

**JOSÉ EDUARDO DE SÁ PEDROSO**

**ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO  
HIALURÔNICO NAS PREGAS VOCAIS DE  
RATAS, DURANTE O CICLO ESTRAL E O  
CICLO GRAVÍDICO-PUERPERAL**

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

**São Paulo**

**2006**

**JOSÉ EDUARDO DE SÁ PEDROSO**

**ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO  
HIALURÔNICO NAS PREGAS VOCAIS DE  
RATAS, DURANTE O CICLO ESTRAL E O  
CICLO GRAVÍDICO-PUERPERAL**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo-Escola Paulista de Medicina,  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências pelo programa de Pós-Graduação  
em Otorrinolaringologia e Cirurgia de  
Cabeça e Pescoço.**

**Orientador: Prof. Dr. Osíris Camponês do  
Brasil.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Manuel de Jesus  
Simões.**

**São Paulo**

**2006**

Pedroso, José Eduardo de Sá .

Análise da concentração do ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas durante, o ciclo estral e gravídico-puerperal/ José Eduardo de Sá Pedroso- São Paulo, 2006

xii, 58 f.

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

Título em inglês: Analysis of hyaluronic acid concentration in rat vocal folds during estral and gravidic puerperal cycles.

1. Cordas vocais 2. Laringe 3. Ácido hialurônico 4. Hormônios

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

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

**COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. PAULO AUGUSTO DE LIMA PONTES

## DEDICATÓRIA

À Andrea grande amor da minha vida, companheira  
compreensiva e paciente.

Ao Renato luz da minha vida, que me ajudou a  
compreender e dar valor ao que realmente importa.

Aos meus pais pelo exemplo, confiança, e sobretudo  
pelo amor que me dedicaram.

Aos meus irmãos, que não são poucos, pela solidariedade  
e muita torcida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. OSÍRIS CAMPONÊS DO BRASIL Professor Orientador do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP – EPM, exemplo de pessoa e profissional ético e moral, pela sua amizade, e muita paciência e bom humor.

Ao Dr. MANUEL DE JESUS SIMÕES Professor Livre Docente da Disciplina de Histologia da UNIFESP - EPM pela constante orientação nas descrições das lâminas no Laboratório de Histologia.

Ao Dr. PAULO AUGUSTO DE LIMA PONTES Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP – EPM, pela idéia do trabalho e seu exemplo de incansável capacidade profissional.

Ao Dr. MOACYR DOMINGOS NOVELLI, por proporcionar acesso ao Laboratório de Informática Ligado a Odontologia para mensurações eletrônicas das lâminas, por meio do programa Imagelab 2000.

À Dra. HELENA B. NADER Professora Titular do Departamento de Biologia molecular da UNIFESP-EPM, por me receber e permitir a utilização do laboratório da Biologia Molecular.

Ao Dr. JOÃO ROBERTO M. MARTINS pelas orientações no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos colegas Dr. LUCIANO RODRIGUES NEVES e Dra. PAULA LORENZON, pela ajuda nos acessos à USP, e nas correções nas idéias.

Ao Dr. ANTONIO PONTES pela impressionante facilidade no manuseio do computador, durante o dimensionamento e a preparação das imagens.

A ELSA YOKO KABAYASHI e ALINE MENDES pela ajuda no Laboratório da Biologia Molecular, auxiliando-me na bancada e no aprendizado de uma área nova para mim.

A Dra. GUI MI CO Diretora do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia – CEDEME, por permitir a utilização dos animais e do biotério, bem como pela ajuda na determinação das ratas a serem utilizadas na pesquisa.

Às Sras. MARIA JOSÉ e ADALVA secretárias, da Pós-Graduação, pela paciência ao esclarecer sobre o preenchimento dos formulários, bem como pelos avisos das minhas obrigações.

A Profa. MAIZA COSTA NEIVA, pela correção dos erros de português.

Ao biólogo PAULO CELSO FRANCO, pela preparação das lâminas e pelos cuidados nas técnicas de histologia.

Ao técnico EMANUEL PEREIRA CABRAL pelo tratamento dos animais e pela ajuda no manuseio dos mesmos.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4. MÉTODO.....	17
5. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS.....	46
8. ANEXOS.....	51
9. ABSTRACT.....	56
10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	58



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Unidade dissacarídica básica dos glicosaminoglicanos.....	8
<b>Figura 2.</b> Ácido Hialurônico: Estrutura molecular.....	8
<b>Figura 3.</b> Contenção da rata.....	19
<b>Figura 4.</b> Realização do esfregaço.....	19
<b>Figura 5.</b> Esfregaço das fases do ciclo estral: A-estro; B-diestro; C-metaestro; D- proestro. Células (setas) c-celula cornificada; e-celula epitelial; l-leucócito.....	20
<b>Figura 6.</b> Incisão cérvico torácica.....	22
<b>Figura 7.</b> Dissecção da traquéia.....	22
<b>Figura 8.</b> Detalhe da laringe da rata.....	23
<b>Figura 9.</b> Detalhe da incisão posterior na laringe.....	24
<b>Figura 10.</b> Incisão para a ressecção da prega vocal. A seta mostra a cartilagem aritenóidea.....	24
<b>Figura 11.</b> Esquema do preparo da amostra para estudo bioquímico.....	27
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do ensaio fluorimétrico do ácido hialurônico..	27
<b>Figura 13.</b> Tela de trabalho do software Imagelab 2000.....	29
<b>Figura 14.</b> Corte da prega vocal de rata corada com HE no puerpério. Onde E é o epitélio, LP-lâmina própria e M- músculo.....	35
<b>Figura 15.</b> Corte da prega vocal da fase proestro do ciclo estral corada com azul de alcian. E-epitélio, C-cartilagem, LP-lâmina própria e M- músculo.....	36

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados sobre a amostra no ciclo estral: peso, quantidade do ácido hialurônico e concentração do ácido hialurônico. Subgrupos: E-estro, D-diestro, M-metaestro, P-proestro.....32
- Tabela 2.** Dados sobre a amostra no ciclo gravídico-puerperal: peso, quantidade do ácido hialurônico e concentração do ácido hialurônico. Subgrupos: 7°- sétimo dia, 14° décimo quarto dia, 21- vigésimo primeiro dia, P- décimo quarto dia de puerpério.....33
- Tabela 3.** Comparativo entre subgrupos no grupo estral, segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.....34
- Tabela 4.** Comparativo entre subgrupos no grupo Gravídico-puerperal no 7°, 14°, 21° e 14° dia de puerpério (P) segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.....34
- Tabela 5.** Comparativo total entre subgrupos no grupo Estral (E, D, M e P) e subgrupos no grupo Prenhez (7, 14, 21 e P) segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.....35
- Tabela 6.** Os resultados apresentados pela análise quantitativa das concentrações de GAGs, no corte com coloração azul de alcian, e corte tratado com hialuronidase específica para o AH.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AH	Ácido hialurônico
BSA	Albumina Sérica Bovina
DAB	Diaminobenzidina
GAG(s)	.Glicosaminoglicano(s)
HE	Hematoxilina-Eosina
LP	Lâmina Própria
PBS	Solução salina tamponada com fosfato/ Phosphate buffered saline
PV	Prega vocal
PPVV	Pregas vocais

