

Anete Antunes de Oliveira Branco

**Estudo do remodelamento da lâmina própria da
laringe relacionado ao processo de senilidade**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Bases Gerais de Cirurgia da Faculdade de Medicina
de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área Fonoaudiologia.**

Botucatu

2014

Anete Antunes de Oliveira Branco

**Estudo do remodelamento da lâmina própria da
laringe relacionado ao processo de senilidade**

Orientadora: Profa Livre Docente Regina Helena Garcia Martins

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Bases Gerais de Cirurgia da Faculdade de Medicina
de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área Fonoaudiologia.

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Branco, Anete Antunes de Oliveira.

Estudo do remodelamento da lamina propria da laringe relacionado ao processo de senilidade / Anete Antunes de Oliveira Branco. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Regina Helena Garcia Martins

Capes: 40700003

1. Idosos. 2. Colágeno. 3. Laringe. 4. Prega vocal. 5. Imunohistoquímica - Pesquisa. 6. Velhice - Pesquisa.

Palavras-chave: Idosos; Lâmina própria; Laringe; Pregas vocais.

**Àqueles que acreditam que
o que move o mundo não são as respostas e sim,
*as perguntas.***

Agradecimientos

À Dra Regina Helena Garcia Martins

pelo exemplo de dedicação à docência e à melhoria da pós-graduação.

Ao **Dr. Alexandre Todorovic Fabro** por estar sempre disposto às longas e proveitosas discussões sobre pesquisa.

Aos **funcionários técnicos e docentes do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP, campus Botucatu**, pela disponibilidade no preparo das peças histológicas.

Aos **funcionários técnicos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP** pelo auxílio na coleta de dados.

Ao **Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária/UNESP** pelo auxílio no protocolo das reações imuno-histoquímicas.

À Sessão Técnica de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, especialmente à **Regina Célia Spadin** e à **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, secretária do Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia pelas inúmeras colaborações.

Ao Dr **Hélio Amante Miot**, professor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP e à Biomédica **Gabrielli Brianezi** pelo auxílio no uso do *software* ImageJ.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

À **minha família**, sempre presente.

Lista de Figuras e Tabelas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimativa, em porcentagem, da distribuição da população brasileira em grupos de idade.....18
- Figura 2.** Exame de Videolaringoscopia da laringe de idoso. Observa-se atrofia das pregas vocais, fenda glótica do tipo fusiforme e proeminência das apófises vocais.....21
- Figura 3.** Esquema representativo do tamanho amostral e sua distribuição em faixas etárias.....30
- Figura 4.** Em (a) laringe incisada em sua porção posterior (campo anterior) para identificação e análise macroscópica das pregas vocais. Em (b) e (c), pregas vocais dissecadas.....31
- Figura 5.** Hematoxilina & Eosina. Em (a), prega vocal controle (30-50 anos), notando-se na lâmina própria fibras colágenas dispostas em rede frouxa entre alguns fibroblastos e vasos (H&E, 40x); em (b), prega vocal de idoso (60 - 75 anos) onde nota-se faixa densa de colágeno na camada subepitelial (seta, 20x); em (c), prega vocal de idoso (acima de 75 anos) onde nota-se colágeno denso ocupando a lâmina própria (seta) e espessamento da membrana basal (seta interrompida, 40x).....37
- Figura 6.** Reação imuno-histoquímica. Em (a) observa-se distribuição do colágeno I na membrana basal e na lâmina própria na laringe do grupo controle (20x). Em (b), imunopressão do colágeno I na laringe do grupo de idosos (60 – 75 anos) com marcação

mais evidente na lâmina própria (40x). Em (c), imunoposição do colágeno I na laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos). Observa-se marcação mais evidente do colágeno em toda a lâmina própria (40x).....39

Figura 7. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se distribuição homogênea do colágeno III em toda lâmina própria na laringe do grupo controle (40x). Em (b), imunoposição do colágeno III na laringe do grupo de idosos (60 – 75 anos) com marcação dispersa do anticorpo na lâmina própria (10x). Em (c), imunoposição evidente do colágeno III nas camadas mais profundas da lâmina própria da laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos) (10x).....39

Figura 8. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se marcação mais evidente do colágeno IV no endotélio dos vasos (seta) da lâmina própria na laringe do grupo controle (30-50 anos). Em (b) e em (c), observa-se marcação do colágeno IV no endotélio dos vasos da lâmina própria e na membrana basal na laringe dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos) e (c; acima de 75 anos). Magnificação 40x.....41

Figura 9. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se marcação mais evidente do colágeno V no endotélio dos vasos (seta) da lâmina própria na laringe do grupo controle (30-50 anos) (40x). Em (b) e em (c), observa-se marcação do colágeno V no endotélio dos vasos da lâmina própria e na membrana basal na laringe dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos, 20x) e (c; acima de 75 anos, 20x).....41

Figura 10. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunoposição da fibronectina na laringe do grupo controle (30 a 50 anos) (10x). Nota-se marcação mais evidente nas camadas

superficial e profunda da lâmina própria. Em (b), imunexpressão da fibronectina na laringe do grupo de idosos (60 - 75 anos) (10x) com marcação mais evidente na membrana basal e na camada profunda da lâmina própria. Em (c), imunexpressão da fibronectina na laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos) (10x). Nota-se evidente marcação do anticorpo em toda a lâmina própria.....43

Figura 11. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), (b) e (c), observa-se imunexpressão da laminina na laringe do grupo controle (a; 30 a 50 anos) (10x) e dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos) (10x) e (c; acima de 75 anos) (10x). Nota-se marcação discreta do anticorpo na membrana basal e no endotélio dos vasos da lâmina própria (setas).....43

Figura 12. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunexpressão da elastina na laringe do grupo controle (30-50 anos) (10x). Nota-se marcação homogênea do anticorpo em toda a lâmina própria. Em (b), imunexpressão da elastina na laringe do grupo de idoso (60-75 anos) (40x) com marcação mais evidente do anticorpo na camada superficial da lâmina própria e em (c), imunexpressão da elastina na laringe do grupo de idoso (acima de 75 anos) com marcação do anticorpo apenas na camada superficial da lâmina própria (seta) (20x).....45

Figura 13. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunexpressão do ácido hialurônico na laringe do grupo controle (30-50 anos) (10x). Nota-se evidente marcação do anticorpo na lâmina própria. Em (b), imunexpressão do ácido hialurônico na laringe do grupo de idosos (60-75 anos) com marcação mais expressiva nas camadas mais superficiais da lâmina própria (10x) e em (c), imunexpressão do ácido hialurônico na laringe do grupo de idosos (acima de

75 anos) com diminuição acentuada da densidade de marcação desse anticorpo, concentrando-se na região subepitelial da lâmina própria (20x).....45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Imunoexpressão dos anticorpos dos colágenos I e III medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão) ou Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.....38
- Tabela 2:** Imunoexpressão dos anticorpos dos colágenos IV e V medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.....40
- Tabela 3:** Imunoexpressão dos anticorpos da fibronectina e da laminina na lâmina própria das laringes medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão) ou Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria da prega vocal.....42
- Tabela 4:** Imunoexpressão dos anticorpos elastina e ácido hialurônico medida em porcentagem de área (%). Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.....44

SUMÁRIO

Listas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução e Literatura.....	17
1.1.Aspectos epidemiológicos.....	18
1.2. A presbifonia.....	20
1.2.1. Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos das pregas vocais na presbifonia.....	21
2. Objetivos.....	26
3. Casuística e Métodos.....	28
3.1.Preparo do material histológico e imuno-histoquímico.....	31
3.2. Análise da imunexpressão das proteínas.....	34
3.3. Análise Estatística.....	35
4. Resultados.....	36
4.1. Hematoxilina-Eosina.....	37
4.2. Imunexpressão dos Colágenos I e III.....	38
4.3. Imunexpressão dos Colágenos IV e V.....	40
4.4. Imunexpressão da Fibronectina e da Laminina.....	42
4.5. Imunexpressão da Elastina e Ácido Hialurônico.....	44
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	54
7. Anexos	56
8. Referências.....	59
9. Manuscritos originados a partir desta pesquisa.....	68
9.1. <i>Aging voice: presbyphonia.</i>	

9.2. *Hyaluronic acid behavior in the lamina propria of the larynx with advancing age.*

9.3. *Quantitative study concerning the vascular mesh of the vocal fold lamina propria from elderly subjects.*

9.4. *Remodeling of collagen and elastin in the lamina propria of the elderly larynx.*

RESUMO

Objetivo: estudar o remodelamento dos colágenos dos tipos I, III, IV e V, da elastina, da fibronectina, da laminina e do ácido hialurônico, no processo de senilidade da laringe humana por meio de estudo imuno-histoquímico. **Casuística e Métodos:** foram utilizadas 30 pregas vocais humanas masculinas removidas durante a rotina de necrópsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, sendo 20 laringes de idosos (n-10; 60-75 anos e n-10; acima de 75 anos) e 10 de adultos controles (de 30 a 50 anos). Os fragmentos das pregas vocais receberam as reações imuno-histoquímicas para os colágenos I, III, IV e V, elastina, fibronectina, laminina e ácido hialurônico. As leituras das lâminas foram realizadas quantificando-se o grau de acúmulo de coloração acastanhada das estruturas da lâmina própria e da membrana basal, sendo a área padronizada em μm^2 e o resultado dado em porcentagem de área pelo *software ImageJ*. **Resultados:** houve aumento da imunoposição dos colágenos I e III nas laringes dos idosos ($p < 0.05$). Os valores registrados do colágeno I na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 34,2%, 39,6% e 40,4%; na camada profunda, 31,8%, 44,4% e 46,9%. Os valores do colágeno III na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 25,6%, 31,2% e 32,4%; na camada profunda, 23,6%, 24,6% e 29,9%. Para os colágenos IV e V, observou-se maior intensidade de marcação desses anticorpos no endotélio dos vasos da camada superficial da lâmina própria e na membrana basal com discreta variação entre os grupos sem diferença estatística. Os valores registrados do colágeno IV na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 20,9%, 20,7% e 21,3%; na camada profunda, 17,6%, 19,3% e 20,4%. Os valores do colágeno V na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 38,5%, 36,2% e 31,8%; na camada profunda 36,6%, 35% e 31,3%. Houve aumento da imunoposição da fibronectina e da laminina na laringe dos idosos. Os valores registrados da fibronectina na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 20,6%, 30,2% e 36,2%; na camada profunda, 19,8%, 25,6% e 37,2%. Os valores registrados da laminina na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 11,7%, 18,7% e 19,1%; na camada profunda, 10,6%, 18,6% e 21%. Houve diminuição da imunoposição da elastina e do ácido hialurônico nas laringes dos idosos. Os valores registrados da elastina na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 28,2%, 20,8% e 15,9%; na camada profunda, 27,5%, 23% e 18,2%. Os valores do ácido hialurônico na camada superficial nas três faixas etárias foram respectivamente, 40,1%, 26,1% e 20,4%; na camada profunda, 38,2%, 23,8% e 23,3%. **Conclusões:** nas condições metodológicas deste estudo, os

resultados imuno-histoquímicos das análises das laringes de idosos mostraram evidente aumento de fibras colágenas I e III, de fibronectina e de laminina na lâmina própria das pregas vocais. No entanto, houve diminuição de fibras elásticas e de ácido hialurônico, nesse mesmo sítio. O comportamento dos colágenos IV e V não se diferiu nas diferentes faixas etárias. Tais achados representaram o condensamento da matriz extracelular, fornecido pelo aumento dos colágenos e a diminuição da viscoelasticidade, pelo decréscimo da elastina e ácido hialurônico.

