- Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) A– Fibroblasto estrelado. B- Fibroblastos ovais, no centro representação de possível fibrócito. C– Fibroblasto Fusiforme.....03
- Figura 3.** A- Microscopia de luz representando laringe humana com realce para as MFA e MFP. B- Representação gráfica demonstrando estruturas laríngeas com realce para as MFA e MFP.....04
- Figura 4.** MET: A – Representação de fibras frouxas e regulares em Pregas Vocais (PV) de jovens. B- Representação de emaranhado de fibras irregulares em PV de idosos.....05
- Figura 5.** A - Exame Macroscópico da laringe humana após remoção, e dissecação da Prega vocal. B- Destaque para a prega vocal removida07
- Figura 6.** Ilustração demonstrando as áreas de estudo da prega vocal para as análises de microscopia de luz e imuno-histoquímica. Máculas flavas anterior e posterior (extremidades) e porção medial da prega vocal.08
- Figura 7.** Coloração imuno-histoquímica. Fibroblasto corado em castanho.09
- Figura 8.** Boxplot das variáveis F(%) e Área, considerando os grupos e as região.....11

TABELAS

- Tabela 1 -** Mediana (mínimo-máximo) da concentração de fibroblasto (%) de acordo com o grupo e região (mácula flava e porção medial de prega vocal)..... 10
- Tabela 2 -** Média±desvio padrão, Mediana [mínimo; máximo] das variáveis área, segundo o Grupo e Região.....12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ER	Espaço de Reinke
F	Fibroblastos
MF	Mácula flava
MFA	Mácula flava anterior
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFE	Matriz Fibrosa Extracelular
MF	Mácula Flava Posterior
NHR	<i>Noise to Harmonic Ratio</i>
PV	Prega Vocal
PMPV	Parte Medial da Prega Vocal
SPI	<i>Smooth Phonation Index</i>
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2.	OBJETIVO.....	05
3.	MATERIAL E MÉTODOS	06
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	09
5.	RESULTADOS	10
6.	DISCUSSÃO	12
7.	CONCLUSÕES.....	16
8.	REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Em seres pluricelulares, o conjunto de células agrupadas possuem a capacidade de especializar-se até constituir-se em tecido organizado. Quanto à estrutura anatômica histológica fundamental, o tecido conjuntivo tem grande importância, pois dá subsídios aos outros tecidos, estruturando o arcabouço e o esqueleto celular. É composto por células, fibras e substância amorfa, tendo como principal constituinte a matriz extracelular ou substância fundamental. Trata-se de um complexo viscoso, hidrofílico, aniônico, composto por polissacarídeos (glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas multiadesivas). Fibronectina e laminina, proteínas fibrosas, são capazes de se ligar aos receptores de proteínas de superfície e aumentar a força tênsil e de sustentação da matriz extracelular. A matriz extracelular tem diversas funções dentre elas destacam-se as interações intercelulares e intermatriz, conexão entre os tecidos, participação na diferenciação celular, na apoptose celular e na angiogênese¹.

A lâmina própria das pregas vocais tem uma configuração trilaminar (camadas superficiais, intermediárias e profundas), na qual a concentração de fibras colágenas aumenta à medida que se aproxima do músculo vocal (Figura 1). A camada superficial (espaço de Reinke) é frouxa, com poucas fibras colágenas e elásticas, e alguns fibroblastos. O espaço de Reinke (ER) é flexível, permitindo a propagação da onda mucosa. Na camada intermediária, há uma maior concentração de fibras elásticas, responsáveis pela flexibilidade e maleabilidade das pregas vocais, e a camada profunda é rica em fibras colágenas, proporcionando resistência e tensão às pregas vocais^{2,3}.

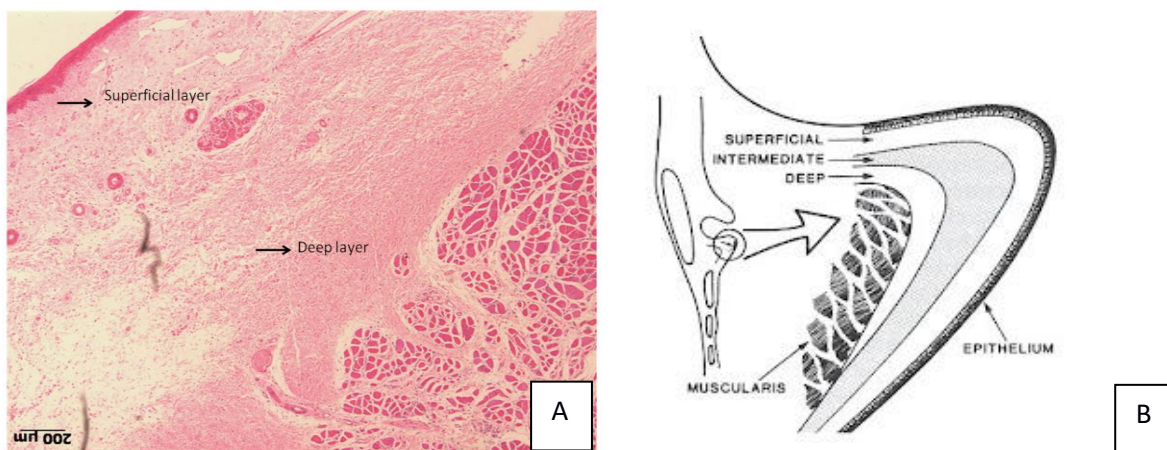


Figura 1: Representação das camadas da lâmina própria da Prega vocal: A – Lâmina sob microscopia de luz mostrando o recorte da prega vocal, desde o epitélio até o músculo vocal. B- Representação gráfica da distribuição das camadas da prega vocal.