## RESUMO

Os hormônios exercem importante influência sobre a laringe. Variações da voz são comuns na prática clínica, e podem refletir alterações nas pregas vocais ao nível macroscópico e ultraestrutural. A prega vocal contém, entre outras substâncias, o ácido hialurônico, sendo este responsável, em grande parte, pelas suas propriedades viscoelásticas. A concentração do ácido hialurônico nos tecidos pode variar com a ação dos hormônios. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho é analisar comparativamente a concentração do ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas durante o ciclo estral e ciclo gravídico-puerperal. **MÉTODO:** Foram utilizadas 40 ratas adultas, divididas em dois grupos, ciclo estral e gravídico-puerperal. No primeiro grupo utilizamos 20 ratas para determinação da concentração do ácido hialurônico no ciclo estral; no segundo grupo, também de 20 animais, foi realizado o mesmo experimento no ciclo gravídico-puerperal. Os dois grupos foram divididos em subgrupos de acordo com a fase do ciclo em que se encontravam, e com o tempo de prenhez do animal. Nos subgrupos de cinco animais, quatro foram utilizados para o estudo da concentração do AH e um para os procedimentos histológicos. O método utilizado foi desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo-Escola Paulista de Medicina e trata-se de um método fluorimétrico para a determinação do AH em fluidos biológicos, utilizando sondas de ligação do AH. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina, e azul de alcian com e sem tratamento com hialuronidase. **RESULTADOS:** No grupo do ciclo estral não se observou variação da concentração do ácido hialurônico. No grupo do ciclo gravídico-puerperal houve aumento da concentração do ácido hialurônico no subgrupo do puerpério. Na comparação entre os dois grupos do ciclo estral e gravídico-puerperal não houve

diferença. Quando comparamos todos os subgrupos há diferença no grupo do puerpério.

**CONCLUSÕES:** Comparando-se todos os subgrupos do ciclo estral e ciclo gravídico-puerperal, só no puerpério houve aumento da concentração do ácido hialurônico.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os hormônios exercem importante influência sobre a laringe. A voz humana é sensível às variações hormonais e sua alteração pode constituir o primeiro sintoma de diversas doenças hormonais.

As modificações laríngeas não se limitam apenas aos períodos da puberdade, andropausa e menopausa elas ocorrem durante toda a vida do indivíduo. Os mais óbvios e profundos efeitos hormonais são fisiológicos e ocorrem na época da puberdade, quando alterações nas dimensões laríngeas provocam abaixamento do tom da voz masculina em aproximadamente uma oitava e feminina em algumas notas ( De Biase & Silva, 2000). As mudanças vocais na mulher, associadas aos hormônios sexuais, são muito comuns na prática clínica e têm sido investigadas em alguns períodos, como: pré-menstrual, gravidez, e menopausa.

Segundo Greene & Dalton (1953), no período pré-menstrual, quando os níveis de estrógeno e progesterona estão mais baixos, ocorre um leve espessamento das pregas vocais (PPVV). Os autores relatam que algumas cantoras de ópera evitam obrigações com o canto, alguns dias antes e após a menstruação.

O impacto hormonal se dá não somente sobre o trato genital, mas também sobre as mucosas, os músculos, os tecidos ósseos, a laringe e o córtex cerebral (Abitbol et al, 1999). Este autor, em estudo com 97 mulheres, profissionais da voz, apresentando disfonia pré-menstrual, referiu-se à ação da progesterona e do estrogênio sobre os músculos e a mucosa do complexo vocal e seus efeitos vascular, secretor, energético, bem como sobre a hidratação. Segundo o autor, um terço das mulheres sofre com a síndrome pré-menstrual, caracterizada por fadiga vocal, diminuição de alcance vocal, com perda de tons agudos, aspereza e perda da expressão vocal, além de edema e congestão das pregas vocais.

A atividade da progesterona e do estrógeno no período pré-menstrual causa vasodilatação, aumentando o volume de sangue e resultando em edema da prega vocal (PV) ( Sataloff et al, 1997). Este autor menciona que, embora médicos estejam mais impressionados com as mudanças da voz no período pré-menstrual do que com aquelas ocorridas no meio do ciclo, essas alterações podem ser mais pronunciadas no período da ovulação.

Figueiredo et al (2004) concluíram, durante a avaliação perceptivo-auditiva nos períodos menstrual e de ovulação, que a maioria dos parâmetros utilizados para detectar modificação na voz mostrou alterações significativas. As mulheres, entretanto, não apresentaram conscientização sobre a mudança de suas vozes, confirmando as conclusões do trabalho de Vasconcelos et al (2001).

Semple & McComb (2000), estudando macacos da região de Gibraltar, observaram que, através de pequenas alterações na voz das fêmeas, os machos conseguiam distinguir o status reprodutivo das mesmas. Collins & Missing (2003) observaram que os homens se sentem atraídos não só pelo aspecto visual das mulheres, como também pela sua voz, de acordo com as fases do ciclo menstrual.

Como já mencionado, os hormônios atuam de maneira mais acentuada dependendo do período do ciclo hormonal em que a mulher se encontra. A gravidez é também uma fase em que observamos muitas mudanças anatômicas e clínicas.

A laringopatia gravídica é uma condição comum, sendo causada por alterações fisiológicas, anatômicas e psicológicas, conseqüentes às alterações endócrinas. São semelhantes às alterações pré-menstruais. A elevação dos níveis de progesterona circulante aumenta a fragilidade vascular, levando à hemorragia submucosa e predispondo à retenção hídrica. A disfunção vocal é caracterizada pela diminuição da eficiência vocal, perda das notas altas e fadiga vocal com leve disфонia.



Newman et al (2000) encontraram receptores para estrógeno, progesterona e andrógeno, no epitélio, citoplasma e núcleo de células de PPVV humanas, assim como nos fibroblastos da lâmina própria. A quantidade destes receptores varia de acordo com o sexo e a idade. Altman et al (2003) encontraram receptores para hormônio tireoidiano em PPVV humanas.

As variações que observamos nas pregas vocais macroscopicamente devido a estes hormônios refletem alterações que acontecem ao nível microscópico e ultraestrutural. Com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, podemos detectar e analisar as substâncias que participam deste fenômeno.