ABSTRACT

Objective: to study the remodeling of collagen types I, III, IV and V, elastin, fibronectin, laminin and hyaluronic acid using immunohistochemical techniques during the aging process of human larynx. **Casuistic and Methods:** thirty male human vocal folds were removed during routine autopsy in the Department of Pathology at Botucatu Medical School/UNESP, of these, twenty elderly men (n-10; 60-75 years and n-10, over 75 years) and 10 adult male (30-50 years). The fragments of vocal folds received the immunohistochemical techniques for collagens types I, III, IV and V, elastin, fibronectin, laminin and hyaluronic acid. The readings of the lamina propria were carried out taking into account the accumulation of brownish color of its structures as well as basal membrane, given the standard area in μm^2 and the result in percentage of area by the *ImageJ* software. **Results:** there was an increase of immunoexpression of collagen types I and III in the larynxes of the elderly ($p \leq 0.05$). The values registered in the collagen type I on the superficial layer of the three age groups were respectively, 34.2%, 39.6% and 40.4%, whereas 31.8%, 44.4% and 46.9% in the deep layer. The values of the collagen type III in the superficial layer of the three age groups were respectively, 25.6%, 31.2% and 32.4%; while in the deep layer the values were 23.6%, 24.6% and 29.9%. For the collagen types IV and V, a higher intensity in the immunoexpression of these antibodies in the vascular endothelium of the superficial layer as well as the basal membrane was observed. The registered values for collagen type IV in the superficial layer in the three age groups were respectively 20.9%, 20.7% and 21.3% as well as 17.6%, 19.3% and 20.4% in the deep layer. The values of collagen type V in the superficial layer in the three age groups were respectively 38.5%, 36.2% and 31.8%; and in the deep layer, 36.6%, 35% and 31.3%. There was an increase of immunoexpression of fibronectin and laminin in the larynxes of the elderly. The values of fibronectin registered in the superficial layer in the three age groups were respectively 20.6%, 30.2% and 36.2%; in the deep layer, 19.8%, 25.6% and 37.2%. The registered values of laminin in the superficial layer were respectively 11.7%, 18.7% and 19.1%; in the deep layer 10.6%, 18.6% and 21%. There was a decrease of immunoexpression of elastin and hyaluronic acid in the superficial layer in the larynxes of the elderly. The values of elastin registered in the superficial layer were respectively 28.2%, 20.8% and 15.9%; and in the deep layer, 27.5%, 23% and 18.2%. The values of the hyaluronic acid in the superficial layer in the three ages were respectively 40.1%, 26.1% and 20.4%; but in the deep layer such values were 38.2%, 23.8% and 23.3%. **Conclusions:** with the methodological conditions of this study, the results of immunohistochemical analyzes of

the elderly larynx showed increase of collagen I and III, fibronectin and laminin in the lamina propria of the vocal folds. However, there was a decrease of elastic fibers and hyaluronic acid in the same place. The behavior of collagens IV and V did not differ between aged groups. These findings represented the condensate extracellular matrix provided by increase of the collagens and decrease of the viscoelasticity by decreased due to elastin and hyaluronic acid decreased.

1 Introdução e Literatura

1. INTRODUÇÃO E LITERATURA

1.1. Aspectos Epidemiológicos

Com o aumento da expectativa de vida, os idosos estão cada vez mais influentes e envolvidos em atividades políticas, esportivas, educacionais e sociais. Estima-se que em 2050, a população de idosos seja de dois bilhões, ou 20% da população mundial (UNFPA, 2012).

No Brasil, a estimativa prevê que em 2020 o país terá a sexta maior população idosa do mundo, com cerca de 32 milhões de pessoas, valores similares aos encontrados hoje em países desenvolvidos (Matos *et al.*, 2004). O crescimento do número de idosos no Brasil vem se mostrando linear. Em 2060 o IBGE estima que 33,7% da população brasileira sejam de idosos (Figura 1).

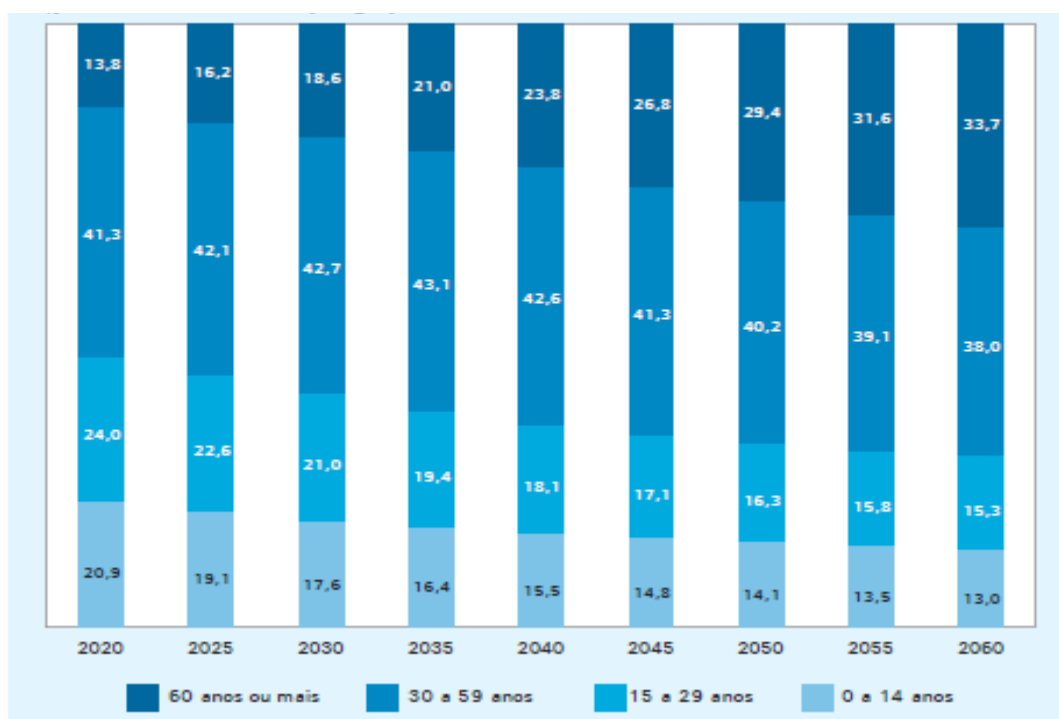


Figura 1. Estimativa, em porcentagem, da distribuição da população brasileira em grupos de idade. (IBGE, 2013).

As Nações Unidas projetam que entre 2000 e 2050, a participação da população jovem declinará de 28,8% para 19,9%, e, simultaneamente, a população adulta sofrerá uma redução de 63,4 para 56,5%. Por outro lado, o aumento estará concentrado na população idosa, a qual passará de 7,8% para 23,6%, intensificando o envelhecimento populacional brasileiro. Conjuntamente com essas projeções, a expectativa de vida no Brasil passará de 50 anos (na década de 1950) para 73,9 anos em 2025 a 2030 e 76,9 anos em 2045 a 2050 (United Nations, 2002).

Esse cenário tem estimulado pesquisas e ações para garantir um envelhecimento saudável e ativo. Com a busca de conhecimento sobre a laringe e a voz de idosos não tem sido diferente. Estudos no Japão e nos Estados Unidos mostram uma crescente demanda de pessoas com idade acima de 65 anos em busca de atendimento em serviços de saúde com queixas de voz. Em uma revisão retrospectiva entre os anos de 1999 a 2005, Takano *et al.* (2010) mostraram um aumento crescente da procura por atendimento em ambulatórios de voz de 9% em 1985, 13% em 1995, 20% em 2000 e 30% em 2005. Paralelamente, esses atendimentos médicos têm diagnosticado um número expressivo de pregas vocais com atrofia, alteração esta, comumente observada na presbifonia. Desta forma, os autores destacam o aumento do número do diagnóstico da presbilaringe em pessoas idosas.

Em outro extenso inquérito que incluiu 6.350 pacientes, Davids *et al.* (2012) investigaram o número de idosos que procuraram o serviço de Otorrinolaringologia nos Estados Unidos, no período entre 2004 a 2009. Os autores avaliaram os diagnósticos, o número de pacientes com atrofia de prega vocal e o tratamento proposto e constataram que 21% dessa população, cerca de 1.335, correspondiam aos idosos, sendo que 24,5% destes apresentavam pregas vocais atróficas. Dentre estes, 38,9% não haviam realizado tratamento vocal, 56,8% haviam sido submetidos à terapia de voz e 6,3% à laringoplastia para correção

da atrofia vocal. A partir desses resultados, os autores chamaram a atenção para a demanda crescente na busca de técnicas de tratamento da atrofia de pregas vocais pela população idosa.

1.2. A presbifonia

As mudanças estruturais e funcionais da laringe que vão ocorrendo ao longo da vida irão promover características vocais próprias, que na senescência são conhecidas como presbifonia. Como principais achados vocais na presbifonia observa-se diminuição do tempo máximo de fonação, aumento da frequência fundamental nos homens e diminuição nas mulheres, decréscimo da extensão de frequência vocal, aumento da nasalidade e da soproidade, astenia, tremor, rouquidão, instabilidade, diminuição na velocidade da fala e, conseqüentemente, perda da *performance* vocal (Behlau & Pontes, 1995; Carbonell *et al.*, 1996; Sataloff *et al.*, 1997; Behlau *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2014).

Ao observar a laringe do idoso durante exame de videolaringoscopia é possível verificar acentuada concavidade da margem livre das pregas vocais, secundária à atrofia do músculo vocal, proeminência das apófises vocais, as quais se configuram como “setas”, e presença de fenda glótica do tipo fusiforme (Behlau & Pontes, 1995; Paulsen *et al.*, 2000; Behlau *et al.*, 2001; Bloch & Behrman, 2001; Pontes *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2006), (Figura 2). O exame de videolaringoestroboscopia revela alterações na peridiocidade do ciclo glótico, diminuição da amplitude do movimento mucocondulatório, diminuição da excursão das aritenóides e fase do fechamento glótico diminuída (Behlau & Pontes, 1995). As cartilagens laríngeas tornam-se mais rígidas, pelo processo de calcificação, o número de glândulas mucosas fica reduzido, há lentificação na transmissão neuromuscular e diminuição no controle do neurônio neuromotor (Behlau *et al.*, 1988; Woo *et al.*, 1992).



Figura 2. Exame de Videolaringoscopia da laringe de idoso. Observa-se atrofia das pregas vocais, fenda glótica do tipo fusiforme e proeminência das apófises vocais.