Os fibroblastos, presentes na lâmina própria da prega vocal, são responsáveis pela produção, manutenção, desenvolvimento e reparo da matriz extracelular fibrosa ^{4,5}. Desempenham também um papel em seu equilíbrio, sendo responsáveis pela digestão e reabsorção, controlando assim a sua quantidade e qualidade. Os fibroblastos possuem um citoplasma rico em organelas, especialmente o retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi e muitas mitocôndrias. A principal função dos fibroblastos é a síntese de colágeno, uma proteína produzida em seu RER, armazenador do produto ribossômico ⁵⁻⁷. O fibroblasto pode se apresentar sob diferentes formas, a depender da idade e atividade em: ovalado, estrelado (mais ativo e com muitas organelas), fusiforme e fibrócito, em sua fase de inatividade ou terminal⁴ (Figura 2). Essas particularidades na apresentação e formato dos fibroblastos podem dificultar os pesquisadores durante sua identificação.

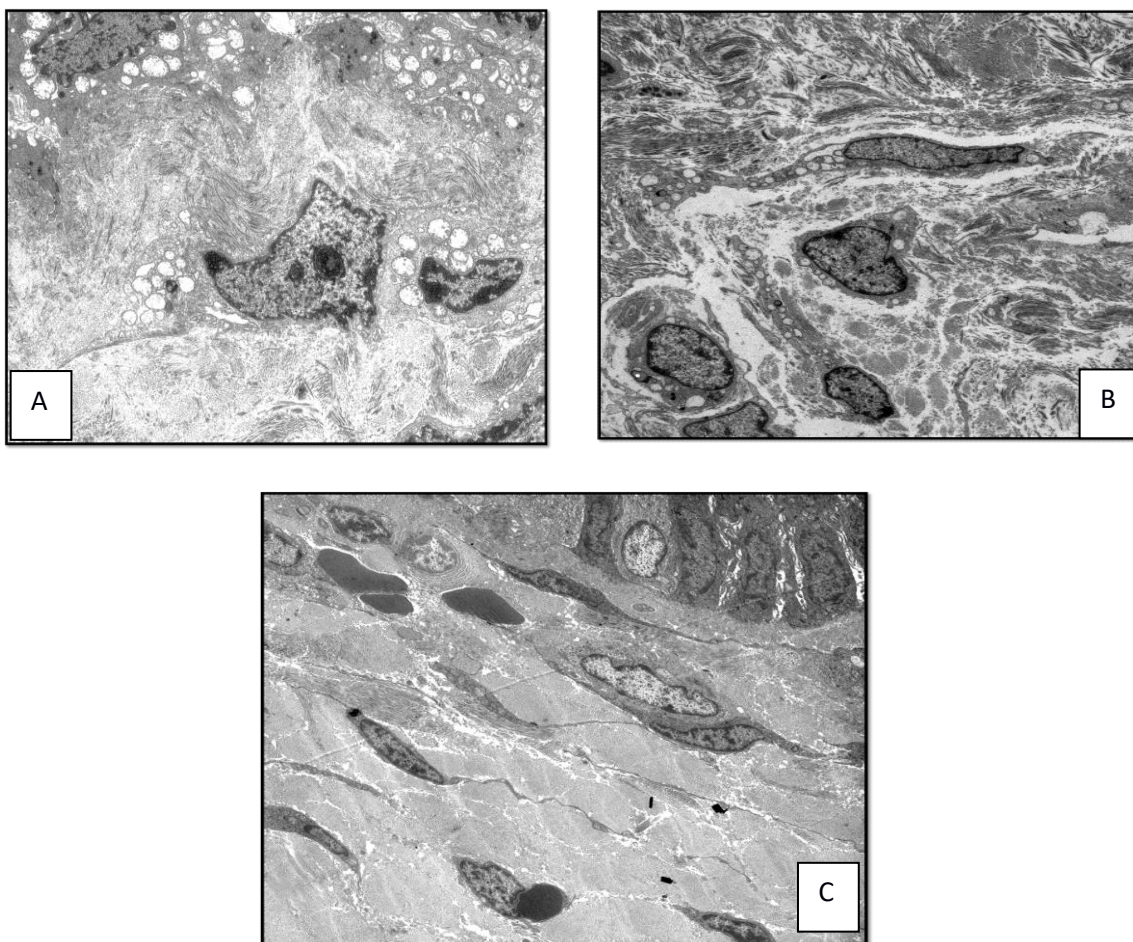


Figura 2: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) A– Fibroblasto estrelado. B- Fibroblastos ovais, no centro representação de possível fibrócito. C – Fibroblasto Fusiforme