Alguns autores têm estudado a quantificação destas substâncias nas PPVV humanas. Pawlak et al (1996) estudaram os glicosaminoglicanos (GAGs) e os proteoglicanos, na lâmina própria das pregas vocais de 14 cadáveres. Foi detectado o ácido hialurônico (AH) no citoplasma de células presentes na lâmina própria, que na imunohistoquímica mostraram ter características de fibroblastos. Hammond et al (1997) avaliaram 18 PPVV humanas normais, sendo dez homens e oito mulheres, com idades entre 20 e 60 anos. Foram realizados dois cortes histológicos. Um deles foi tratado com hialuronidase testicular, e o outro não. Com a análise computadorizada das imagens foi possível observar que as PPVV dos homens têm maior quantidade absoluta de AH na lâmina própria, podendo haver variações individuais que fogem a esta regra. Este fato explicaria, segundo os autores, por que as mulheres têm maior propensão a ter nódulo vocal, pois com uma quantidade menor de AH não teriam tanta proteção aos traumas quanto os homens. Butler et al (2001) desenvolveram um estudo avaliando a distribuição do AH ao longo de toda a espessura da lâmina própria e verificando variações quanto ao sexo e idade. Os resultados obtidos representam a proporção relativa do AH em quatro regiões diferentes da lâmina própria. Observaram que

mulheres apresentam relativamente menos AH na camada mais superficial da LP, mas possuem mais AH nas camadas mais profundas, com grande variação entre indivíduos nos resultados. Não houve diferenças estatisticamente significantes de acordo com os grupos etários. Lebl (2004) estudou 32 PPVV humanas obtidas de necropsias de 16 cadáveres, sendo oito homens e oito mulheres sem lesão laríngea, com idade variando entre 38 e 68 anos. As PPVV foram decorticadas e divididas em regiões anterior, média e posterior da borda livre (denominada região superior) e regiões anterior, média e posterior da face subglótica (denominada região inferior). O método utilizado para a determinação do AH em fluidos biológicos foi desenvolvido pela Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Concluiu-se que homens e mulheres diferem, em todas as regiões, quanto à concentração média de AH. As mulheres apresentam média maior que os homens em todas as regiões e a concentração total é o dobro da dos homens.

A vibração das pregas vocais depende, entre outras coisas, do tamanho e da composição da lâmina própria (LM). Entre as substâncias que compõem a matriz extracelular (MEC) desta região, estão os GAGs e proteínas fibrosas (Hirano, 1981). Pequenas alterações quantitativas nas macromoléculas que formam a MEC são capazes de determinar impactos negativos acentuados nas propriedades biomecânicas das PPVV. O AH é um GAG e um dos principais componentes da LP. Sua influência nas propriedades biomecânicas das PPVV foi demonstrada por Gray et al (1999) e Chan et al (2001).

Foram realizados diversos trabalhos onde foi estudada a cicatrização das PPVV em modelo animal, após dano causado artificialmente. Entre substâncias analisadas, a que despertou maior interesse foi o AH, pois ficou patente sua importância na cicatrização das PPVV (Thibeault et al, 2002; Rousseau et al, 2003; Rousseau et al,

2004; Thibeault et al, 2004). Seguindo a mesma linha de raciocínio, alguns autores estudaram a possibilidade de se fazer a correção da insuficiência glótica e de cicatrizes das PPVV utilizando o AH, em modelo animal e em humanos (Hallen et al 1998; Chan et al 1999; Hertergard et al, 2002; Hertergard et al, 2003; Perazzo, 2005).

Tateya et al (2005) afirmaram em seu experimento, utilizando como modelo animal o rato, que sua LP é mais parecida com a do homem, sendo este animal mais indicado para se fazer estudos das PPVV.

O ácido hialurônico (AH) foi citado pela primeira vez na literatura médica por Meyer & Palmer em 1934. Eles isolaram um polissacarídeo ácido com alto peso molecular do humor vítreo de boi, que não era sulfatado. Propuseram que seu nome fosse ácido hialurônico, de “hialóide” (vítreo), mais ácido urônico. O AH é um GAG.

Os GAGs são açúcares de cadeias longas, não ramificadas e compostas de unidades dissacarídicas repetitivas (Figura-1). Tais compostos ocorrem em todas as espécies de animais que possuem organização tecidual, desde esponjas até mamíferos (Lindholm, 1997). Com exceção do queratan sulfato, as unidades dissacarídicas dos GAGs são formadas por um monossacarídeo aminado (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) que, na maioria das vezes, é sulfatado por um ácido urônico (glicurônico e idurônico). A presença de grupamentos carboxílicos no resíduo do ácido urônico e de uma variável quantidade de grupos sulfato por dissacarídeo faz com que os GAGs apresentem uma alta quantidade de cargas negativas.

O ácido hialurônico (AH) apresenta três características fundamentais que os distinguem dos demais GAGs: ele não se associa covalentemente a uma proteína central, não é sulfatado e sua síntese ocorre por um complexo que se localiza na membrana plasmática.

A unidade dissacarídica repetitiva do AH é um ácido glicurônico e uma N-acetilglicosamina (figura-2). A cadeia do AH é flexível e extremamente longa, chegando a 3000 unidades dissacarídicas. A presença de grupos carboxila, associadas à extensão e flexibilidade das cadeias, fazem com que o AH forme soluções extremamente viscosas, fundamentais à estruturação de alguns tecidos, como o humor vítreo e o cordão umbilical, e fundamentais na migração celular, como ocorre durante o desenvolvimento e cicatrização. O AH auxilia também muitas funções celulares, como o controle da morfogênese e diferenciação, locomoção celular, reparo tecidual e resposta inflamatória. Tem sido atribuído ao AH papel no processo mitótico e no crescimento de tumores.

A síntese do AH ocorre primariamente nos fibroblastos e é realizada pela enzima hialuron sintetase, localizada na parede interna da membrana da célula, sendo esta enzima também responsável pelo seu transporte para fora desta. Existem três tipos de enzimas para a síntese: “hyaluron syntetase 1” (HAS-1), “hyaluron syntetase 2” (HAS-2) e a “hyaluron syntetase 3” (HAS-3) . Cada uma realiza a síntese de cadeias com pesos moleculares diferentes.

Os principais receptores do AH na superfície da célula são o “Cluster of differentiation-44” (CD44) e o “Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility” (RHAMM), e ambos participam da regulação dos fatores de crescimento celular. A alta concentração de AH e altos níveis de CD44 têm sido encontrados com uma grande relação com a gênese de tumores, levando o CD44 a ser considerado marcador tumoral para tumores urológicos e de mama, principalmente ( Lida e Bourguignon, 1997).