Os parâmetros vocais acústicos também mostram diferenças entre as vozes de jovens e idosos, bem como entre os sexos. Dando continuidade ao estudo de Behlau *et al.* (1985), Priston *et al.* (1992) realizaram um extenso mapeamento dos valores da frequência fundamental e do tempo máximo de fonação de brasileiros de ambos os sexos nas variadas faixas etárias. Demonstraram, por meio deste estudo, que os valores da frequência fundamental vão se diferenciando com o avanço da idade, principalmente entre os homens. Nestes, a frequência fundamental variou entre 131,5Hz aos 60-69 anos a 153,8Hz na faixa etária entre 80 a 89 anos; já nas mulheres, variou entre 192,2Hz aos 60-69 anos para 191,2Hz aos 80-89 anos de idade. Deste modo, pode-se inferir que as mudanças que ocorrem na configuração laríngea durante a vida sejam um fator decisivo para os diferentes valores encontrados nas medidas acústicas e na percepção auditiva da voz do idoso.

1.2.1. Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos das pregas vocais na presbifonia.

No processo de envelhecimento ocorrem diversas alterações histológicas na cobertura epitelial da laringe e no músculo vocal. O epitélio das pregas vocais é do tipo

pavimentoso estratificado não queratinizado, composto por 5 a 10 camadas de células sobrepostas sobre uma delicada membrana basal de trajeto sinuoso, estando as células basais dispostas perpendicularmente a esta (Ross & Pawlina, 2006). Estudos histológicos de laringes submetidas à necrópsia têm identificado diminuição no número das células epiteliais do idoso, à semelhança do que se observa na derme. O epitélio pode se reduzir a duas ou três camadas de células, apresentando aspecto atrófico, o que prejudica a perfeita coaptação das pregas vocais e torna a voz mais baixa e soprosa (Gray, 2000; Kendall, 2007; Hirano *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2012).

A membrana basal da laringe do idoso torna-se espessada e a lâmina própria sofre alterações quantitativas. Esta foi descrita por Hirano (1974) como sendo de aspecto trilaminar, composta por uma camada superficial, posicionada logo abaixo da membrana basal, denominada de espaço de Reinke, uma camada intermediária, rica em fibras elásticas, e uma camada profunda, rica em fibras colágenas, posicionada sobre as fibras do músculo vocal. Na lâmina própria encontram-se alguns fibroblastos, fibras elásticas, fibras colágenas, glicosaminas, proteoglicans, glicoproteínas, alguns capilares e raras células leucocitárias. As principais proteínas fibrosas da lâmina própria são o colágeno e a elastina; as principais proteínas adesivas são a fibronectina e a laminina.

A matriz extracelular da lâmina própria da laringe é composta por um conjunto de macromoléculas que formam uma rede e são secretadas pelos fibroblastos que nela permeiam. Na matriz extracelular, fibras colágenas e elásticas estão imersas em um gel hidrofílico rico em proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, com função de suporte mecânico e resistência aos tecidos, além de facilitar a difusão de água e a migração celular. Seus componentes são produzidos no complexo de Golgi e na membrana plasmática das células.

A partir da descrição da microestrutura da prega vocal e sua importante participação na biomecânica da laringe, e conseqüentemente na qualidade vocal, os pesquisadores têm aprofundado os estudos morfológicos, a fim de compreender e reconhecer o mecanismo de participação das fibras elásticas, colágenas e das proteínas na fonação. Gray *et al.* (2000) confirmam que as fibras colágenas e elásticas têm relação com a biomecânica da prega vocal, afinal, a primeira suporta a tensão e o estiramento desta e a última, é responsável por sua deformidade e o pronto retorno à sua forma original.

As fibras colágenas se distribuem em toda a extensão da lâmina própria, desde as camadas superficiais até as mais profundas (Hammond *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2002), representam uma família de proteínas que desempenham a função de suporte na estrutura tecidual, garantindo estabilidade e resistência, papéis estes, de extrema importância na fisiologia vocal.

Por meio de estudo imuno-histoquímico, Tateya *et al.* (2006) descreveram a presença de elastina e colágenos dos tipos I, III, IV e V nas pregas vocais de adultos. O colágeno tipo I está distribuído na camada superficial da lâmina própria, bem próximo à membrana basal (fibras finas), camada profunda e máculas flavas; o tipo III é encontrado em toda a lâmina própria (fibras finas e grossas); os tipos IV e V (componente fibroso) estão distribuídos na membrana basal e no endotélio dos vasos e, por fim, a elastina é reconhecida na camada superficial, próxima à membrana basal, camada intermediária e profunda e na mácula flava. Os tipos I e III são os colágenos de maior presença na lâmina própria (Hahn *et al.*, 2006).

As fibras colágenas são importantes estruturas que envolvem as camadas da lâmina própria em adultos, devido à sua propriedade biomecânica e sua estreita relação com o epitélio superficial e a profundidade do músculo vocal (Prades *et al.*, 2010).

Madruga de Melo *et al.* (2003) demonstraram a distribuição do colágeno na lâmina própria e no músculo da prega vocal, conceituando o termo “cesta de vime” para o arranjo entrelaçado das fibras colágenas dos tipos I e III. Forma-se assim um arcabouço fibroso, com importante função na biomecânica da produção do som.

Em indivíduos idosos, as fibras elásticas se tornam diferentes morfológicamente em relação às dos adultos, ou seja, com o envelhecimento, a relação entre fibras colágenas e elásticas aumenta e o predomínio das primeiras culmina em rigidez e diminuição da onda mucocondulatória. Tais alterações, aliadas à diminuição da elastina e do ácido hialurônico, diminuem ainda mais a viscosidade das pregas vocais (Sato & Hirano, 1997; Hammond *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002). Essas alterações estruturais repercutem negativamente na *performance* vocal dos idosos (Hirano *et al.*, 2004).

Sato & Hirano (1997) sugerem que com o envelhecimento, as fibras elásticas perdem sua função de elasticidade, devido ao aumento da substância amorfa, à diminuição das microfibrilas e às alterações no seu metabolismo. Mais recentemente, por meio de um estudo experimental utilizando análise genética (pro-colágenos I e III e hialuronano), Ohno *et al.* (2009) relacionaram a diminuição da força fonatória na presbilaringe ao aumento das fibras colágenas na lâmina própria. A diminuição da densidade da matriz extracelular foi também relacionada pelos autores, especialmente à redução da densidade do ácido hialurônico.

Hammond *et al.* (2000), procurando estudar a concentração das fibras colágenas na laringe de diferentes idades, constataram por meio de um sistema de análise de imagem que nas lâminas coradas pelo picossírius, as fibras colágenas aumentam com a idade, tendo em vista sua maior concentração nas laringes dos homens idosos. Em relação à localização das fibras colágenas estudadas, os autores descreveram maior concentração destas na camada profunda da lâmina própria.

Pela complexidade e interdependência das microestruturas das pregas vocais, infere-se que no envelhecimento tais componentes estejam susceptíveis às mudanças orgânicas. Ximenes *et al.* (2003) realizaram análise histomorfométrica de 20 laringes de cadáveres (10 homens e 10 mulheres) com idades de 30 a 90 anos, utilizando como grupo controle os fragmentos de pele da região inguinal dos próprios sujeitos. Observaram diminuição da espessura da lâmina própria das pregas vocais e da densidade de células epiteliais com o envelhecimento, o que poderia justificar o padrão vocal do idoso. As alterações mostraram-se mais significativas nos homens e acompanharam o padrão da derme.

Pelo exposto, percebe-se a preocupação da maioria dos autores em estudar o comportamento das fibras elásticas, dos colágenos I e III e do ácido hialurônico na laringe dos idosos; no entanto estudos mais abrangentes, que incluam outros componentes da lâmina própria são escassos, justificando o desenvolvimento de outras pesquisas nesse tema.

2 Objetivos

2. OBJETIVOS

Estudar o remodelamento dos colágenos dos tipos I, III, IV e V, da elastina, da fibronectina, da laminina e do ácido hialurônico, no processo de senilidade da laringe humana por meio de estudo imuno-histquímico.

3 Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (protocolo 3861/2011) (Anexo 1).

Para o presente estudo, foram utilizadas 30 pregas vocais humanas masculinas removidas durante a rotina de necrópsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, tendo recebido aprovação prévia desse setor e do familiar com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Foram incluídas 20 laringes de idosos (entre 60 a 90 anos) e 10 de adultos controles (de 30 a 50 anos). O grupo de idosos foi subdividido em duas faixas etárias: 60-75 anos (n-10) e acima de 75 anos (n-10), mantendo-se o mesmo grupo controle. Foram selecionados apenas cadáveres do sexo masculino, pois o pequeno número de necrópsia de cadáveres do sexo feminino no período de estudo não nos permitiu comparação entre os gêneros nos parâmetros estudados.

A causa do óbito foi extraída da ficha de autópsia e sempre que possível, informações adicionais foram obtidas dos prontuários médicos e dos familiares. Foram excluídas as laringes de pacientes com septicemia, intubação prolongada, doenças infecciosas sistêmicas, demais doenças dermatológicas, auto-imunes ou metabólicas, traumatismo cervical de qualquer natureza, tabagismo, ou outras causas que pudessem comprometer a mucosa das pregas vocais e invalidar a análise do estudo imuno-histoquímico. Além disso, na seleção das peças, nove laringes precisaram ser descartadas e substituídas, por apresentarem lacerações e hematomas durante a remoção, o que resultou no tamanho amostral representado no esquema da figura 3.



Figura 3. Esquema representativo do tamanho amostral e sua distribuição em faixas etárias.

As laringes foram incisadas na sua porção posterior e examinadas macroscopicamente para identificação de possíveis lesões (Figura 4). Após este cuidadoso processo, as laringes foram delicadamente dissecadas, evitando-se a manipulação da superfície das pregas vocais. Como padronização, foi removida a porção mediana da prega vocal direita, sendo imediatamente fixada em formaldeído tamponado a 10% por 24 a 48 horas e após este período, lavada em água corrente durante 24 horas. Em seguida os fragmentos foram mantidos em solução de álcool 70% e encaminhados ao laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) para inclusão em blocos de parafina, preparo dos cortes histológicos e das reações imuno-histoquímicas.

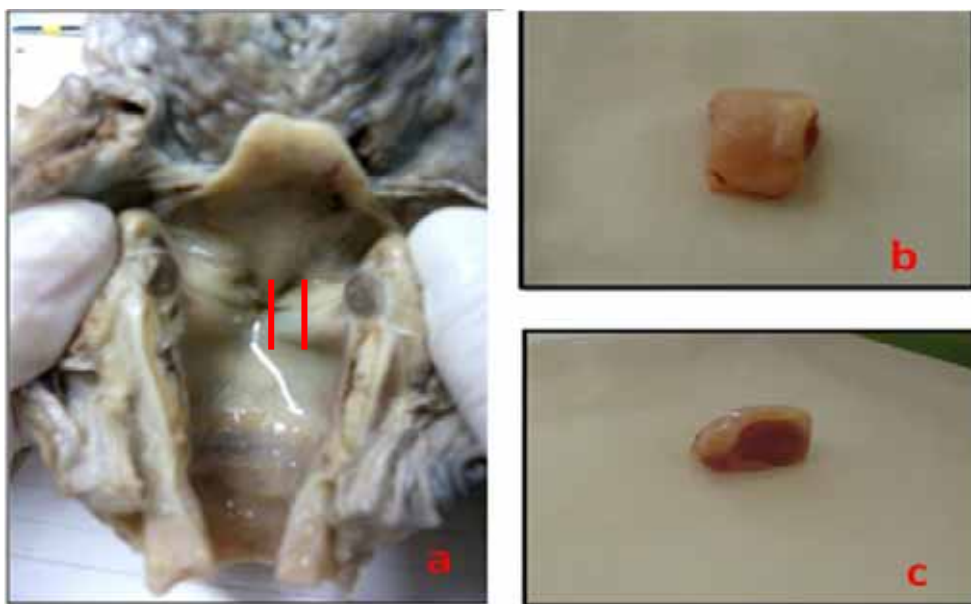


Figura 4. Em (a) laringe incisada em sua porção posterior (campo anterior) para identificação e análise macroscópica das pregas vocais. Em (b) e (c), pregas vocais dissecadas.

