

Influence of aging on hyaluronic acid concentration in the vocal folds of female rats

Influência do envelhecimento na concentração de ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas fêmeas

Hugo Valter Lisboa Ramos¹, Luciano Rodrigues Neves², João Roberto M. Martins³, Helena B. Nader⁴, Paulo Pontes⁵

Keywords:

aging,
larynx,
vocal cords,
rats,
hyaluronic acid.

Palavras-chave:

envelhecimento,
laringe,
pregas vocais,
ratas,
ácido hialurônico.

Abstract

The vibration of the vocal fold lamina propria is an important factor involved in vocal production and aging may change the amount of hyaluronic acid in the vocal fold leading to dysphonia. **Aims:** This study compares the concentration of hyaluronic acid in vocal folds of aged and young female rats. Study design: experimental. **Materials and Methods:** We used the vocal cords of 13 female rats divided into two groups: five aged rats and eight young ones. The tissue concentration of hyaluronic acid was determined using the fluorimetric method with the hyaluronic acid binding-protein coated on plates of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), conjugated with biotin. Europium-labeled streptavidin was added and, after europium release with the use of enhancement solution, the final fluorescence was measured in a fluorometer. **Results:** We found the following concentrations of hyaluronic acid in vocal fold according to the group: 581.7 ng/mg in old female rats and 1275.6 ng/mg in young female rats. Statistical analysis showed differences between groups. **Conclusions:** The vocal folds of old female rats have a lower concentration of hyaluronic acid when compared to such concentration on the vocal folds of young female rats.

Resumo

A vibração das pregas vocais é um importante fator envolvido na produção vocal e o envelhecimento pode alterar a quantidade de ácido hialurônico da prega vocal levando a disfonia. **Objetivo:** Este estudo compara a concentração de ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas fêmeas idosas e jovens. Desenho do estudo: estudo experimental. **Material e Método:** Foram utilizadas pregas vocais de 13 ratas fêmeas divididas em dois grupos: cinco ratas idosas e oito ratas jovens. A concentração tecidual do ácido hialurônico foi determinada por meio de método fluorimétrico utilizando a proteína de ligação ao ácido hialurônico imobilizada em placas de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e também conjugada à biotina. Estreptavidina marcada com európio foi adicionada e, depois de európio ter sido liberado com o uso de solução de enhancement; a fluorescência final foi medida em um fluorímetro. **Resultados:** Foram encontradas as seguintes concentrações de ácido hialurônico nas pregas vocais de acordo com os grupos: 581,7 ng/mg em ratas idosas e 1275,6 ng/mg em ratas jovens. A análise estatística mostrou diferença entre os grupos. **Conclusão:** A prega vocal de ratas idosas tem uma menor concentração de ácido hialurônico do que a concentração da prega vocal de ratas jovens.

¹ Doutor pela Universidade Federal de São Paulo (Médico do Hospital São Paulo).

² Doutor pela Universidade Federal de São Paulo (Médico do Hospital São Paulo, Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo).

³ Doutor (Professor e Pesquisador Associado do Departamento de Bioquímica, da Divisão de Biologia Molecular e Departamento de Medicina, Disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo).

⁴ Pós-Doutorado (Professora Titular do Departamento de Bioquímica, da Divisão de Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo).

⁵ Livre Docente (Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Diretor do Campus São Paulo - Vila Clementino da Universidade Federal de São Paulo).

Endereço para correspondência: Dr. Hugo Valter Lisboa Ramos. Rua Napoleão de Barros, 715, sala 17. Vila Clementino. São Paulo - SP. CEP: 04024002.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 6 de maio de 2011. cod. 7761

Artigo aceito em 1 de fevereiro de 2012.

INTRODUÇÃO

Desde os primeiros estudos histológicos¹ da prega vocal (PV), que demonstraram a íntima relação entre a fisiologia da produção do som e a estrutura da lâmina própria (LP) das pregas vocais, essa região tem despertado a atenção dos laringologistas em todo mundo.