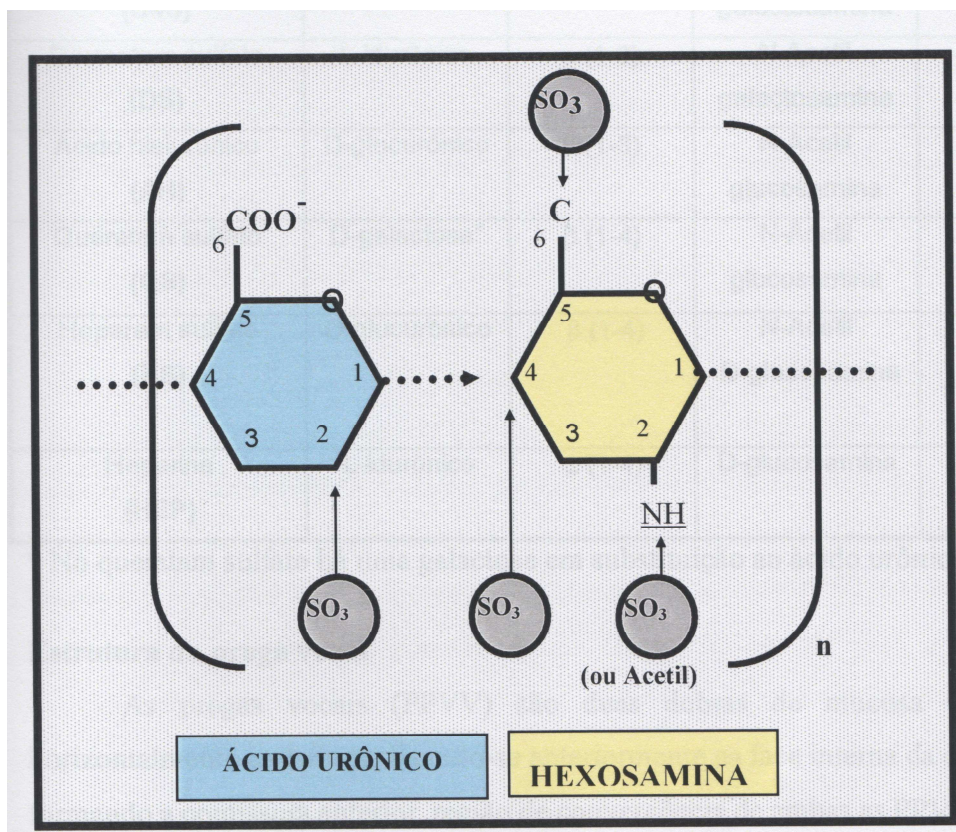


Figura 11-Unidade dissacarídica básica dos glicosaminoglicanos.

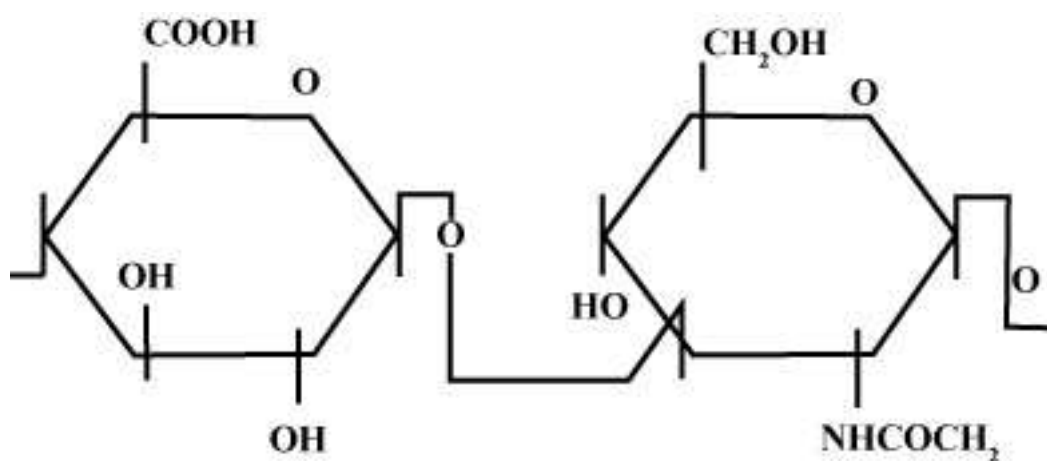


Figura 12. Ácido Hialurônico: Estrutura molecular

Segundo Santos & Ferrazoli (2005) os períodos reprodutivos podem ser classificados como ciclos estrais contínuos ou estacionais. O ciclo estral é o período decorrente entre sucessivas fases de receptividade sexual, geralmente chamada de cio ou

estro. Os ciclos podem ser monoestrais (uma vez por ano) ou poliestrais (duas ou mais vezes por ano). A duração dos ciclos estrais contínuos é específica da espécie: na rata, por exemplo, é de quatro a cinco dias; na cobaia e na ovelha, é de 16 dias no máximo; e na vaca e na porca, é de no máximo 21 dias. A ovulação se deve ao bloqueio de estímulos atuantes sobre o hipotálamo, gerando liberação de FRH e LRH, que produzem secreção de gonadotrofinas hipofisárias. Embora mais difícil de ser explicada, a atividade sexual rítmica espontânea da fêmea foi cuidadosamente estudada na rata.

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases gerais: 1) fase folicular, correspondente ao período de crescimento e maturação dos folículos, caracterizada por secreção estrogênica gradualmente acelerada e alteração da mucosa uterina e vaginal; 2) fase lútea, iniciada pela ovulação do folículo e sua subsequente transformação em corpo amarelo.

A duração da fase lútea depende do corpo amarelo se tornar funcional ou não, no primeiro caso secretando progesterona, com seu conseqüente efeito sobre a mucosa uterina vaginal. As fases da função ovariana foram divididas em estágios, que são correlacionados com a citologia da vagina. Na rata, o esfregaço da parede vaginal revela um padrão mutável de células e muco. No começo do estro, o esfregaço é composto quase exclusivamente de células epiteliais cornificadas. No fim do estro, aparece muito muco enquanto que as células cornificadas ainda são bastante visíveis. Doze horas mais tarde, no metaestro, o esfregaço apresenta células cornificadas, muitos leucócitos e quase nenhum muco. Na rata, o ciclo se sucede rapidamente: os corpos amarelos não são secretores e o metaestro é curto, a não ser que se instale um processo de gravidez ou pseudogravidez. Em animais cujos corpos amarelos são secretores, o metaestro é prolongado. O diestro é associado a um esfregaço vaginal que contém quase apenas leucócitos e ocasionalmente células ovais com grandes núcleos, células epiteliais

nucleadas. Um dia depois, o esfregaço se caracteriza por células epiteliais nucleadas apenas - o animal está então no proestro. Diestro, proestro e estro ocorrem na fase folicular da função ovariana, enquanto que o metaestro ocorre na fase lútea. O conhecimento da relação entre a citologia vaginal e a função ovariana propiciou a fisiologistas e bioquímicos um poderoso instrumento experimental.

Em primatas, o ciclo reprodutivo é o ciclo menstrual, que vai do primeiro dia de sangramento até a véspera do início do próximo período de sangramento. Em macacas Rhesus e mulheres, a duração dos ciclos apresenta cerca de 28 dias. A ovulação é espontânea, ocorrendo por volta da metade do ciclo (entre o 11º e o 14º dia). Os primatas são sexualmente receptivos ao longo de todo o ciclo; portanto, não apresentam o estágio de estro durante o ciclo menstrual. O ciclo menstrual pode ser também dividido em fase folicular e lútea. Durante a fase folicular, o endométrio uterino torna-se mais espesso. Na fase lútea, caracteristicamente, as artérias em espiral se apresentam mais tortuosas, e as glândulas do endométrio exibem maior atividade secretora. A menstruação ocorre quando o corpo amarelo cessa a secreção de progesterona. O sangramento das artérias espirais e a queda do endométrio persistem durante três a cinco dias, seguindo-se novo crescimento do endométrio.