3.1.Preparo do material histológico e imuno-histoquímico

Primeiramente, os blocos de parafina de cada fragmento da laringe foram submetidos a cortes de 4 μ m de espessura, por meio do micrótomo rotativo (Leica®, modelo RM2165, Wetzlar; Germany), dispostos em lâminas esmerilhadas e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE).

Para as reações imuno-histoquímicas, os blocos incluídos em parafina, contendo a prega vocal, foram submetidos a novos cortes de 4 μ m pelo mesmo micrótomo rotativo usado nos cortes histológicos utilizando-se navalhas descartáveis de aço inox 77x. Os cortes foram mantidos em banho-maria a 37°C por alguns segundos, e em seguida estendidos em lâminas histológicas de vidro de borda esmerilhada (76 x 26 mm/3x1), previamente tratadas com poly-d-lysine, formando uma película de aderência do corte histológico à lâmina (lâmina silanizada). Os cortes foram incubados em estufa a 56°C por 12 horas para que

ocorresse a fixação do material à lâmina. Em seguida, as lâminas histológicas foram riscadas com ponta de diamante, delimitando a área do corte para que o anticorpo se concentrasse no ponto desejado. Após essa etapa, as lâminas histológicas foram transferidas para cestos especiais, a fim de serem desparafinadas, por meio de três banhos de Xilol, e incubadas por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram incubadas em quatro banhos de Etanol absoluto para sua hidratação. O excesso de líquido foi eliminado por lavagem em água corrente durante três minutos.

Os anticorpos e as técnicas utilizadas nas reações imuno-histoquímicas foram:

- **Colágenos I, III, V e elastina**

Para o colágeno I foi utilizado o anticorpo Col1A1 (Dako; USA), diluído a 1:2000; para o colágeno III foi utilizado anticorpo Col3A1 (Dako; USA) diluído a 1:1000; para o colágeno V foi utilizado anticorpo Col5A1 (Santa Cruz; USA) diluído a 1:100; para a elastina foi utilizado o anticorpo policlonal (Dako; USA) com diluição a 1:200. A recuperação antigênica para todas essas reações imuno-histoquímicas foi feita com pepsina a 1% e pH 1,8 por 15 minutos em estufa a 60°C e 30 minutos na estufa a 37°C. Foram realizados bloqueios de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%, seguido do bloqueio da proteína com leite desnatado a 3%. O material recebeu complexo secundário HRP Envision™ (Dako; USA) por 1 hora, diamino benzidina (DAB) por 5 minutos e Hematoxilina de Harris por 20 segundos.

Seguindo o protocolo preconizado pelo laboratório, o controle positivo utilizado para os colágenos I, III e V e elastina foi um fragmento de rim e para o controle negativo desses mesmos anticorpos, somente soluções salinas tamponadas, em substituição ao anticorpo primário, numa série de secções de cada amostragem.

- **Colágeno IV**

Para o colágeno IV foi utilizado anticorpo Col4A1 (Santa Cruz; USA) na diluição 1:40. Para a recuperação dos sítios antigênicos do colágeno IV foi utilizada câmara de pressurização Pascal® (Dako; USA) por 3 minutos, em solução de pré-tratamento Trilogy® (Cell Marque; USA).

Para o controle positivo foi utilizado fragmento de rim e para o controle negativo, somente soluções salinas tamponadas, em substituição ao anticorpo primário, numa série de secções de cada amostragem.

- **Fibronectina**

Para o estudo da imunexpressão da fibronectina foi utilizado o anticorpo policlonal antifibronectina (Dako;USA) na diluição a 1:2000. Para a recuperação dos sítios antigênicos deste anticorpo foi utilizada câmara de pressurização Pascal® (Dako; USA) por 3 minutos em solução de pré-tratamento Trilogy® (Cell Marque; USA).

Como controle positivo, foi utilizado coágulo sanguíneo incluído em parafina. Para controle negativo foram utilizadas somente soluções salinas tamponadas, em substituição ao anticorpo primário, numa série de secções de cada amostragem.

- **Laminina**

Para a pesquisa da laminina foi utilizado o anticorpo monoclonal antilaminina (Novocastra; Germany) na diluição a 1:75. A recuperação da laminina foi realizada com tripsina em temperatura ambiente. Como controle positivo optou-se por utilizar fragmentos de rim. Como controle negativo foram utilizadas somente soluções salinas tamponadas, em substituição ao anticorpo primário, numa série de secções de cada amostragem.

- **Ácido Hialurônico**

Para a pesquisa da imunexpressão do ácido hialurônico foi utilizado anticorpo secundário VECTASTAIN (Abcam, *United Kingdom*) e ABC kit (Vector Laboratories; USA) na diluição de 1:800. A recuperação antigênica foi realizada com a pepsina a 2% com pH 1,8 por 20 minutos em estufa a 60°C e 30 minutos em estufa a 37°C. O material recebeu complexo secundário HRP Advance™ (Dako; USA) por 30 minutos, Enzyne Advance por mais 30 minutos e por fim, diamino benzidina (DAB) por 5 minutos e Hematoxilina de Harris por 20 segundos.

Para o controle positivo foi utilizado fragmento de rim e para o controle negativo, somente soluções salinas tamponadas, em substituição ao anticorpo primário, numa série de secções de cada amostragem.

3.2. Análise da imunexpressão das proteínas

A leitura das lâminas histológicas foi realizada por patologista experiente, pela pós-graduanda envolvida na pesquisa e pelo orientador, sem conhecimento prévio dos grupos, na forma de consenso. Para essa finalidade utilizou-se microscópio de luz (Zeiss®, AxioStar plus, Carl-Zeiss; Brasil). O registro digital das imagens foi feito sempre em aumento de 40x, utilizando-se o *software AxionVision* (versão 4.8).

As leituras das lâminas foram realizadas quantificando-se o grau de acúmulo de coloração acastanhada nas estruturas da lâmina própria e membrana basal, sendo a área padronizada em μm^2 e o resultado dado em porcentagem de área (Collins, 2007; Miot & Brianezi, 2010) pelo software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Na segmentação, foi padronizado o polígono como ferramenta de isolamento da área de interesse, demarcando-se três campos aleatórios. O *plugin* utilizado para melhora do contraste foi o *Colour Decovolution* no HDAB e o ícone *Make Binary*, para a segmentação propriamente dita. Após

desfeita a randomização aleatória do material, os dados foram transportados para o programa Excel Windows® e colocados em forma de tabelas para análise estatística.

3.3. Análise Estatística

Para a comparação entre as faixas etárias, considerando o perfil de resposta, avaliado em duas camadas da prega vocal (camada superficial e camada profunda), foi utilizada a técnica da análise de variância paramétrica, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas. A opção pelo procedimento paramétrico (média e desvio padrão) foi estabelecida pela aderência à distribuição gaussiana e a homocedasticidade das variâncias dos grupos. No caso em que essas condições não foram observadas, o modelo não paramétrico foi utilizado (medianas e valores mínimos e máximos).

A significância das comparações foi apresentada por meio de letras maiúsculas (comparação entre faixas etárias, fixando-se a camada) e letras minúsculas (comparação entre as camadas, dentro de cada faixa etária). Dessa forma, duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si quanto às respectivas camadas ($p < 0,05$) dentro de cada faixa etária, considerando um nível de 5% de significância.

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Hematoxilina-Eosina

Nos cortes histológicos das lâminas do grupo controle a membrana basal mostrou-se delicada e a lâmina própria composta por tecido conectivo frouxo, alguns vasos e fibroblastos (Figura 5a).

Nas lâminas dos idosos observou-se densa rede de fibras colágenas subepitelial (Figuras 5b e 5c; setas contínuas), além de espessamento da membrana basal (Figura 5c; seta pontilhada). Essas alterações foram mais evidentes com o avanço da idade.

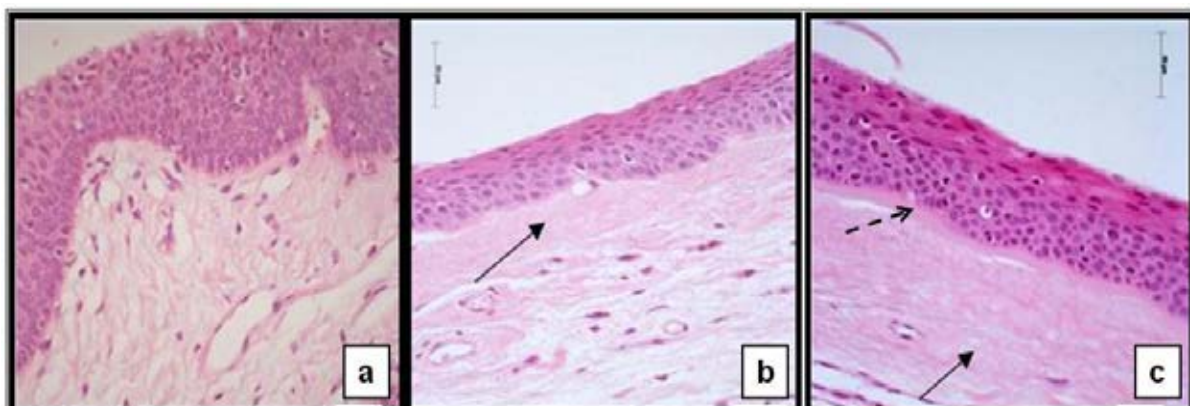


Figura 5. Hematoxilina & Eosina. Em (a), prega vocal controle (30-50 anos), notando-se na lâmina própria fibras colágenas dispostas em rede frouxa entre alguns fibroblastos e vasos (H&E, 40x); em (b), prega vocal de idoso (60 - 75 anos) onde nota-se faixa densa de colágeno na camada subepitelial (seta, 20x); em (c), prega vocal de idoso (acima de 75 anos) onde nota-se colágeno denso ocupando a lâmina própria (seta) e espessamento da membrana basal (seta interrompida, 40x).

4.2. Imunoexpressão dos Colágenos I e III

Tabela 1: Imunoexpressão dos anticorpos dos colágenos I e III medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão) ou Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.