A PV possui uma LP rica em glicosaminoglicanos (GAG), que são as proteínas intersticiais responsáveis pelo preenchimento e pela viscosidade dos tecidos.

O ácido hialurônico (AH), um dos principais GAG da LP, possui alta densidade de cargas negativas em sua estrutura. Isso o torna altamente hidrofílico, fazendo-o ser o grande responsável pela viscosidade, fluidez e preenchimento tecidual²⁻⁴.

Vários tipos de distúrbios podem alterar a quantidade de AH das PV e comprometer a qualidade da fonação, sendo o envelhecimento um dos mais prevalentes. Características glóticas indicativas de presbilaringe, como PV arqueada e proeminência dos processos vocais, têm sido descritas por vários autores⁵⁻⁷ e sugerem redução da turgência da LP, com possível redução da concentração de AH.

Outros autores descreveram os efeitos do envelhecimento sobre proteínas fibrosas, mostrando atrofia das fibras elásticas e aumento da densidade das fibras de colágeno da LP^{8,9}.

Apesar de também ter sido demonstrada uma diminuição na expressão de genes que codificam a AH sintase nas pregas vocais de ratos idosos¹⁰, as tentativas de quantificar as diferenças na quantidade de AH relacionadas com o envelhecimento não foram bem sucedidas e requerem estudos metodologicamente mais específicos^{11,12}. Métodos de coloração de tecidos que simultaneamente identificam vários tipos de GAGs são, muitas vezes, erroneamente utilizados para avaliar a quantidade de AH.

O objetivo deste estudo é comparar a concentração de ácido hialurônico em PV de ratos do gênero feminino jovens e idosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, tendo sido realizado estudo experimental.

Usamos as PV de 13 ratas Wistar-sp fêmeas, com cerca de 250 gramas. Foram considerados ratos idosos aqueles com idade próxima aos 24 meses.

Incluimos oito ratas do gênero feminino jovens e cinco ratas do gênero feminino idosas, não gestantes e não puérperas, sem uso prévio de qualquer tipo de medicamento e com alimentação *ad libitum*. A laringe foi removida cerca de 2 minutos após o sacrifício e foi conservada em microtubos tipo eppendorf com acetona.

Preparação de amostras

As duas pregas vocais de cada rata fêmea foram retiradas da laringe e fragmentadas em pequenas partículas. O tecido foi pesado após a centrifugação e secagem, tendo sido, então, submetido à digestão das proteínas com o uso de protease (maxatase alcalino protease; Biocon do Brasil Industrial, Rio de Janeiro, Brasil). Após a inativação da protease por meio de fervura, as amostras foram centrifugadas e a camada flutuante foi coletada para a quantificação do AH.

Quantificação AH

Para a determinação do AH, realizamos método fluorimétrico utilizando a proteína de ligação ao ácido hialurônico (PLAH)¹³. A PLAH é isolada da cartilagem bovina e compreende a região globular de um proteoglicano denominado agrecan. No nosso estudo, ela foi usada imobilizada em placas de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), semelhante a um anticorpo de ligação, e também como uma sonda conjugada à biotina, funcionando como um anticorpo secundário marcado.

As placas de ELISA foram revestidas com PLAH e incubadas com amostras contendo soluções-padrão de ácido hialurônico (000-500 mg/l), para servir como curva padrão da fluorescência, e com a solução amostra obtida a partir do PV, em triplicado.

Posteriormente, as placas de ELISA foram lavadas e a PLAH conjugada à biotina foi adicionada. Após novo processo de lavagem, adicionou-se estreptavidina marcada com európio. Após a liberação do európio da estreptavidina com o uso da solução de *enhancement*, a fluorescência final foi medida em um fluorímetro.

Os dados foram interpretados e analisados por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a idade média dos ratos de acordo com os grupos de comparação, seguido pelo desvio padrão de cada grupo. Pode-se notar a grande diferença de idade entre o grupo de ratas fêmeas idosas e jovens.

Tabela 1. Idade das ratas segundo os grupos.