Os diversos estudos clínicos demonstram que, de alguma maneira, os hormônios provocam alterações nas pregas vocais, as quais acabam repercutindo na voz, provavelmente alterando as substâncias que as compõem. Foi demonstrado que o ácido hialurônico é um dos principais componentes das PPVV. Será que a concentração do mesmo não pode variar nos tecidos de acordo com estímulos hormonais?

## **2. OBJETIVO**



O objetivo deste trabalho é analisar comparativamente a concentração do ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas, durante o ciclo estral e o ciclo gravídico-puerperal.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

Likar & Likar (1964) realizaram estudo determinando a localização e quantificação dos mucopolissacarídeos ácidos nas células da mama e parede uterina de bovinos, de acordo com as fases do ciclo estral (estro, diestro, metaestro, proestro). O estudo histoquímico para a localização de mucopolissacarídeos ácidos revelou uma série de variações de coloração, de acordo com a fase do ciclo e da camada da parede uterina estudada. Foi descoberta uma correlação entre quantidade de mucopolissacarídeos ácidos e a fração de AH. Descobriu-se, também, que as células da mama e a quantidade de hialuronato variavam em quantidade, de acordo com a fase do ciclo. O AH que estava alto durante o estro, diminuía no diestro até o metaestro e, a seguir, tornava a aumentar. O autor ainda faz uma discussão sobre os diversos métodos para a determinação dos mucopolissacarídeos ácidos.

Kofoed et al (1972) afirmaram que o estrógeno e a progesterona induzem a mudanças no conteúdo dos GAGs nos órgãos dos animais. Em seu estudo eles isolaram e caracterizaram os GAGs em útero e glândula salivar de ratas. Os animais foram divididos em quatro grupos: animais castrados, não castrados, castrados com uma dose de benzoato de estradiol (1 $\mu$ g) e, finalmente, castrados com uma dose maior (10 $\mu$ g) de benzoato de estradiol. A concentração de ácido urônico aumentava com a castração e diminuía com a injeção de benzoato de estradiol, mas a quantidade total do AH no útero dos animais castrados era menor que nos animais que recebiam o estrógeno. Não houve mudança da concentração do ácido urônico nas glândulas salivares.

Cabrol et al (1985) estudaram a distribuição dos GAGs no colo, no istmo e no corpo do útero de mulheres grávidas e não grávidas. Os GAGs foram medidos no cérvix uterino de mulheres grávidas (n=9) e não grávidas (n=14), no istmo de grávidas (n=8) e não grávidas (n=6), e no corpo uterino de grávidas (n=12) e não grávidas (n=5).

Referiram a presença do AH e dermatam sulfato em todas as regiões estudadas, sendo maior a concentração ao final da gestação.

Pontes et al (1989), realizaram estudo histológico e histoquímico da mucosa nasal de 16 ratas no ciclo estral e 24 ratas no ciclo gravídico-puerperal. No ciclo estral, os animais foram divididos em quatro grupos iguais, de acordo com a fase do ciclo - estro, diestro, metaestro e proestro. No grupo da gravidez, os animais foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dia, sendo cada grupo com quatro animais. No grupo do puerpério, os animais foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dia, tendo cada grupo quatro animais. O estudo histológico foi realizado com a coloração do Hematoxilina-Eosina e com azul de alcian, com e sem a hialuronidase testicular, e com outras colorações. Concluiu-se que a mucosa nasal sofre modificações importantes no ciclo estral, na prenhez e no puerpério. No ciclo estral foi encontrada, no cório de toda a mucosa nasal, uma mucopolissacáride ácida não sulfatada, provavelmente representada pelo ácido hialurônico, que não varia durante o ciclo estral, mas que desaparece ou diminui durante a prenhez, reaparecendo no puerpério.

Rajabi et al (1992) estudaram a concentração do AH no soro de fêmeas de porcas da Guinéa, sendo 13 prenhas, cinco não prenhas e quatro após a gestação. Como método, realizou um ensaio radiométrico, onde utilizou uma proteína ligada ao AH e marcada com iodo-125. Concluiu que a concentração do AH aumentava progressivamente até o parto e, dois dias após, voltava aos níveis anteriores a ele.

Laurent et al (1995) estudaram o AH em diversos tecidos do aparelho urogenital de ratos. Utilizaram seis animais, sendo dois machos e quatro fêmeas, duas das quais prenhas. Foi realizado estudo semiquantitativo com imunohistoquímica e ensaio radiométrico para ácido hialurônico. Observou-se que o AH se acumula predominantemente no tecido conectivo ao redor da fibra do músculo liso, na região

subepitelial da lâmina própria, e tecido conectivo perineural e perivascular. Nas fêmeas foi encontrada maior quantidade na vagina e na bexiga, sendo que o órgão que apresentou maior volume de AH foi a vagina das prenhas.

Kobayashi et al (1999) estudaram a quantidade de AH em 388 amostras de soro sanguíneo de mulheres, sendo 250 durante a gravidez, com idades variando de 20 a 37 anos, e 70 que não estavam grávidas, com idade entre 25 e 41 anos. Nenhuma paciente fez uso de medicação durante a gravidez. Foram divididas em seis grupos: o primeiro grupo foi o das 70 mulheres que não estavam grávidas o segundo grupo era composto de 47 mulheres que colheram soro entre a 5<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semana de gravidez; no terceiro grupo havia 46 mulheres entre a 1 e a 26<sup>a</sup> semana; no quarto grupo, estavam 58 mulheres entre a 27<sup>a</sup> e a 37<sup>a</sup> semana de gravidez; no quinto grupo encontravam-se 99 mulheres entre a 38<sup>a</sup> e a 40<sup>a</sup> semana, sem estar em trabalho de parto; e, finalmente, o sexto grupo foi de 68 mulheres já em trabalho de parto, entre a 38<sup>a</sup> e a 40<sup>a</sup> semana. Observou-se que a concentração do AH aumenta progressivamente no soro durante a gravidez e, de maneira mais intensa, ao seu termo.

Cubas (2001) analisou dos GAGs no colo uterino de ratas no ciclo estral. Foram utilizadas 40 ratas e divididas em grupos de acordo com a fase do ciclo estral em que se encontravam. Os animais foram sacrificados, tendo sido retirados os colos uterinos para estudo morfológico, histoquímico e imunohistoquímico. O autor detectou relação entre o perfil dos GAGs, o pico de proliferação celular e a variação hormonal que ocorre durante o ciclo estral. Não houve variação significativa da concentração do AH durante o citado ciclo.