Anticorpo	Anti Colágeno I		Anti Colágeno III	
	Camada Superficial	Camada Profunda	Camada Superficial	Camada Profunda
30 - 50	34,2 (8,5) ^A	31,8 (10,4) ^A	25,6 ^{Ab} (21,6 – 29,4)	23,6 ^{Aa} (20,5-29,9)
60 - 75	39,6 (5,1) ^B	44,4 (7,5) ^B	31,2 ^{Bb} (23,7-35,6)	24,6 ^{ABa} (20,1-29,7)
> 75	40,4 (5,7) ^B	46,9 (9,3) ^B	32,4 ^B (24,8-44,4)	29,9 ^B (22,1-40,1)

Duas medianas ou médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto às respectivas camadas ($p < 0,05$). Já duas medianas ou médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto às respectivas faixas etárias ($p < 0,05$).

Comentário geral: tanto para o colágeno I quanto para o III, houve aumento da densidade da marcação dos anticorpos nas laringes dos idosos, havendo diferença estatística entre seus subgrupos apenas na camada profunda na faixa etária acima de 75 anos.

COLÁGENO I

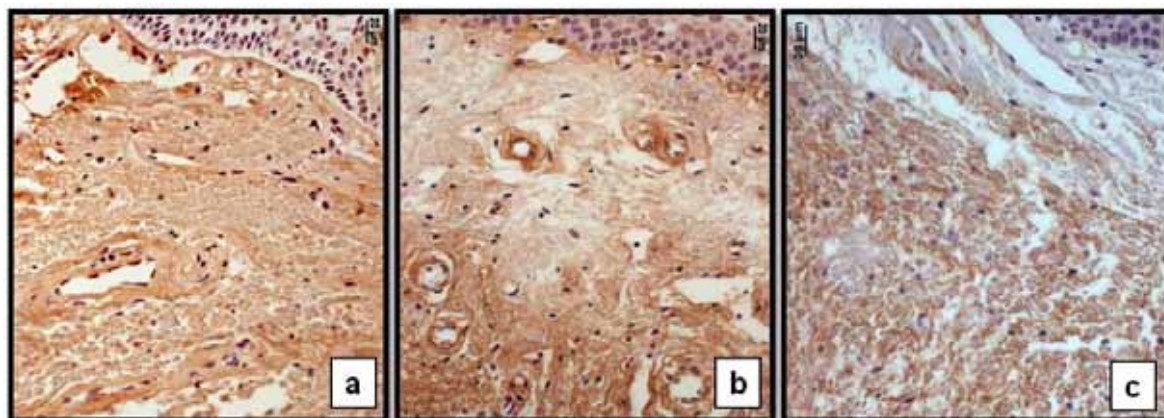


Figura 6. Reação imuno-histoquímica. Em (a) observa-se distribuição do colágeno I na membrana basal e na lâmina própria na laringe do grupo controle (20x). Em (b), imunoposição do colágeno I na laringe do grupo de idosos (60 – 75 anos) com marcação mais evidente na lâmina própria (40x). Em (c), imunoposição do colágeno I na laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos). Observa-se marcação mais evidente do colágeno em toda a lâmina própria (40x).

COLÁGENO III

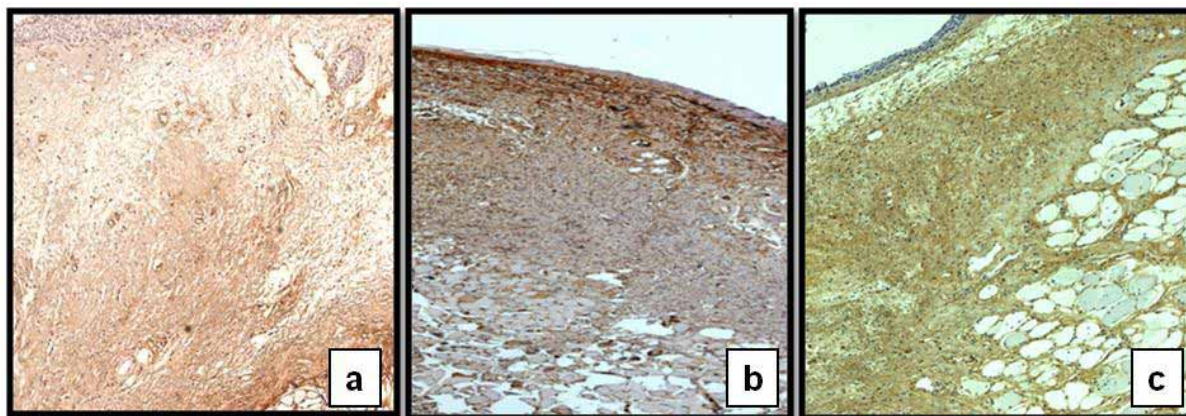


Figura 7. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se distribuição homogênea do colágeno III em toda lâmina própria na laringe do grupo controle (40x). Em (b), imunoposição do colágeno III na laringe do grupo de idosos (60 – 75 anos) com marcação dispersa do anticorpo na lâmina própria (10x). Em (c), imunoposição evidente do colágeno III nas camadas mais profundas da lâmina própria da laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos) (10x).

4.3. Imunoexpressão dos Colágenos IV e V

Tabela 2: Imunoexpressão dos anticorpos dos colágenos IV e V medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.

Anticorpo Faixa etária (em anos)	Anti Colágeno IV		Anti Colágeno V	
	<i>Camada Superficial</i>	<i>Camada Profunda</i>	<i>Camada Superficial</i>	<i>Camada Profunda</i>
30 - 50	20,9 (2,9) ^b	17,6 (3,7) ^a	38,5 (14,4) ^b	36,6 (8,5) ^a
60 - 75	20,7 (4,4) ^b	19,3 (4,2) ^a	36,2 (8,9) ^b	35,0 (5,6) ^a
> 75	21,3 (3,9) ^b	20,4 (3,5) ^a	31,8 (5,6) ^b	31,3 (6,0) ^a

Duas médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto às respectivas camadas ($p < 0,05$). Já duas médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto às respectivas faixas etárias ($p < 0,05$).

Comentário geral: para os colágenos IV e V, observou-se maior densidade de marcação desses anticorpos no endotélio dos vasos da camada superficial da lâmina própria e na membrana basal, sem haver diferença estatística entre as faixas etárias.

COLÁGENO IV



Figura 8. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se marcação mais evidente do colágeno IV no endotélio dos vasos (seta) da lâmina própria na laringe do grupo controle (30-50 anos). Em (b) e em (c), observa-se marcação do colágeno IV no endotélio dos vasos da lâmina própria e na membrana basal na laringe dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos) e (c; acima de 75 anos). Magnificação 40x.

COLÁGENO V

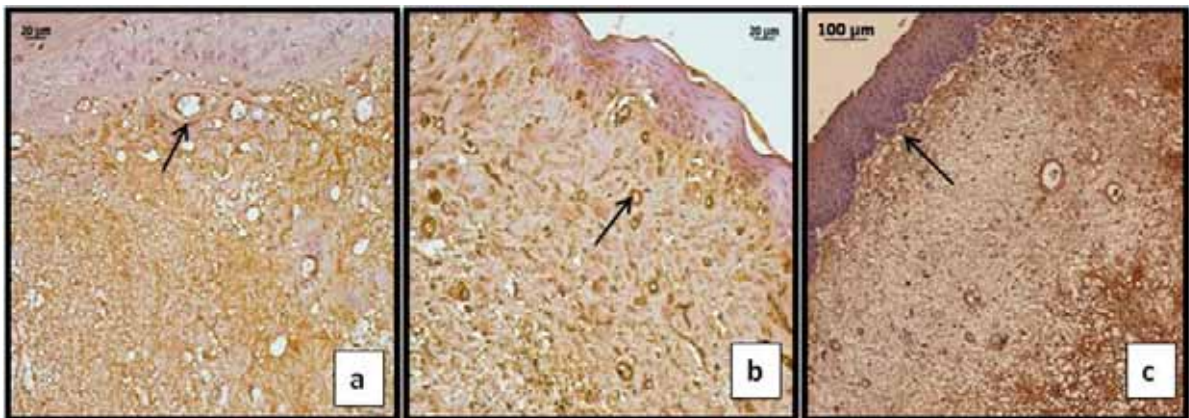


Figura 9. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), observa-se marcação mais evidente do colágeno V no endotélio dos vasos (seta) da lâmina própria na laringe do grupo controle (30-50 anos) (40x). Em (b) e em (c), observa-se marcação do colágeno V no endotélio dos vasos da lâmina própria e na membrana basal na laringe dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos, 20x) e (c; acima de 75 anos, 20x).

4.4. Imunoexpressão da Fibronectina e da Laminina

Tabela 3: Imunoexpressão dos anticorpos da fibronectina e da laminina na lâmina própria das laringes medida em porcentagem de área (%). Média (desvio padrão) ou Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria da prega vocal.

Anticorpo Faixa etária (em anos)	Anti Fibronectina		Anti Laminina	
	Camada Superficial	Camada Profunda	Camada Superficial	Camada Profunda
30 - 50	20,6 ^A (17,7 - 24,5)	19,8 ^A (17,9-23,2)	11,7 (1,6) ^A	10,6 (1,5) ^A
60 - 75	30,2 ^{AB} (20,3 – 38,6)	25,6 ^A (18,3-39,8)	18,7 (3,2) ^B	18,6 (2,6) ^B
> 75	36,2 ^B (30,9-39,5)	37,2 ^A (32,9-39,7)	19,1 (1,9) ^B	21,0 (2,2) ^B

Duas medianas ou médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto às respectivas camadas ($p < 0,05$). Já duas medianas ou médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto às respectivas faixas etárias ($p < 0,05$).

Comentário geral: a densidade da marcação do anticorpo da fibronectina e da laminina aumentou com a idade na lâmina própria, em ambas as camadas.

FIBRONECTINA

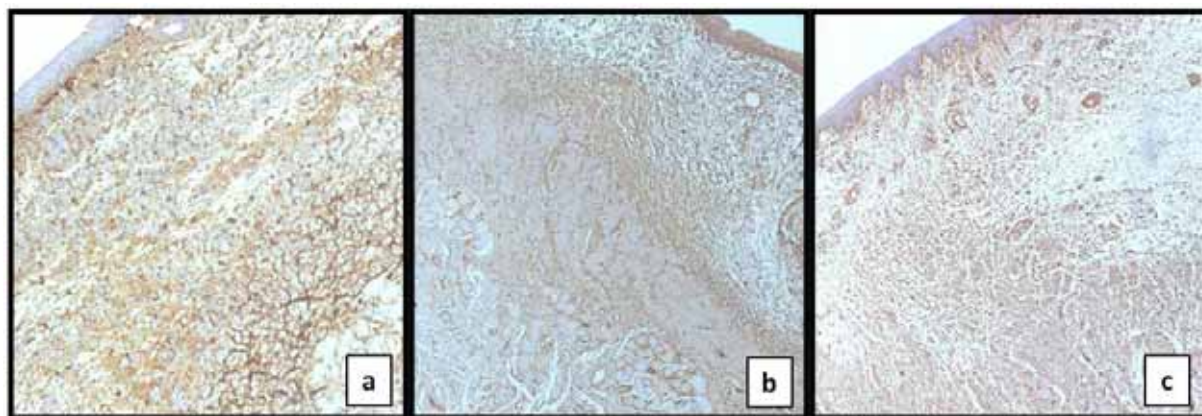


Figura 10. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunoexpressão da fibronectina na laringe do grupo controle (30 a 50 anos) (10x). Nota-se marcação mais evidente nas camadas superficial e profunda da lâmina própria. Em (b), imunoexpressão da fibronectina na laringe do grupo de idosos (60 - 75 anos) (10x) com marcação mais evidente na membrana basal e na camada profunda da lâmina própria. Em (c), imunoexpressão da fibronectina na laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos) (10x). Nota-se evidente marcação do anticorpo em toda a lâmina própria.