As pregas vocais apresentam as máculas flavas (MF) anterior (MFA) e posterior (MFP) em suas extremidades proximal e distal, respectivamente. Esses sítios são considerados verdadeiros berços de fibroblastos e são responsáveis pela síntese dos componentes fibrosos da lâmina própria⁴⁻⁷ (Figura 3). Os fibroblastos da MF diferem dos do ER. Em neonatos e adultos, os fibroblastos da MF têm formato estrelado, com pequena relação núcleo/citoplasma e citoplasma rico em organelas, indicativo de intensa atividade na produção de fibras colágenas e elásticas. No ER, os fibroblastos apresentam menos organelas, indicativo de baixa produção de fibras.

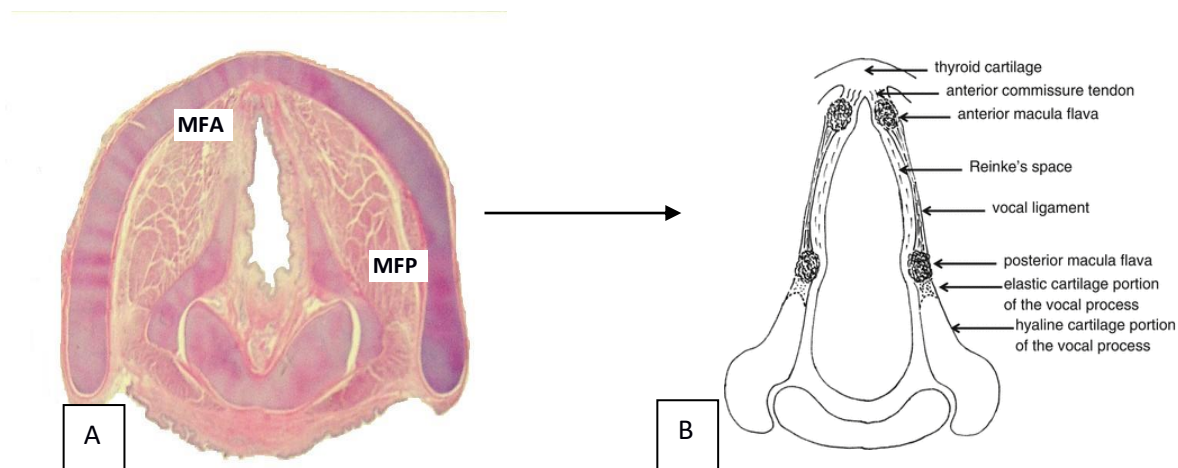


Figura 3: A- Microscopia de luz representando laringe humana com realce para as MFA e MFP. B- Representação gráfica demonstrando estruturas laríngicas com realce para as MFA e MFP

A presbifonia é um processo natural e fisiológico do envelhecimento da voz. Alterações anatômicas, estruturais e funcionais da laringe podem ser identificadas, como calcificações de cartilagens, atrofia do epitélio e da musculatura vocal, diminuição das fibras elásticas e aumento das fibras colágenas, além da diminuição do ácido hialurônico⁸⁻¹⁰.

Os principais sintomas vocais relatados pelos idosos são fadiga vocal, astenia, dificuldade para cantar e tremor vocal^{6,7}. As análises auditivo-perceptuais vocais dos idosos registram rouquidão, rugosidade, diminuição do tempo máximo de fonação (TMF), soprosidade, astenia e instabilidade vocal. As análises acústicas vocais identificam diminuição da frequência fundamental em mulheres e um aumento em homens, incremento da porcentagem do *jitter* (variações da frequência fundamental entre ciclos vizinhos) e de *shimmer* (variações da amplitude entre ciclos vizinhos); aumento do NHR (Noise to Harmonic Rate) e do SPI (Soft Phonation Index)^{8,10,11}.

Pessin *et al.*¹², em estudo histopatológico de laringes de cadáveres constataram maior concentração de matriz fibrosa em laringes de idosos quando comparada às de adultos jovens, principalmente na porção medial das pregas vocais. Roberts *et al.*¹³ atribuem essa ocorrência à diminuição da atividade dos fibroblastos ou mesmo à redução de sua população (Figura 4). Percebe-se que fisiopatologia do aumento da matriz fibrosa, especialmente de fibras colágenas, na laringe dos idosos não está completamente esclarecida. Dentre as hipóteses tem-se: aumento da concentração de fibroblastos na lâmina própria; manutenção na população de fibroblastos, porém com aumento na atividade dessas células; manutenção quantitativa da população e na atividade dessas células, porém com diminuição na renovação das fibras.