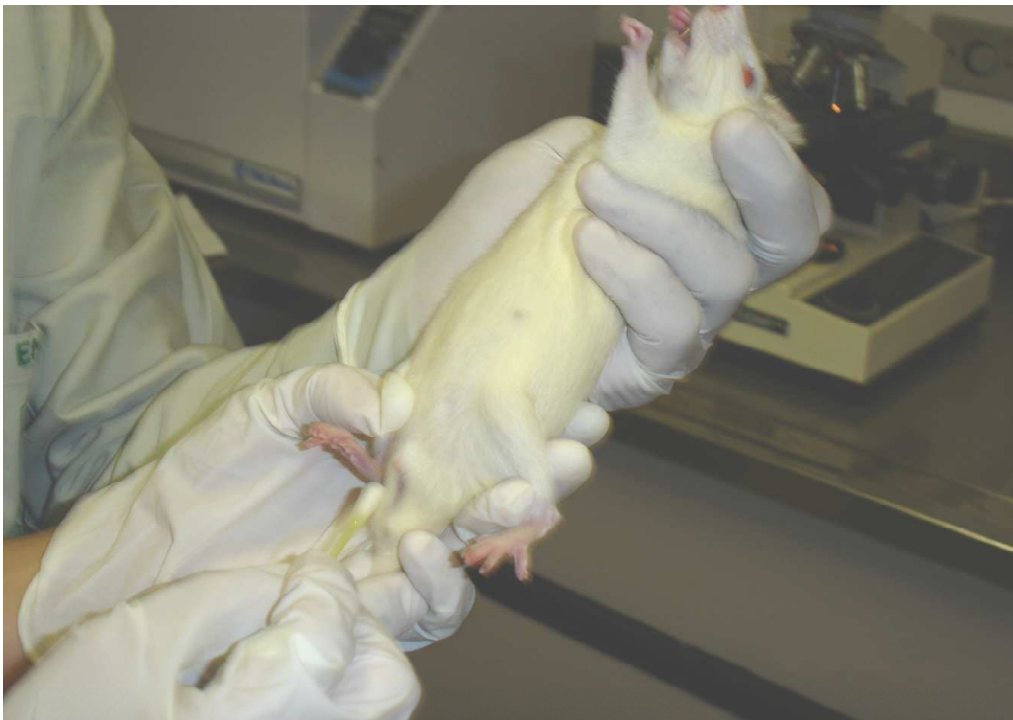
## **4. MÉTODO**

Depois de realizado o projeto da tese, este foi enviado para o comitê de ética, que aprovou o trabalho sob o número 1234/05.

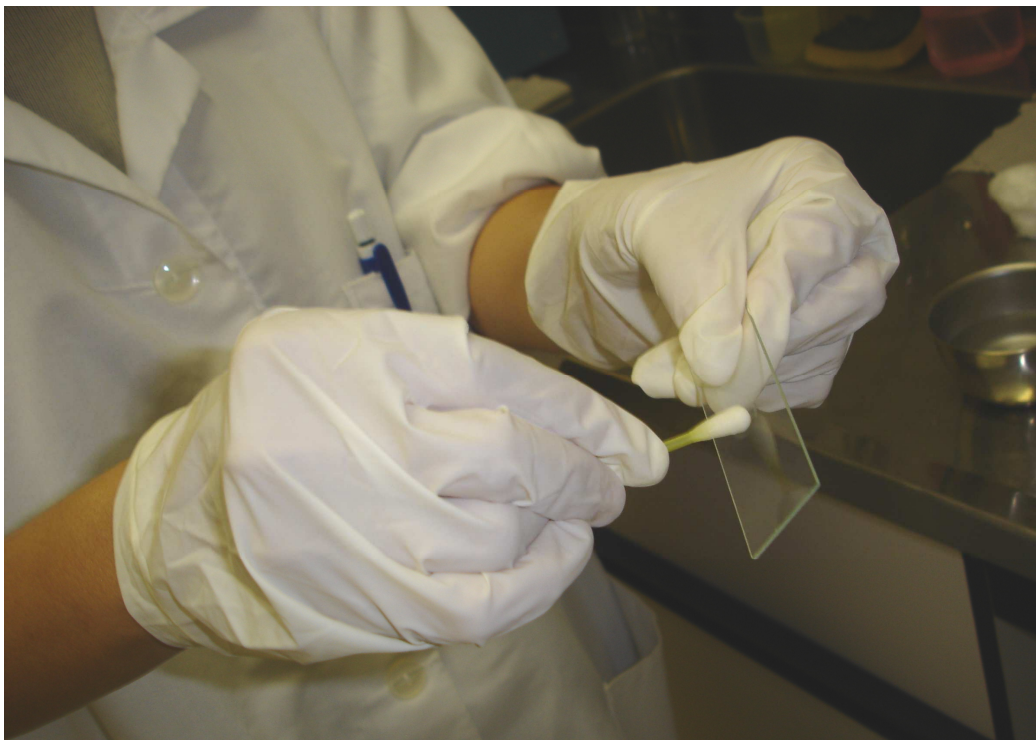
Foram utilizadas 40 ratas (sp-wistar) adultas, com cerca de 250 gramas. Os animais ficaram confinados em gaiolas plásticas com grade de metal e mantidos com alimentação e água *ad libitum*, com temperatura e luminosidade do ambiente controladas. Estes animais ficaram alojados no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia – CEDEME, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

No primeiro grupo, utilizamos 20 ratas para determinação da concentração do AH no ciclo estral. Estas ratas foram submetidas a exame colpocitológico para determinação da fase do ciclo em que se encontravam. O animal era contido por um técnico de laboratório, introduzindo-se na vagina uma haste com algodão embebido em solução fisiológica 0,9% (figura-3). A seguir, era feito um esfregaço em uma lâmina (figura-4), a qual era analisada imediatamente “a fresco”, no microscópio óptico com aumento de 40 vezes. As fases do ciclo estral foram determinadas de acordo com a quantificação das células: epiteliais, cornificadas e leucócitos no exame colpocitológico (Quadro 1). Quando havia dúvidas quanto a classificação da fase do ciclo estral o animal não era incluído no subgrupo

. Os animais foram divididos em quatro subgrupos -: P-proestro, M-Metaestro, E-Estro e D-diestro - e imediatamente sacrificados. Em cada subgrupo havia cinco animais.