LAMININA

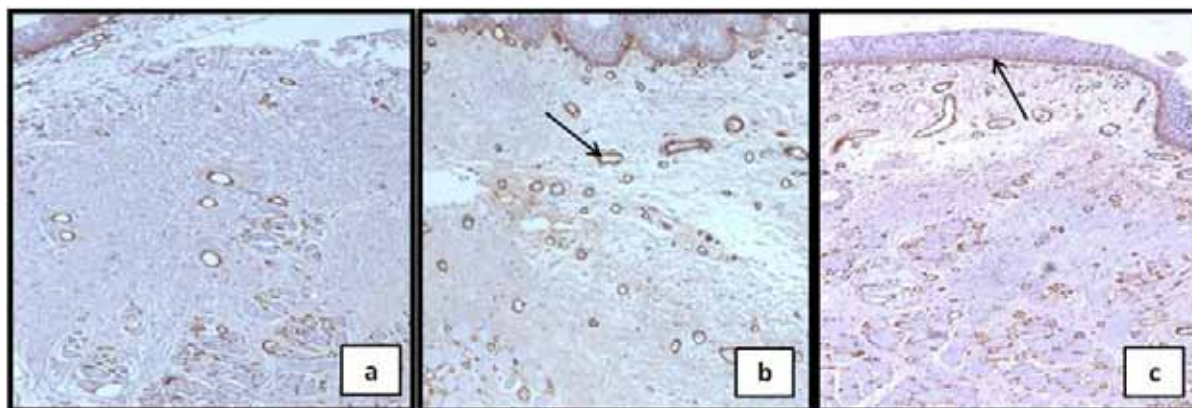


Figura 11. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), (b) e (c), observa-se imunoexpressão da laminina na laringe do grupo controle (a; 30 a 50 anos) (10x) e dos grupos de idosos (b; 60 – 75 anos) (10x) e (c; acima de 75 anos) (10x). Nota-se marcação discreta do anticorpo na membrana basal e no endotélio dos vasos da lâmina própria (setas).

4.5. Imunoexpressão da Elastina e Ácido Hialurônico

Tabela 4: Imunoexpressão dos anticorpos elastina e ácido hialurônico medida em porcentagem de área (%). Mediana (mínimo e máximo), segundo faixa etária e profundidade da lâmina própria das pregas vocais.

Anticorpo	Anti Elastina		Anti Ácido Hialurônico	
	<i>Camada Superficial</i>	<i>Camada Profunda</i>	<i>Camada Superficial</i>	<i>Camada Profunda</i>
Faixa etária (em anos)				
30 - 50	28,2 ^B (25,7-29,3)	27,5 ^B (23,6-33,3)	40,1 ^B (28,1-59,3)	38,2 ^B (23,7-51,7)
60 - 75	20,8 ^A (19,2-23,7)	23,0 ^{AB} (18,7-28,2)	26,1 ^A (18,4-34,8)	23,8 ^A (18,2-32,2)
> 75	15,9 ^A (10,8-24,3)	18,2 ^A (14,3-25,9)	20,4 ^A (15,9-34,5)	23,3 ^A (16,9-30,1)

Duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto às respectivas camadas ($p < 0,05$). Já duas medianas seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto às respectivas faixas etárias ($p < 0,05$).

Comentário geral: a densidade de marcação da elastina diminuiu com o avanço da idade em ambos os grupos de idosos. Houve também diminuição da densidade de marcação do ácido hialurônico com o avançar da idade.

ELASTINA

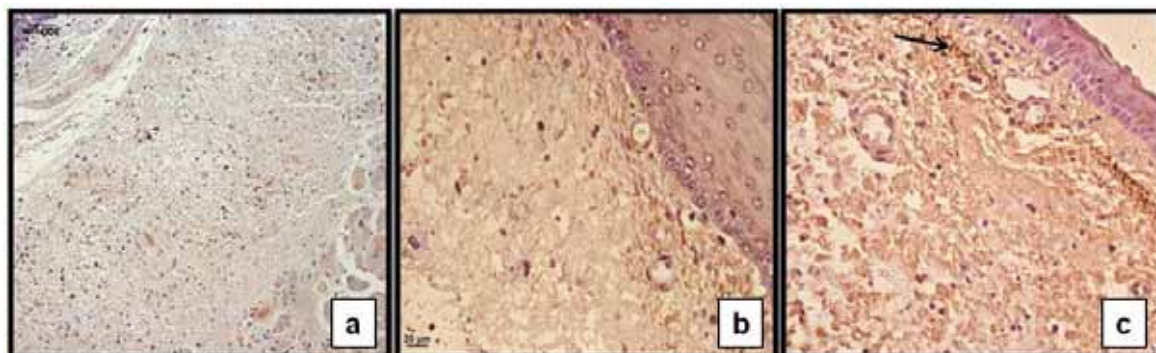


Figura 12. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunoposição da elastina na laringe do grupo controle (30-50 anos) (10x). Nota-se marcação homogênea do anticorpo em toda a lâmina própria. Em (b), imunoposição da elastina na laringe do grupo de idoso (60-75 anos) (40x) com marcação mais evidente do anticorpo na camada superficial da lâmina própria e em (c), imunoposição da elastina na laringe do grupo de idoso (acima de 75 anos) com marcação do anticorpo apenas na camada superficial da lâmina própria (seta) (20x).

ÁCIDO HIALURÔNICO

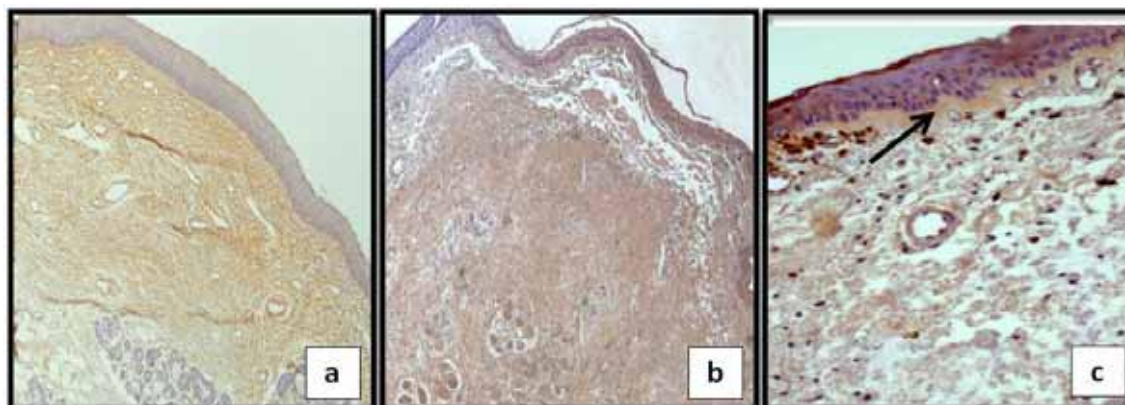


Figura 13. Reação Imuno-histoquímica. Em (a), imunoposição do ácido hialurônico na laringe do grupo controle (30-50 anos) (10x). Nota-se evidente marcação do anticorpo na lâmina própria. Em (b), imunoposição do ácido hialurônico na laringe do grupo de idosos (60-75 anos) com marcação mais expressiva nas camadas mais superficiais da lâmina própria (10x) e em (c), imunoposição do ácido hialurônico na laringe do grupo de idosos (acima de 75 anos) com diminuição acentuada da densidade de marcação desse anticorpo, concentrando-se na região subepitelial da lâmina própria (20x).

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

Com o envelhecimento, uma série de mudanças estruturais e funcionais ocorre na cobertura epitelial, no músculo e na lâmina própria das pregas vocais, destacando-se a atrofia das camadas epiteliais e do músculo vocal, além de alterações na densidade das fibras de colágeno, das fibras elásticas e do ácido hialurônico (Gray, 2000; Hirano *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006). Parte dessas alterações nos componentes da lâmina própria puderam ser comprovadas no presente estudo nas laringes de idosos, mesmo nos cortes de HE, como diminuição da espessura do epitélio, espessamento da membrana basal e rede densa de colágeno na lâmina própria (Figura 5). As colorações imuno-histoquímicas revelaram que esta rede é formada principalmente pelos colágenos I e III (Tabela 1; figuras 6 e 7) e que nas laringes dos idosos há expressiva diminuição na densidade da elastina e do ácido hialurônico (Tabela 4; figuras 12 e 13). Essas alterações estruturais na cobertura das pregas vocais são responsáveis pelo enrijecimento das mesmas (Gray *et al.*, 2000; Kendall, 2007; Paulsen *et al.*, 2010), manifestado clinicamente pelos sintomas de rouquidão, fadiga vocal e restrição na extensão vocal, o que dificulta a emissão da voz em frequências mais agudas (Gorham-Rowan & Laures-Gore, 2006; Gregory *et al.*, 2012).

Segundo Ohno *et al.* (2009), o aumento do colágeno na laringe do idoso prejudica o movimento mucocondulatório, resultando na diminuição da força fonatória e da frequência fundamental, especialmente nas mulheres. A voz torna-se fraca e débil, o que caracteriza o quadro de fonastenia (Behlau *et al.*, 2001).

As análises vocais acústicas computadorizadas de idosos têm registrado diminuição da frequência fundamental nas vozes femininas e elevação nas masculinas, além de variações na intensidade, tremor e diminuição na extensão vocal. Parte dessas alterações

foi constatada por Dehqan *et al.* (2012) em análise acústica das vozes de idosos acima de 70 anos (21 homens e 20 mulheres), quando comparadas às de um grupo controle, com tamanho amostral similar e idades entre 23 a 40 anos. Estes autores registraram valores mais elevados de f_0 nas vozes dos homens idosos e mais baixos nas mulheres. Os valores de *shimmer* (perturbação da amplitude) e de *jitter* (perturbação da frequência fundamental) foram expressivamente mais elevados nos idosos (principalmente nos homens) do que nos controles. Contrariamente, a relação harmônico/ruído foi maior nas vozes dos controles, espelhando as alterações vocais observados na presbifonia.

A presbifonia é parte fisiológica do processo de senilidade que ocorre em todo o organismo. Procurando correlacionar as alterações que ocorrem nas pregas vocais do idoso com o restante da cobertura epitelial do organismo, Ximenes Filho *et al.* (2003) realizaram, concomitantemente, análise histomorfométrica das pregas vocais e da pele da região inguinal de 20 cadáveres idosos (10 homens e 10 mulheres) e identificaram, em ambos os sítios, alterações similares como atrofia da lâmina própria e do epitélio.