	Ratas idosas	Ratas jovens
N	5	8
Idade média (dias)	722,2	135,5
Desvio padrão	28,1	35,0

O grupo de jovens tem idade média de 135,5 dias e é formado por adultos sexualmente maduros. Por outro lado, o grupo de ratas idosas possui média de idade de quase dois anos.

A Tabela 2 mostra a concentração de AH de cada amostra de acordo com os grupos.

Tabela 2. Concentração de AH, em ng/mg de peso seco, em pregas vocais de ratos de acordo com os grupos.

	Ratas idosas	Ratas jovens
	AH	AH
1	527,2	670,5
2	762,0	801,0
3	755,4	1039,4
4	394,1	1474,7
5	469,7	1577,5
6	-	1792,0
7	-	1806,7
8	-	1043,4
Média	581,67	1275,64
Desvio padrão	168,39	444,11

AH – ácido hialurônico.

Para comparar os grupos, foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney (Tabela 3). Podemos, então, observar uma diferença significativa na concentração de AH entre os grupos de ratas idosas e jovens. As ratas idosas têm menor concentração de AH na PV.

Tabela 3. Teste de Mann-Whitney aplicado na comparação dos grupos.

Teste Mann-Whitney (<i>p</i> value)	
Fêmea idosa x Fêmea jovem	0,006

DISCUSSÃO

Um dos primeiros estudos para detectar GAGs na LP utilizou imunohistoquímica para identificar o receptor de AH, uma vez que os anticorpos não são capazes de se ligar diretamente ao AH².

Outros autores¹¹ estudaram o ácido hialurônico com a coloração de Ferro Coloidal de Muller-Mowry, que identifica mucopolissacarídeos ácidos e, portanto, cora vários tipos de GAGs. A quantificação ocorreu por comparação colorimétrica de lâminas antes e após o tratamento com hialuronidase testicular, que digere ácido hialurônico, mas também digere o GAG sulfato de condroitina. Usando uma amostra de 10 homens e oito mulheres e com um método inespecífico de identificação e quantificação de AH, este estudo foi o primeiro a fazer comparações com relação ao gênero, mostrando maior concentração de AH em homens.

Também usando coloração de Ferro Coloidal de Muller-Mowry, outros autores¹² observaram a presença de AH na LP de PV humanas e fizeram comparações entre sexo e idade. Eles utilizaram nove laringes masculinas adultas (de 34 a 52 anos), sete laringes femininas adultas (de 21 a 41 anos), quatro laringes masculinas idosas (de 65 a 77 anos) e cinco laringes femininas idosas (de 65 a 82 anos). Os autores concluíram que, em relação ao gênero, as mulheres tinham menos AH na camada superficial da LP. Todavia, nas regiões mais profundas, a quantidade de AH ultrapassou a dos homens. Quanto à idade, a diferença colorimétrica não foi significativa.

Outro método de coloração tecidual inespecífico que cora simultaneamente vários tipos de GAGs é o Alcian Blue. Alguns autores têm utilizado este método de coloração, sem digestão por hialuronidase, para a identificação de mudanças do AH na LP relacionadas à idade¹⁴. Esses autores utilizaram oito ratos jovens e oito ratos idosos e encontraram valores mais baixos no grupo de idosos.

Diferentemente dos estudos anteriores, nosso estudo utilizou um método de quantificação específico para o AH, o qual fornece sua concentração em nanogramas por miligrama de peso seco¹³.

Outros autores também utilizaram esse mesmo método de fluorescência para a quantificação de AH na prega vocal humana¹⁵. No entanto, eles não estudaram possíveis diferenças na concentração de AH em relação à idade.

Nosso estudo utilizou pregas vocais de ratos e, devido ao pequeno tamanho da PV do rato e pela impossibilidade de separar a lâmina própria da musculatura subjacente, toda a profundidade da prega vocal foi quantificada. Portanto, nossos resultados refletem a concentração de AH na lâmina própria e no músculo tireoaritenóideo juntos.