**Figura 13. Contenção da rata para a colpocitologia.**



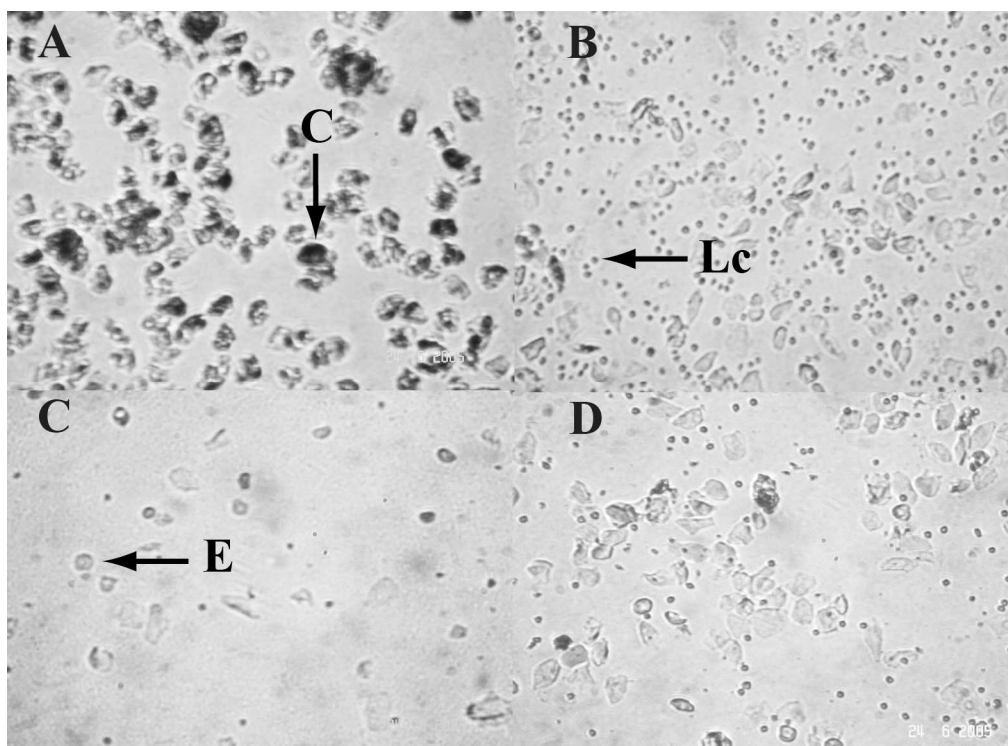
**Figura 14- Realização do esfregaço.**



**Quadro 1. Quadro de classificação do ciclo estral, segundo esfregaço vaginal (Short & Woodnott-1969)**

FASES	SECREÇÃO VAGINAL			
	Célula Epitelial	Célula Epitelial Cornificada	Leucócito	Muco
I. Pró-estro	+++	+	+/-	-
II. Estro ( inicial)	-	+++	-	-
III. Estro (tardio)	+/-	+++	+/-	-
IV. Metaestro	+	++	++	-
V. Diestro	+	-	+++	Pouco,elástico

= nenhum; +/- ocasional; + = pouco; ++ = moderado; +++ = muito



**Figura 15 - Esfregaço das fases do ciclo estral: A-estro; B-diestro; C- proestro; D- metaestro. Células (setas) c- célula cornificada; lc-leucócito; e-célula epitelial.**

No segundo grupo, também de 20 animais, foi realizado o mesmo experimento no ciclo gravídico-puerperal. Os animais foram divididos em subgrupos de cinco animais e sacrificados no 7º, 14º e 21º dia de prenhez e no 14º dia de puerpério. Os animais foram acasalados à noite e, na manhã seguinte foi realizados o diagnóstico de prenhez, com o encontro de espermatozóides na vagina das ratas (Hamilton & Wolfe, 1938), e quando foram sacrificadas foi realizado a laparotomia para a verificação da presença de fetos no útero .

Aos animais foram atribuídas letras seguidas de números em algarismos romanos, de acordo com os subgrupos em que se encontravam.

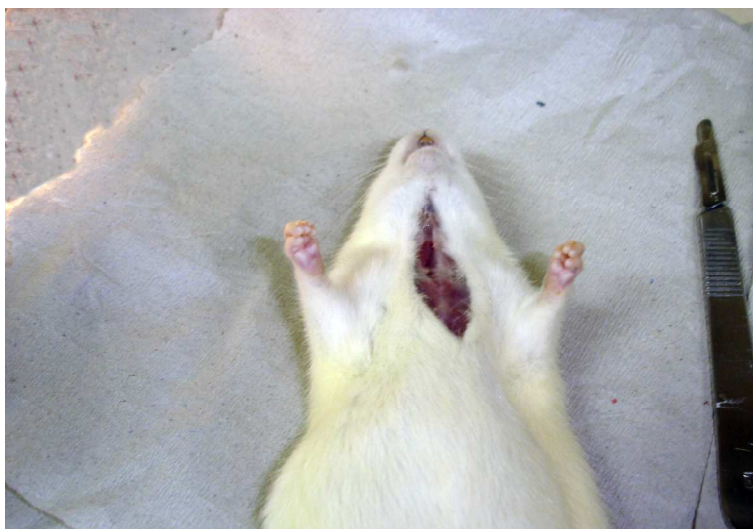
Em todos os subgrupos de cinco animais, quatro deles foram utilizados para o estudo da concentração do AH e um foi usado para os procedimentos histológicos. Como as PPVV eram pequenas tivemos que utilizar as duas para os procedimentos bioquímicos.

**Quadro 2. Divisão numérica dos grupos de animais e subgrupos, e sua utilização.**

<b>GRUPOS</b>	<b>Subgrupos</b>	Nº de animais para a bioquímica do AH.	Nº de animais para os procedimentos histológicos	total
CICLO ESTRAL	ESTRO.	4	1	5
	DIESTRO	4	1	5
	METAESTRO	4	1	5
	PROESTRO	4	1	5
CICLO GRAVÍDICO-PERPERAL	7º DIA DE PRENHEZ	4	1	5
	14º DIA DE PRENHEZ	4	1	5
	21º DIA DE PRENHEZ	4	1	5
	14º DIA DE PUERPÉRIO	4	1	5
total		32	8	40

Os animais foram sacrificados usando cloridrato de tiazina (rompun®) e ketamina, com injeção intraperitoneal, em dose letal.

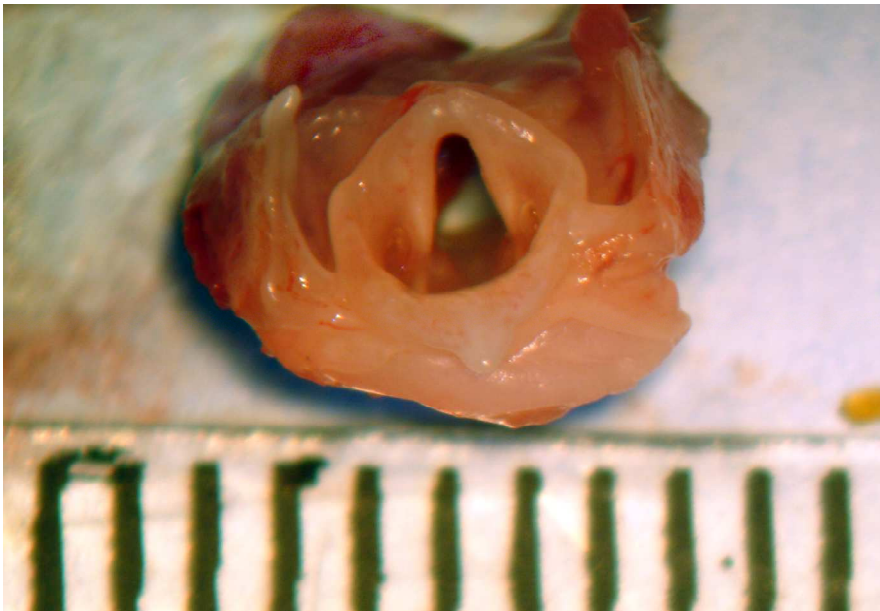
Após o sacrifício dos animais foi realizada a retirada de suas pregas vocais, com microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos) na sala de dissecação da disciplina de Otorrinolaringologia. Os aumentos utilizados no microscópio dependiam da fase da dissecação. O animal foi colocado em decúbito dorsal, e não foi necessário tricotomia. A incisão foi realizada com bisturi lâmina 15 no plano sagital mediano, na altura do osso hióide até o início da região abdominal (figura-6). Após, foi dissecada a musculatura pré-tiróidea, individualizada a traquéia e separada do esôfago (Figura-7). Em seguida dissecamos a região da cartilagem tireóidea. Retiramos a peça, com limite inferior na altura do segundo ou terceiro anel traqueal e superior na altura do osso hióideo. A seguir, a peça foi “limpa” de modo que só ficamos com a laringe (figura-8), a qual foi colocada na posição anatômica e feita incisão mediana posterior em toda a superfície. Ficamos então com duas hemilaringes (figura-9). Localizamos as pregas vocais e realizamos incisão superior e inferior na PV (Figura-10), com bisturi delicado, para fazer a retirada das PPVV, com o cuidado de não incluirmos as cartilagens aritenóideas nesta peça (figura-10).