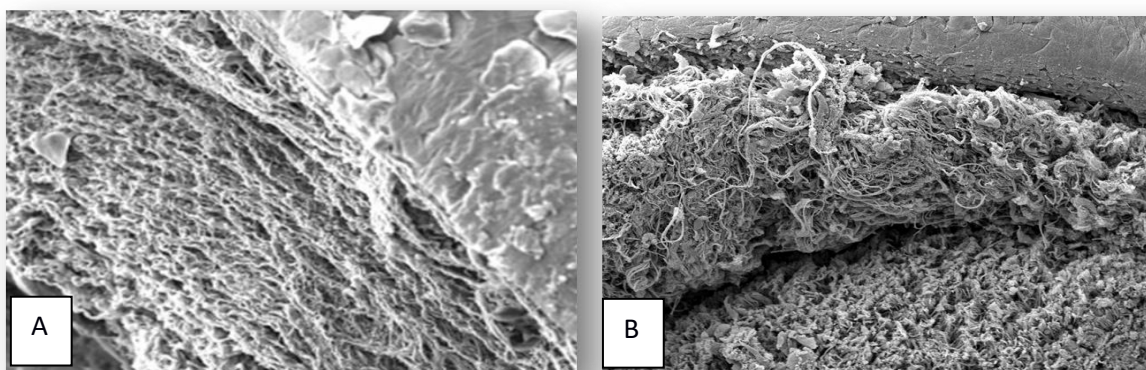


Figura 4: MET: A – Representação de fibras frouxas e regulares em Pregas Vocais (PV) de jovens. B- Representação de emaranhado de fibras irregulares em PV de idosos.

2. OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi analisar a concentração de fibroblastos nas pregas vocais da laringe de idosos, a fim de desvendar alguns eventos fisiopatológicos da presbifonia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídas laringes retiradas de cadáveres durante necropsia, realizada no Departamento de Patologia de nossa instituição. As laringes foram distribuídas em dois grupos por faixas etárias: Grupo Controle (n-5; idade de 18 a 40 anos - 4M e 1F) e Grupo de idosos (n-8; idade \geq 75 anos - 4M e 4F).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da instituição onde foi realizado (número do processo: 1.759.098), os familiares assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a remoção do órgão.

Critérios de exclusão: óbito por sepse, tabagismo crônico, intubação prolongada, cirurgia laríngea prévia, trauma cervical, neoplasias laríngeas ou outras doenças que pudessem comprometer as estruturas das pregas vocais, como doenças dermatológicas, autoimunes, metabólicas, reumáticas, respiratórias. Os dados referentes a hábitos e doenças foram obtidos por meio de laudos familiares, declarações de óbito e prontuários.

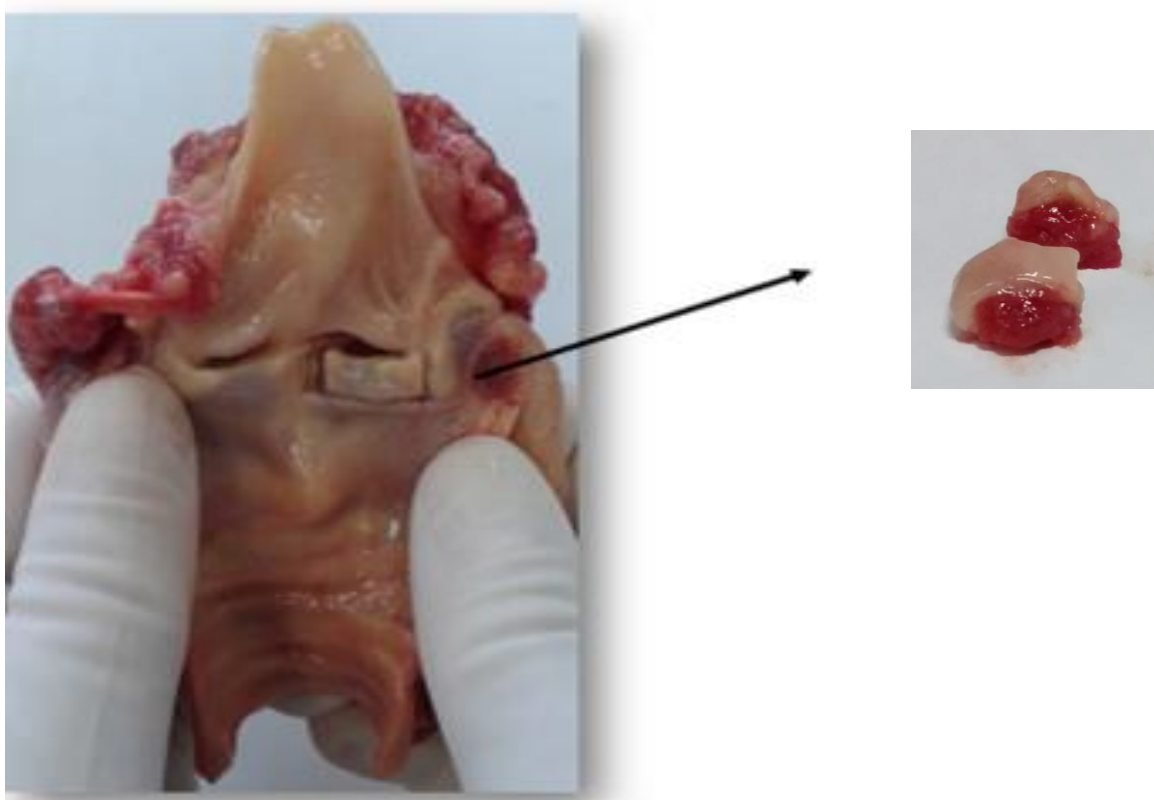
A laringe foi aberta na porção posterior e examinada macroscopicamente para identificar possíveis lesões. Em seguida, as pregas vocais direita e esquerda foram removidas, evitando-se a manipulação de sua mucosa de cobertura (Figura 5). A prega vocal esquerda foi reservada para outro estudo e a prega direita foi preparada para microscopia de luz e análise imuno-histoquímica.