A manutenção da proporção entre as fibras elásticas e as colágenas na lâmina própria da laringe é importante para manter a resistência local, fornecida pelas fibras colágenas, e a distensibilidade do órgão, favorecida pelas fibras elásticas. Estudos em laringes de animais (Kolachala *et al.*, 2010) e de humanos (Tateya *et al.*, 2006) confirmaram o papel do colágeno I na resistência e do colágeno III e da elastina na flexibilidade e elasticidade, parâmetros estes, que atuam como uma “balança” no equilíbrio entre a participação das camadas das pregas vocais na fonação. A partir do momento em que as fibras colágenas passam a predominar na lâmina própria, as pregas vocais tornam-se mais rígidas, repercutindo negativamente sobre as qualidades vocais (Kendall, 2007).

Na tentativa de compreender melhor como ocorre a produção anormal de colágeno na laringe do idoso, Kosztyła-Hojna *et al.* (2002) estudaram a ultraestrutura das

pregas vocais de idosos, removidas durante o processo de necrópsia ou de laringectomias totais por carcinomas de laringe supraglóticos, sem que houvesse comprometimento das pregas vocais propriamente ditas. Os autores constataram, por meio de análise de microscopia eletrônica de transmissão, destruição de células epiteliais, degeneração vacuolar, alargamento do espaço intercelular, aumento considerável das fibras colágenas, degeneração vacuolar dos fibroblastos, aumento do retículo endoplasmático reticular e aumento no número de vasos sanguíneos. Esses autores atribuem o aumento na produção do colágeno, às alterações citoplasmáticas observadas nos fibroblastos. Essa afirmação merece estudos complementares, uma vez que o tema é escasso na literatura.

Por mecanismos ainda não totalmente desvendados, os fibroblastos das laringes de idosos, produzem colágeno de forma exagerada e irregular e menor quantidade de ácido hialurônico e de fibras elásticas. Hirano *et al.* (2004), em estudo experimental de cultura de fibroblastos de laringes de ratos jovens e idosos, registraram menores quantidades de ácido hialurônico e maiores concentrações de colágenos I produzidos pelos fibroblastos da laringe de ratos idosos. Resultado inverso foi constatado por esses autores quando os fibroblastos foram expostos ao fator de crescimento de fibroblastos (FCF). Assim, essa medida foi considerada método terapêutico potencial para a remodelação dos colágenos da lâmina própria, abrindo novos horizontes para o tratamento da presbifonia (Ford, 2004; Ohno *et al.*, 2009).

Os fibroblastos presentes nas camadas das pregas vocais são os responsáveis, porém não exclusivos pela síntese de todo o material extracelular, desempenhando papel-chave no suporte da lâmina própria tanto em condições fisiológicas normais quanto nas doenças. Grande parte dos fibroblastos se encontra de forma inativa na lâmina própria das pregas vocais, porém, quando o tecido é lesado, estes se ativam e se diferenciam em miofibroblastos, os quais geram uma ampla contração e ativação das proteínas da matriz

extracelular com objetivo de facilitar a cicatrização da ferida (Hirano *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2010; Cox & Erler, 2011; Li *et al.*, 2011; Jetté *et al.*, 2013). Além desta importante propriedade, os miofibroblastos também são descritos no desenvolvimento de doenças fibroproliferativas e tumorais (Eyden *et al.*, 2009) e mais recentemente, no envelhecimento (Vendrenne *et al.*, 2012).

As fibras elásticas da laringe dos idosos não são apenas encontradas em menor número, como também apresentam alterações estruturais. Sato & Hirano (1997) constataram que no envelhecimento estas perdem sua função de elasticidade, devido ao aumento da substância amorfa, diminuição das microfibrilas e alteração no seu metabolismo. Assim, podemos inferir que o sincronismo do sistema fonatório torna-se passível às mudanças biomecânicas, pelo remodelamento fisiológico da matriz extracelular (Roberts *et al.*, 2011).

Paralelamente às alterações acima mencionadas, a densidade do ácido hialurônico também diminui com o avanço da idade, como detectado nos resultados deste estudo, em todas as camadas da lâmina própria. O ácido hialurônico é um componente importante da matriz extracelular, pertence à família dos glicosaminoglicanos não sulfatados, e é sintetizado por fibroblastos e macrófagos (Ramos *et al.*, 2012). Nas pregas vocais, auxilia na estabilidade mecânica, viscoelasticidade, controle osmótico, bem como na regeneração, reparo, preenchimento dos tecidos e barreira contra infecções (Gray, 2000; Butler *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Hirano *et al.*, 2004; Thibeault *et al.*, 2004; Fuja *et al.*, 2006; Hahn *et al.*, 2006; Lebl *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2009).

Na lâmina própria da laringe, nas camadas superficiais, há maior concentração do ácido hialurônico, e o próprio mecanismo fonatório parece ser um importante estímulo para a produção de matriz extracelular e de fator de crescimento de fibroblastos.

Butler *et al.* (2001), em estudo que incluiu laringes submetidas à necrópsia de cadáveres adultos e idosos, de ambos os sexos, identificaram distribuição irregular na

quantidade de ácido hialurônico na lâmina própria nas laringes femininas e mais regular nas masculinas. Nas mulheres, esse componente foi quantificado em maior quantidade na camada profunda da lâmina própria, ficando a camada superficial desprovida do mesmo. Os autores sugerem que esses achados estejam diretamente relacionados ao maior número de lesões registrado nas laringes femininas, pois a menor quantidade de ácido hialurônico nas camadas superficiais implicaria em menor habilidade na reparação aos traumatismos laríngeos. Corroboram essas suposições o fato das laringes de recém-nascidos possuírem menor concentração desse componente em suas máculas flavas. Para alguns autores, essa teoria também justifica o aumento na concentração de ácido hialurônico na lâmina própria de pacientes portadores de lesões fonotraumáticas, sendo sua produção estimulada pela colisão constante entre as pregas vocais. Fundamentados nessa hipótese, alguns autores preconizam o início precoce da reabilitação vocal nos pacientes após microcirurgia de laringe, uma vez que a produção de matriz extracelular e a atividade dos fibroblastos poderiam auxiliar na prevenção de escaras e, conseqüentemente, na melhora precoce da *performance* vocal. Thibeault *et al.* (2004) constataram aumento da concentração de ácido hialurônico em pregas vocais de animais submetidos à escara, demonstrando seu papel protetor e reparador de tecidos.

Estudos experimentais têm demonstrado que em animais, a concentração do ácido hialurônico da laringe também diminui com a idade. Ramos *et al.* (2012), compararam a concentração de ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas idosas e jovens e constataram que nos animais jovens, a concentração desse componente era quase o dobro do que nos animais idosos (1275,6 ng/mg *versus* 581,7 ng/mg), demonstrando o comportamento similar da distribuição do ácido hialurônico nas laringes das diversas espécies de animais.

Kolachala *et al.* (2010) examinaram a concentração de ácido hialurônico e de colágeno na laringe de cinco ratos em processo de senescência acelerada experimentalmente,

e cinco ratos em processo de envelhecimento natural. Os níveis de colágenos 1 mRNA aumentaram com o envelhecimento, bem como a proteína alfa actina de miofibroblastos; contrariamente, os níveis de ácido hialurônico diminuíram com a idade em ambos os grupos, confirmando os achados dos estudos anteriores.

No presente estudo observamos também aumento na densidade de fibronectina e da laminina nas laringes dos idosos. A fibronectina é uma glicoproteína produzida pelos fibroblastos, identificada principalmente na lâmina própria e na membrana basal. Participa na adesão, diferenciação e manutenção celular; está presente em laringes normais, porém é detectada em quantidade aumentada em tecidos lesados e expostos ao traumatismo constante. Hirano *et al.* (2003) comprovaram a participação da fibronectina na reparação tecidual em estudo em cães, no qual as pregas vocais foram escarificadas e as análises imuno-histoquímicas revelaram aumento desse anticorpo após dois e seis meses do procedimento. A fibronectina encontra-se aumentada também em lesões laríngeas fonotraumáticas. Em estudo imuno-histoquímico prévio, Martins *et al.* (2010) identificaram quantidade expressiva desse anticorpo na lâmina própria dos nódulos vocais, consideradas importantes lesões fonotraumáticas; porém, no edema de Reinke esta glicoproteína foi registrada em menor quantidade pelos mesmos autores (Martins *et al.*, 2009).

A laminina é também uma glicoproteína da lâmina densa da membrana basal e do endotélio dos vasos, os quais também estão em maior número na lâmina própria dos idosos, como constatado nos resultados deste estudo. Participa da adesão celular e do controle da passagem de fluídos através da membrana basal, sendo muito estudada em amostras de edema de Reinke e carcinomas de laringe (Durbeej, 2010).

Com função estrutural, a membrana basal e o endotélio dos vasos agrupam ainda os colágenos dos tipos IV e V, os quais proporcionam também sustentação da lâmina própria (Prades *et al.*, 2010). Como observado em nossos resultados, estes anticorpos,

quantificados nesses sítios, também aumentaram com o avanço da idade. Resultados similares são descritos em laringes com processo inflamatório crônico, como constatado por alguns autores em estudos morfológicos (Baltaziak *et al.*, 2010). Provavelmente, o aumento desses colágenos esteja relacionado ao aumento concomitante no número de vasos sanguíneos, observado tanto no processo inflamatório crônico persistente como no envelhecimento.

Sato & Hirano (1997) descreveram a estrutura e as funções dos pericitos na mucosa das pregas vocais de recém-nascidos e adultos de até 65 anos de idade, por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Os autores encontraram um grande número de pericitos ao redor dos capilares (arteriais e venosos) na mucosa das pregas vocais, com função de proteção e suporte dos capilares durante a vibração tecidual, não havendo diferenças morfológicas e funcionais entre as idades estudadas.

Em síntese, o mecanismo da vibração das pregas vocais é regido pelas propriedades biomecânicas teciduais da laringe. As alterações observadas nos componentes da lâmina própria da laringe dos idosos são interpretadas nos exames endoscópicos como atrofia de pregas vocais e fenda fusiforme, fornecendo à voz diferentes graus de rouquidão, astenia e soprosidade. Essas “novas” configurações micro e macroanatômicas presentes na laringe do idoso podem espelhar o remodelamento fisiológico idade-dependente, ou seja, com as mudanças estruturais da lâmina própria das pregas vocais que ocorrem no envelhecimento, o desempenho da matriz extracelular e seus componentes necessitam se remodelar para cumprir suas funções.

Os resultados das análises imuno-histoquímicas do presente estudo corroboram os de outros autores nesta linha de pesquisa e auxiliam na compreensão da fisiopatologia da presbifonia e no delineamento terapêutico.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

Nas condições metodológicas deste estudo, os resultados imunohistoquímicos das análises das laringes de idosos mostraram evidente aumento de fibras colágenas I e III, de fibronectina e de laminina na lâmina própria das pregas vocais. No entanto, houve diminuição de fibras elásticas e de ácido hialurônico, nesse mesmo sítio. O comportamento dos colágenos IV e V não se diferiu nas diferentes faixas etárias.

Tais achados representaram o condensamento da matriz extracelular, fornecido pelo aumento dos colágenos e a diminuição da viscoelasticidade, pelo decréscimo da elastina e ácido hialurônico.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em seres Humanos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 02 de maio de 2011.