A maioria dos estudos que usam PV humana como material remove a laringe várias horas após a morte, mas, em nosso estudo, o tempo médio decorrido entre a morte e a fixação do tecido foi de 2 minutos. Considerando que os GAGs são substâncias que se degradam rapidamente, a rápida fixação das PV contribuiu para aumentar a exatidão dos nossos resultados.

A manipulação da via aérea antes da morte e o tempo decorrido entre a morte e a fixação da prega vocal são fatores que têm um alto potencial para causar viés. A possibilidade de evitar esses erros reforça as vantagens já descritas do uso de camundongos como modelo animal para estudar as pregas vocais¹⁶. Além disso, a capacidade de comparar linhagens genéticas controladas com menor variabilidade entre os indivíduos faz com que os grupos de comparação sejam mais homogêneos e os resultados mais confiáveis.

Ratos idosos são muito difíceis de se obter, devido à sua alta mortalidade. Alguns autores têm demonstrado que a espécie de ratos Wistar possui longevidade máxima de 34 meses e atinge a sua senescência por volta de 24 meses de idade, momento em que a taxa de mortalidade é de 50%^{17,18}. Essa dificuldade na obtenção de amostras de ratos idosos foi a razão por não termos ratos machos em nosso estudo.

Sabe-se que o conhecimento profundo da LP da prega vocal requer uma compreensão das diferentes funções de cada uma das substâncias

envolvidas no mecanismo de vibração da PV. Assim, o ácido hialurônico, como um dos principais componentes da matriz extracelular, é de fundamental importância para a flacidez da onda mucosa da prega vocal e para uma ótima qualidade vocal.

Por isso, acreditamos que este estudo possa contribuir com informações importantes. Com um método preciso, que nos fornece a concentração tecidual de AH em relação ao peso seco, nosso estudo demonstrou que o envelhecimento reduz a quantidade de AH na PV de ratas.

CONCLUSÃO

Os resultados nos permitem concluir que a prega vocal de ratas fêmeas idosas possui menor concentração de ácido hialurônico que a concentração da prega vocal de ratas fêmeas jovens.

REFERÊNCIAS

1. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otologia (Fukuoka)*. 1975;21(suppl 1):299-303.
2. Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105(1):6-11.
3. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999;109(6):845-54.
4. Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;124(6):607-14.
5. Honjo I, Isshiki N. Laryngoscopic and voice characteristics of aged persons. *Arch Otolaryngol*. 1980;106(3):149-50.
6. Mueller PB, Sweeney RJ, Baribeau LJ. Acoustic and morphologic study of the senescent voice. *Ear Nose Throat J*. 1984;63(6):292-5.
7. Pontes P, Brasolotto A, Behlau M. Glottic characteristics and voice complaint in the elderly. *J Voice*. 2005;19(1):84-94.
8. Hirano M, Kurita S, Sakaguchi S. Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. *Acta Otolaryngol*. 1989;107(5-6):428-33.
9. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol*. 1996;116(5):778-82.
10. 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):735-41.
11. Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice*. 1997;11(1):59-66.
12. Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2001;111(5):907-11.

-
13. Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new non-competitive fluorescencebased assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem.* 2003;319(1):65-72.
 14. Abdelkafy WM, Smith JQ, Henriquez OA, Golub JS, Xu J, Rojas M, et al. Aged related changes in the murine larynx: initial validation of a mouse model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007;116(8):618-22.
 15. Lebl MDA, Martins JRM, Nader HB, Simões Mde J, De Biase N. Concentration and distribution of hyaluronic acid in human vocal folds. *Laryngoscope.* 2007;117(4):595-9.
 16. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histologic characterization of rat fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(3):183-92.
 17. Brownson RH. Perineuronal satellite cells in the motor cortex of aging brains. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1955;14(4):424-32.
 18. Burek JD, Hollander CF. Experimental gerontology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, eds. *The Laboratory Rat, Vol II, Research applications.* New York: Academic Press; 1980. p.149-59.