Para a análise setorial da prega vocal, foram estudados dois locais: máculas flavas (anterior e posterior) e porção medial da prega vocal (Figura 6).

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e técnicas imuno-histoquímicas. Para as reações imuno-histoquímicas, as peças emblocadas em parafina foram cortadas com 4 μ m de espessura, com auxílio do micrótomo rotativo (Leica®, modelo RM2165, Wetzlar; Germany) com navalhas descartáveis de aço inox 77x e os

cortes acondicionados em lâminas histológicas de vidro de borda esmerilhada (76 x 26 mm/3x1), previamente lavadas e sanilizadas. Na sequência foram desparafinadas através de três banhos de xilol e incubadas por cerca de cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram passados por quatro banhos de álcool absoluto para hidratação. O anticorpo utilizado nas reações imuno-histoquímicas foi o S100A4 (AB 41532-ABCAM, Cambridge, Cambridgeshire), para fibroblastos.

Figura 5: A - Exame Macroscópico da laringe humana após remoção, e dissecação da Prega vocal. B- Destaque para a prega vocal removida.



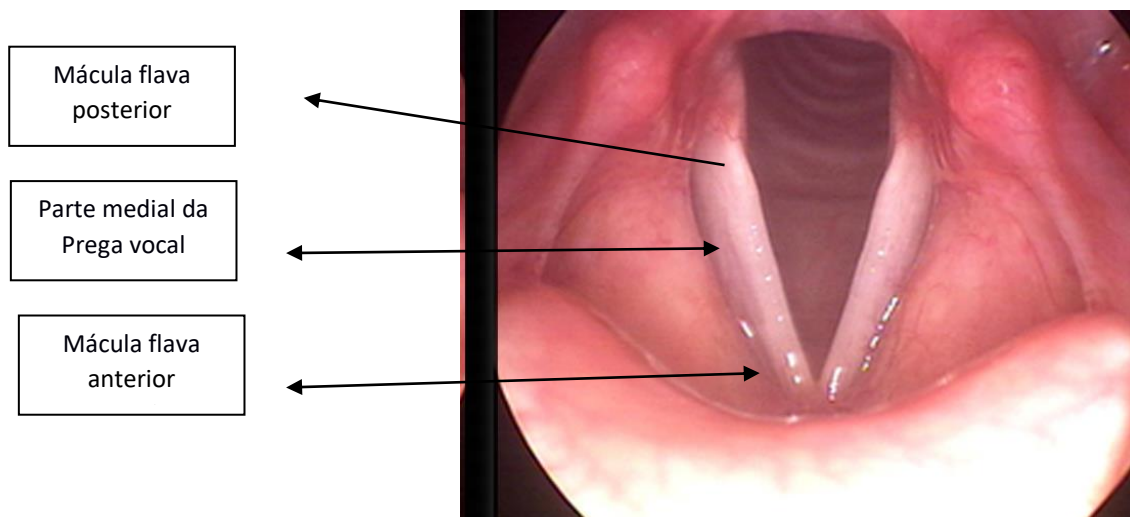


Figura 6. Ilustração demonstrando as áreas de estudo da prega vocal para as análises de microscopia de luz e imuno-histoquímica. MFA E MFP (extremidades) e Porção Medial da Prega Vocal (PMPV)

As lâminas histológicas e imuno-histoquímicas foram analisadas com lente 40x utilizando o software CellSens Standard (Olympus, EUA), levando em consideração a concentração, distribuição e imunoe expressão por S100A4 (Anticorpo AB41532).

As lâminas histológicas foram lidas cegamente para faixas etárias e locais. As imagens foram obtidas por uma câmera digital (modelo Axio Cam Hrc; Alemanha), acoplada a um microscópio e um microcomputador, digitalizado utilizando o software Axion Vision, versão 4.8, sempre com aumento de 40x. As camadas superficiais e intermediárias da lâmina própria foram selecionadas para as leituras. Foram fotografados quatro quadros não correspondentes. As imagens foram analisadas pelo programa Avsoft Bioview. As medidas de expressão de anticorpos foram identificadas pelo grau de acúmulo de coloração acastanhada nas células (Figura 7). A área estudada foi padronizada em μm^2 e o resultado foi dado em porcentagem (%).