Of. 178/11-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena Garcia Martins
Departamento de Oftalmologia/Otorrinolaringologia e CCP da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Cara Dr^ª Regina Helena,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3861-2011) "Alterações morfológicas relacionadas ao processo de senilidade: Estudo de microscopia de luz e imunohistoquímico", a ser conduzido por Anete Antunes de Oliveira Branco, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02 de maio de 2.011.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Alterações morfológicas relacionadas ao processo de senilidade: Estudo de microscopia de luz e imunohistoquímico.

Estamos realizando um projeto de pesquisa com a finalidade de avaliar as alterações ocorridas nas pregas vocais de indivíduos idosos. Com este estudo, procuraremos identificar as alterações das estruturas das pregas vocais de pessoas com mais de 60 anos, para que no futuro se possam estudar estratégias de prevenção e terapêuticas para que os idosos possam fazer melhor uso de sua voz. Para esta finalidade será realizado estudo microscópico das pregas vocais removidas rotineiramente durante o processo de necropsia de pacientes do departamento de Patologia. O estudo incluirá peças de laringe de cadáveres adultos e idosos com idade acima de 60 anos. Solicitamos sua colaboração no sentido de autorizar o estudo do material obtido na necropsia de seu familiar. Os dados pessoais dos autopsiados que participarem deste estudo não serão publicados em momento algum. O Sr(a) poderá desistir ou se recusar a autorizar a inclusão de seu familiar no projeto a qualquer momento, mesmo tendo inicialmente aceito. Se o Sr(a) tiver alguma dúvida adicional, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição através do telefone (14) 3811-6143. Este documento será elaborado em duas vias, uma será entregue ao participante e outra ficará com o pesquisador.

Termo de consentimento livre e esclarecido direcionado aos familiares

Tendo sido informado sobre o projeto de pesquisa acima relacionado de autoria da fonoaudióloga Anete Antunes de Oliveira Branco, sob orientação da Prof^a Dr^a Regina Helena Garcia Martins, concordo em participar do mesmo autorizando a utilização das peças da laringe de meu familiar previamente removidas durante a necropsia para esse estudo, bem como a publicação em revistas científicas dos resultados encontrados.

Familiar: _____

Dr^a Regina Helena Garcia Martins: _____

Fga Anete Antunes de Oliveira Branco: _____

8 Referências

Baltaziak M, Koszyła-Hojna B, Moskal D, Falkowski D. Morphological conditions of dysphonia in patients with vocal folds edema. *Pol Merkur Lekarski*. 2010;29(171):181-186.

Behlau MS, Tosi O, Pontes PAL. Determinação da frequência fundamental e suas variações em altura (jitter) e intensidade (shimmer) para falantes do português brasileiro. *Acta AWHO*. 1985;4:5-9.

Behlau M, Pontes PL, Ganaça MM, Tosi O. Presbifonia – tratamento da deterioração vocal inerente à idade. *Acta AWHO*. 1988;7:110-115.

Behlau M, Pontes PAL. Avaliação e tratamento das Disfonias. São Paulo: Lovise, 1995.

Behlau M, Azevedo R, Pontes P. Conceito de voz normal e classificação das Disfonias. In: Behlau M (org.) *Voz: o livro do especialista*. Rio de Janeiro: Revinter; vol 1, p.53-79; 2001.

Bloch I, Behrman A. Quantitative analysis of videostroboscopic images in presbylarynges. *Laryngoscope*. 2001;111(1):2022-2027.

Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2001;111:907-911.

Carbonell J, Tolosa F, Juan E. Presbifonía: estudo de los parámetros acústicos de normalidad. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1996;47:295-299.

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007;43:S25-S30.

Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech.* 2011;4:165-178.

Dauids T, Klein AM, Johns MM. Current dysphonia trends in patients over the age of 65: is vocal atrophy becoming more prevalent? *Laryngoscope.* 2012;122:332-335.

Dehqan A, Scherer RC, Dashti G, Ansari-Moghaddam A, Fanaie S. The effects of aging on acoustic parameters of voice. *Folia Phoniatr Logop.* 2012;64(6):265-270.

Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res.* 2010;399(1):259-268.

Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, Fisher C. The myofibroblast and its tumours. *J Clin Pathol.* 2009;62(3): 236-249.

Ford C. Voice restoration in presbyphonia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(9):1117.

Fuja TJ, Ostrem EM, Probst-Fuja MN, Titze IR. Differential cell adhesion to vocal fold extracellular matrix constituents. *Matrix Biol.* 2006;25(4):240-251.

Gorhan-Rowan MM, Laures-Gore J. Acoustic-perceptual correlates of voice quality in elderly men and women. *J Commun Disord.* 2006;39(3):171-184.

Gray SD. Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000;33(4):679-697.

Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109:77-85.

Gregory ND, Chandran S, Lurie D, Sataloff RT. Voice disorders in the elderly. *J Voice.* 2012;26(2):254-258.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115:225-232.

Hammond T, Gray S, Butler J. Age and gender related collagen distributions in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109:913-920.

Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr.* 1974;26:89-94.

Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope.* 2003;113(6):966-972.

Hirano S, Bless DM, Ríó AM, Connor NP, Ford CN. Therapeutic potential of growth factors for aging voice. *Laryngoscope.* 2004;114(12):2161-2167.

Hirano S, Kishimoto Y, Suehiro A, Kanemaru S, Ito J. Regeneration of aged vocal fold: first human case treated with fibroblast growth factor. *Laryngoscope.* 2008;118(12):2254-2259.

Hirano S, Kishimoto Y, Suehiro A, Kanemaru S, Ito J. Regeneration of aged vocal fold: first human case treated with fibroblast growth factor. *Laryngoscope*. 2009;119(1):197-202.

IBGE. Projeções da População Brasil e Unidades da Federação. Série Relatórios Metodológicos;v.40;2013.

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/

Jetté ME, Hayer SD, Thibeault SL. Characterization of human vocal fold fibroblasts derived from chronic scar. *Laryngoscope*. 2013;123(3):738-745.

Kendall K. Presbyphonia: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;15(3):137-140.

Kolachala VL, Torres-Gonzalez E, Mwangi S, Kelly P, Brigham KL, Pavlath GK, Rojas M, Johns MM. A senescence accelerated mouse model to study aging in the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;142(6):879-885.

Kosztyla-Hojna B, Andrzejewska A, Rogowski M, Pepinski W. Evaluation of the ultrastructure of the vocal folds mucosa in patients with presbyphonia. *Otolaryngol Pol*. 2002;56(2):239-243.

Lebl MD, Martins JR, Nader HB, Simões Mde J, De Biase N. Concentration and distribution of hyaluronic acid in human vocal folds. *Laryngoscope*. 2007;117(4):595-599.

Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability*. 2011;20(4):108-120.

Madruga de Melo EC, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113:2187-2191.

Martins RHG, Domingues MA, Fabro AT, Dias NH, Santana MF. Reinkes' edema: immunoexpression study of fibronectin, laminin and collagen IV in 60 cases by immunohistochemical techniques. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(6):821-825.

Martins RH, Defaveri J, Custódio Domingues MA, de Albuquerque e Silva R, Fabro A. Vocal fold nodules: morphological and immunohistochemical investigations. *J Voice*. 2010;24(5):531-539.

Martins RHG, Gonçalves TM, Pessin AB, Branco A. Aging voice: presbyphonia. *Aging Clin Exp Res*. 2014;26(1):1-5.

Matos DL, Giatti L, Lima-Costa MF. Fatores sócio-demográficos associados ao uso de serviços odontológicos entre idosos brasileiros: um estudo baseado na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. *Cad Saude Publica*. 2004;20(5):1290-1297.

Miot HA, Brianezi G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85:361-364.

Ohno T, Hirano S, Rousseau B. Age-associated changes in the expression and deposition of vocal fold collagen and hyaluronan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009; 118(10):735-741.

Paulsen F, Kimpel M, Lockemann U, Tillman B. Effects of ageing on the insertion zones of the human vocal fold. *J Anat*. 2000;196:41-54.

Pontes P, Brasolotto AG, Behlau M. Glottic characteristics and voice complaint in the elderly. *J Voice*. 2005;19(1):84-94.

Pontes P, Yamasaki R, Behlau M. Morphological and functional aspects of the senile larynx. *Folia Phoniatr Logop*. 2006;58(3):151-158.

Prades JM, Dumollard JM, Duband S, Timoshenko A, Richard C, Dubois MD, Martin C, Peoc'h M. Lamina propria of the human vocal fold: histomorphometric study of collagen fibers. *Surg Radiol Anat*. 2010;32:377-382.

Priston J, Gonçalves MI, Behlau MS. Análise da frequência fundamental, do tempo máximo de fonação e do fluxo aéreo adaptado em falantes do português brasileiro. In: Behlau MS (ed) *Anais do II Congresso Internacional de Fonoaudiologia e VII Encontro Nacional de Fonoaudiólogos*. Resumo, TL8. Rio de Janeiro; 1992.

Ramos HV, Neves LR, Martins JR, Nader HB, Pontes P. Influence of aging on hyaluronic acid concentration in the vocal folds of female rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(3):14-8.

Roberts T, Morton R, Al-Ali S. Microstructure of the vocal fold in elderly humans. *Clin Anat.* 2011;24(5):544-551.

Ross MH, Pawlina W. *Histology. A text and atlas.* 6nd edition. Phialadelphia; Wolters Kluwer, Lippincott Willians & Wilkins, 2006.

Sataloff RT, Rosen DC, Hawkshaw M, Spiegel JR. The aging adult voice. *J Voice.* 1997;11(2):156-160.

Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal volds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997;106:44-48.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Age-related changes of collagenous. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111:15-20.

Takano S, Kimura M, Nito T, Imagawa H, Sakakibara KI, Tayama N. Clinical analysis of presbylarynx – vocal fold atrophy in elderly individuals. *Auris Nasus Larynx.* 2010;37:461-464.

Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;116(6):469-476.

Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope.* 2004;114(4):760-764.

UNFPA and HelpAge International. Ageing in the Twenty-First Century. A celebration and a challenge. UNFPA and HelpAge International. p190; 2012.

UNITED NATIONS. World population ageing 1950-2050. New York: United Nations, 2002. 484p.

Vendrenne N, Coulomb B, Danigo A, Bonté F, Desmoulière A. The complex dialogue between (myo)fibroblasts and extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol Biol.* 2012;60:20-27.

Vyas B, Ishikawa K, Duflo S, Chen X, Thibeault SL. Inhibitory effects of HGF and IL-6 on TGF- β 1 mediated vocal fibroblast-myofibroblast differentiation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010;119(5):350–357.

Ximenes Filho JA, Tsuji DH, Nascimento PHS, Sennes LU. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112:894-898.

Ward PD, Thibeault SL, Gray SD. Hyaluronic acid: its role in voice. *J Voice.* 2002;16(3):303-309.

Woo P, Casper J, Cotton R. Dysphonia in the aging: physiology versus disease. *Laryngoscope.* 1992;102:139-144.

*9 Manuscritos originados a partir desta
pesquisa*