Figura 7: Coloração imuno-histoquímica. Fibroblasto corado de castanho escuro.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos foram avaliados individualmente e comparados. Cada grupo (controle e idosos) foi inicialmente caracterizado pelas respectivas medianas, valores mínimos e máximos, para os dados não paramétricos. Para comparar as regiões entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar as regiões do mesmo grupo, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Todos os resultados analíticos foram discutidos considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Não houve diferença estatística na concentração de fibroblastos no grupo controle nas máculas flavas (2,54; 1,60 - 3,30) e na porção medial das pregas vocais (1,83; 0,94 - 4,33), $p=0,625$. Resultados semelhantes foram registrados no grupo de idosos: máculas flavas (2,0; 1,38 - 3,24) e porção medial das pregas vocais (2,66; 0,82 99 - 3,67), $p = 0,313$. (Tabela 1, figura 8).

Em relação ao local estudado, não houve diferença estatística nas máculas flavas entre o grupo controle (2,54; 1,60 - 3,30) e o grupo idoso (2,0; 102 1,38 - 3,24), $p=0,622$, bem como na porção medial das pregas vocais para o grupo controle (1,83; 0,94-4,44) e o grupo idoso (2,66; 0,82-3,67), $p 0,524$. (Tabela 1; figura 8).

Tabela 1: Mediana (mínimo-máximo) da concentração de fibroblasto (%) por área de acordo com o grupo e região (mácula flava e porção medial de prega vocal).

Variável	Grupo	Região		p-valor *
		MF	PV	
F(%)	Controle	2,43±0,668 2,54 [1,60 ; 3,30]	2,14±1,30 1,83 [0,94 ; 4,33]	0,625
	Idoso	2,19±0,714 2,00 [1,38 ; 3,24]	2,41±0,958 2,66 [0,82 ; 3,67]	0,313
P valor **		0,622	0,524	

* Valor p do teste de Wilcoxon; ** Resultado do teste de Mann-Whitney

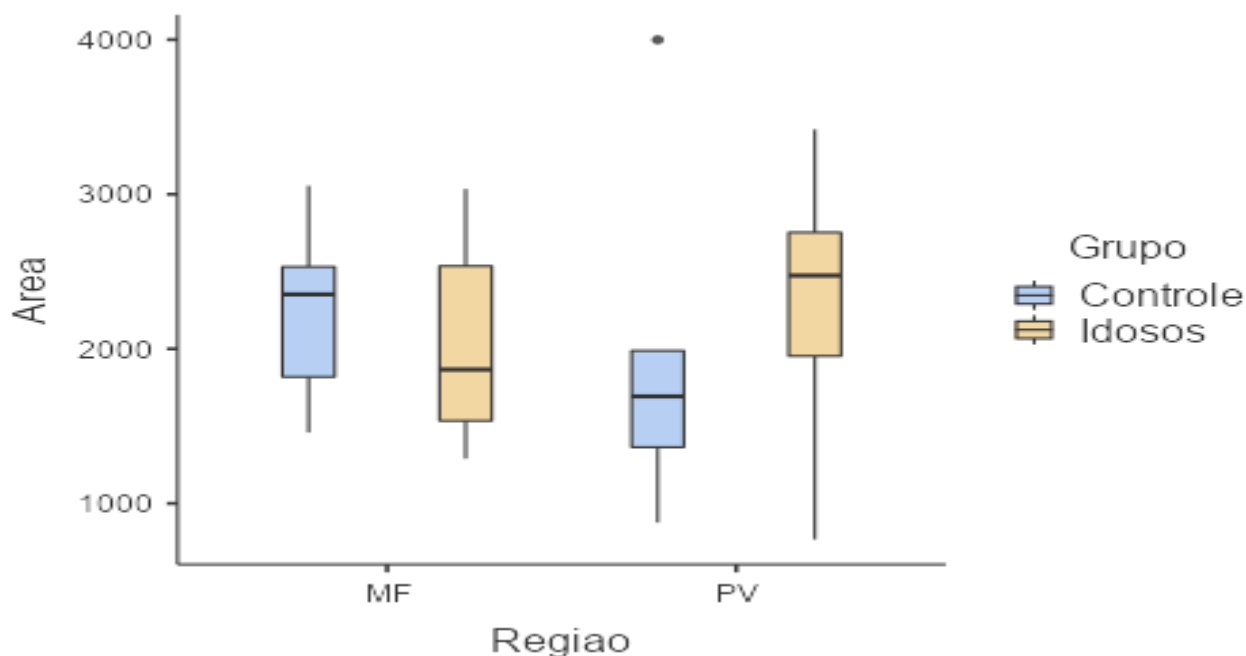


Figura 8: Boxplot das variáveis F(%) e Área, considerando grupos e regiões.

A Tabela 2 apresenta a área analisada, o local e os grupos. Não houve diferença estatística nas áreas do grupo controle, mácula flava (2,352; 1,458-3,055) e porção medial da prega vocal (1,892; 876-3,999), $p=0,625$, bem como no grupo idoso, máculas flavas (1,866;1,289-3,034) e porção medial da prega vocal (2,474; 767 - 109 3,419), $p=0,313$. Não foi observada diferença estatística entre os grupos por local estudado separadamente: máculas flavas (grupo controle [2,352;1,458-3,055] e grupo idoso [1,866;1,289- 3,034]), $p = 0,622$; porção medial da prega vocal (grupo controle [1.692;876-3.999], grupo idoso [2,474;767-3,419]), $p = 0,524$.

Tabela 2: * Média±desvio padrão, Mediana [mínimo; máximo] da variável por área, segundo o Grupo e Região

Variável	Grupo	Região		p-valor *
		MF	PV	
Área	Controle	2243±622 2352 [1458 ; 3055]	1984±1200 1692 [876 ; 3999]	0,625
	Idoso	2038±665 1866 [1289 ; 3034]	2248±890 2474 [767 ; 3419]	0,313
P valor **		0,622	0,524	

* Valor p do teste de Wilcoxon; ** Resultado do teste de Mann-Whitney

6. DISCUSSÃO

Na presbilaringe, há uma perda do equilíbrio entre a produção e a degradação da matriz fibrosa extracelular da lâmina própria, resultando em um aumento considerável na concentração de fibras colágenas e uma diminuição nas fibras elásticas e ácido hialurônico. Tais alterações anátomo-funcionais são responsáveis por parte dos sintomas vocais em idosos. Esta matriz fibrosa foi produzida por fibroblastos, mas a fisiopatologia do processo de senescência da voz ainda não está totalmente clara. Há dúvidas sobre a quantidade de fibroblastos na lâmina própria da laringe de idosos, bem como sua distribuição setorial. O desvendar dessa lacuna foi o principal objetivo deste estudo.

Estudos que visam identificar fibroblastos no tecido conjuntivo apresentam diversas dificuldades devido à heterogeneidade dessas células. Eles podem aparecer em diferentes formatos (oval, estrelado, elíptico ou fusiforme), dependendo do estágio de maturação e de diferenciação em que se encontram. Em estudos imuno-histoquímicos, os anticorpos carecem de especificidade para fibroblastos e podem corar fibras musculares lisas, células endoteliais e monócitos, necessitando de cautela na análise^{14,15}.

Nossos resultados mostraram que há uma concentração semelhante de fibroblastos na laringe de jovens e idosos, tanto na MF quanto na porção medial da prega vocal. Entretanto, analisando os valores separadamente, observou-se que a MF de laringes jovens concentrava maior população de fibroblastos, quando comparada à porção medial da prega vocal, como também demonstrado por outros autores¹⁶.

Para Hirano *et al.*⁴, os fibroblastos da MF contribuem para o desenvolvimento do ligamento vocal em neonatos e para sua manutenção e metabolismo em adultos. Nossos resultados indicaram que na laringe idosa a MF também estava ativa, em relação à concentração de fibroblastos. Na porção medial das pregas vocais, essa concentração foi ainda maior nos idosos, provavelmente por se tratar de uma área de maior vibração durante a fonação. Assim, não identificamos alterações quantitativas na concentração de fibroblastos com a idade, como sugerido por outros autores¹⁷.

Sato e Hirano¹⁷ analisaram dez pregas vocais humanas de idosos sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão e encontraram um número reduzido de fibroblastos, em comparação com laringes jovens, além de organelas degeneradas, acúmulo de grânulos de glicogênio e gotículas lipídicas no citoplasma, diminuição do número de fibras colágenas e fibras elásticas. Para esses autores, na laringe idosa há uma diminuição no número e na atividade de fibroblastos na MF e, conseqüentemente, há uma diminuição na síntese de componentes fibrosos. Esta última afirmação não foi confirmada por Pessin *et al.*¹³, que identificaram um aumento expressivo da MFE na lâmina própria da laringe dos idosos, mais especificamente, na porção fonatória da borda livre das pregas vocais.

Para Kawai *et al.*¹⁸, na laringe de idosos, há diminuição da atividade proliferativa dos fibroblastos, bem como de sua capacidade de produzir ácido hialurônico e fibras elásticas. As fibras colágenas são produzidas por miofibroblastos, que estão em alta concentração e têm a capacidade de produzir colágeno tipo I em abundância. Além disso,

há uma diminuição no *turnover* dessas fibras, as quais permanecem por muito tempo na lâmina própria antes ou depois de serem degradadas. Esses autores estudaram, *in vitro*, as pregas vocais de ratos jovens (12 semanas) e idosos (19 meses) e compararam a capacidade proliferativa, a população e a função dos miofibroblastos e a produção de matriz fibrosa. No grupo de idosos houve uma longa fase de mitose, um aumento nos miofibroblastos, muitos com disfunções e um aumento na produção de colágeno tipo I, mas com uma redução no *turnover* das células. Portanto, estudos adicionais com anticorpos específicos para miofibroblastos são necessários para avaliar a população dessas células.

Awd Allah *et al.*¹⁹ descreveram as características morfológicas de fibroblastos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), em laringes de diferentes faixas etárias (neonatos, adultos e geriátricas). Os locais estudados foram MF e espaço de Reinke (ER). Na MF de neonatos e adultos, predominaram fibroblastos em formato estrelado, com pequena relação núcleo/citoplasma e organelas bem desenvolvidas (retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi). No ER essas células eram ovais e fusiformes em adultos, com grande relação núcleo/citoplasma e organelas menos desenvolvidas. A maioria dos fibroblastos na MF da laringe geriátrica tinha uma forma estrelada. Os fibroblastos fusiformes predominaram no ER, semelhante aos adultos, mas com menos organelas. Os autores consideram que parte dos sintomas relatados na presbifonia pode ser justificada pelas alterações estruturais dos fibroblastos.

Para alguns autores, a atividade dos fibroblastos e a produção de matriz extracelular são dependentes da função. Assim, um estímulo mecânico desencadeia uma reação biomecânica. Os fibroblastos seriam mais ativos na laringe com maior função e menos ativos em idosos e em pacientes incapacitados. Confirmando essa hipótese, Sato *et al.*²⁰ analisaram a laringe de um paciente com sequelas neurológicas graves que o impediram de

falar por 11 anos, necessitando de laringectomia para controle de aspiração e pneumonias recorrentes. A análise histológica da laringe revelou intensa atrofia da mucosa das pregas vocais, ausência de ligamento vocal (semelhante ao neonato), ausência de padrão trilaminar da lâmina própria, fibroblastos elípticos, com pequena relação núcleo/citoplasma e poucas organelas.

Outro aspecto a ser discutido da presbifonia é a base genética individual. Por que a deterioração vocal não ocorre em 100% dos idosos mesmo após a 8ª década? Certamente, a origem da presbifonia é multifatorial e envolve fatores genéticos, nutricionais, gerais de saúde corporal e vocais.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo não foram constatadas diferenças quantitativas na concentração de fibroblastos nas laringes de idosos, quando comparada às laringes de adultos jovens, tanto nas máculas flavas como na porção medial das pregas vocais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Souza, SR, Pinhal SAM. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre a matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 2011, 36(1): 48-54
2. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1974;26:89–94.
3. Hirano M, Karita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Daniloff RG, editor. *Speech Science: Recent Advances*. San Diego: College-Hill Press: p. 1-46, 1985.
4. Hirano M, Sato K, Tadashi N. Fibroblasts in human vocal fold mucosa, *acta otolaryngologica*.1999;119: 271-76. [https://doi.org/ 10.1080/00016489950181800](https://doi.org/10.1080/00016489950181800).
5. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia básica – texto e atlas*. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.556 p. ISBN-10:85-2772311-5.
6. Gray SD, Titze IR, Alipour F, et al. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:77–85. <https://doi.org/10.1177/000348940010900115>.
7. Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115:469–476. [https://doi.org/ 10.1177/000348940611500612](https://doi.org/10.1177/000348940611500612).
8. Behlau M. *Voz: o livro do especialista*. v.1, 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2004.
9. Pontes P, Yamasaki R, Behlau M. Morphological and functional aspects of the senile larynx. *Folia Phoniatr Logop*. 2000;58:151–158. <https://doi.org/10.1159/000091729>.
10. Kendall K. Presbyphonia: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;15:137–140. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e328166794f>.

11. Martins RH, Goncalvez TM, Pessin AB, et al. Aging voice: presbyphonia. *Aging Clin Exp Res.* 2014;26:1–5. <https://doi.org/10.1007/s40520-013-0143-5>.
12. Pessin ABB, Martins RHG, Gushiken LFS, et al. Sectorial analysis of the fibrous matrix of vocal folds in the elderly. *J Voice.* 2022;36:309315. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.07.003>.
13. Roberts T, Morton R, Al-Ali S. Microstructure of the vocal fold in elderly humans. *Clin Anat.* 2011;24:544–551. <https://doi.org/10.1002/ca.21114>.
14. Thibeault SL, Li W, Bartley S. A method for identification of vocal fold lamina propria fibroblasts in culture. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139:816–822. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2008.09.009>.
15. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun.* 2022;13:3409. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30633-9>.
16. Hirano M, Sato K, Nakashima T. Fibroblasts in geriatric vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol.* 2000;120:336-40. <https://doi.org/10.1080/000164800750001215>.
17. Sato K, Hirano M. Age-related changes of the macula flava of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:839–844. <https://doi.org/10.1177/000348949510401102>.
18. Kawai Y, Kishimoto Y, Sogami T, et al. Characterization of aged rat vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope.* 2019;129:E94–E101. <https://doi.org/10.1002/lary.27464>.
19. Awd Allah RS, Dkhil MA, Farhoud E. Fibroblasts in the human vocal fold mucosa: an ultrastructural study of different age groups. *Singapore Med J.* 2009;50:201–207.

20. Sato KI, Umeno H, Ono T, et al. Histopathologic study of human vocal fold mucosa unphonated over a decade. *Acta Oto-Laryngologica*. 2011;131:1319–1325. <https://doi.org/10.3109/00016489.2011.61506>.