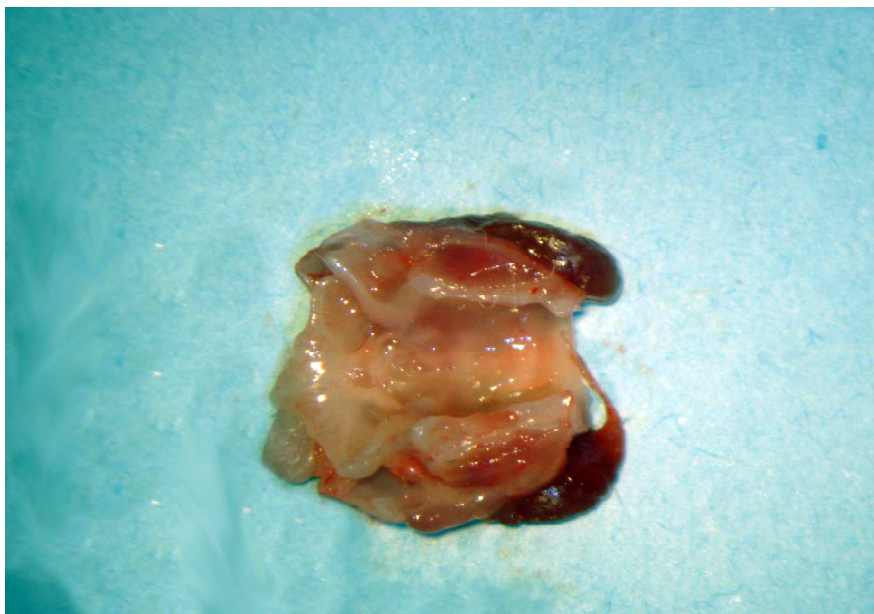
**Figura 16. Incisão cérvico-torácica**



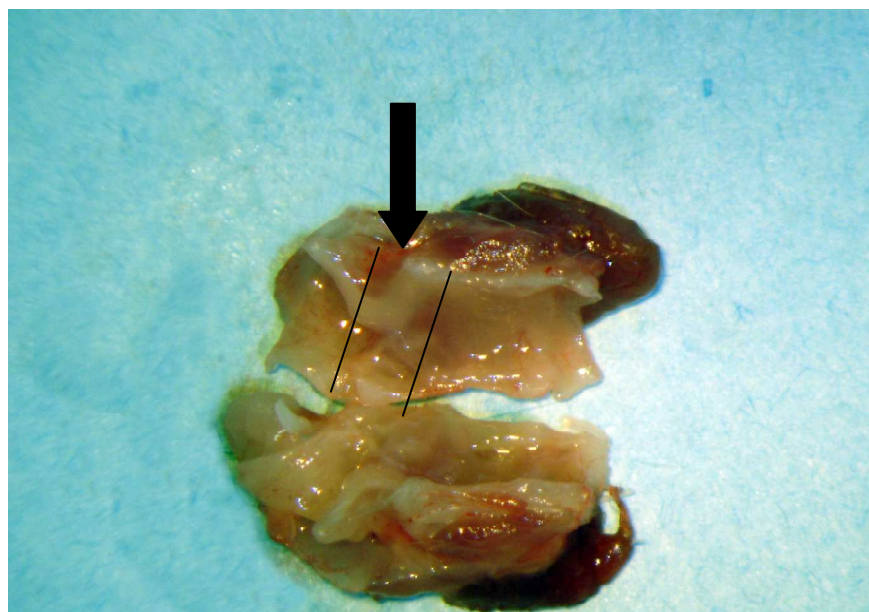
**Figura 17. Dissecção da traquéia**



**Figura 18. Detalhe da laringe da rata.**



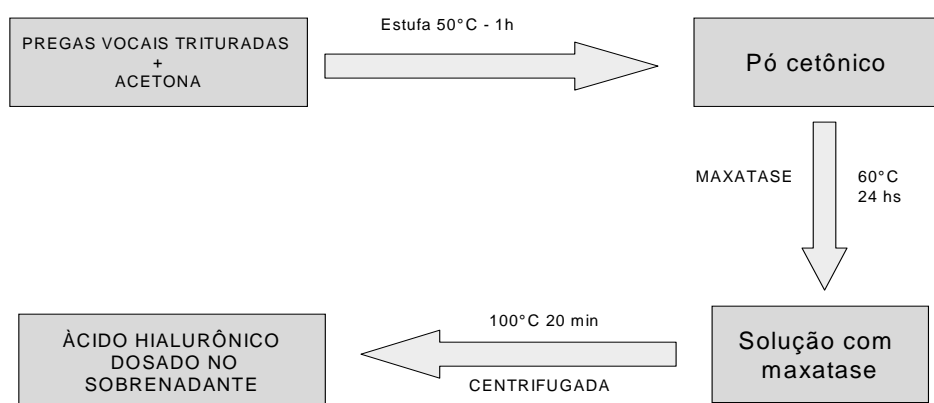
**Figura 19. Detalhe da incisão posterior na laringe**



**Figura 20. Incisão para a ressecção da prega vocal. A seta mostra a cartilagem aritenóidea.**

### Preparo da amostra para estudo bioquímico.

As pregas vocais de cada animal foram trituradas e colocadas em acetona, para remoção dos resíduos lipídicos. A acetona foi evaporada após período de 1 hora em estufa a 50° C e foi obtido o "pó cetônico", que foi pesado. Ao pó cetônico foi adicionado maxatase (protease alcalina; Biocon do Brasil Industrial Ltda –RJ, Brasil) na dosagem de 4 mg/ml em tampão Tris-HCL 0,05M em pH-8,0, acrescido de NaCl 1 M (100 µl de enzima para cada 100 mg de pó seco). A mistura foi incubada a 60° C por 24 horas e, após este período, a maxatase foi inativada por aquecimento a 100° C, durante 20 minutos. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas e o AH foi dosado no sobrenadante.



**Figura 11. Esquema do preparo da amostra para estudo bioquímico**

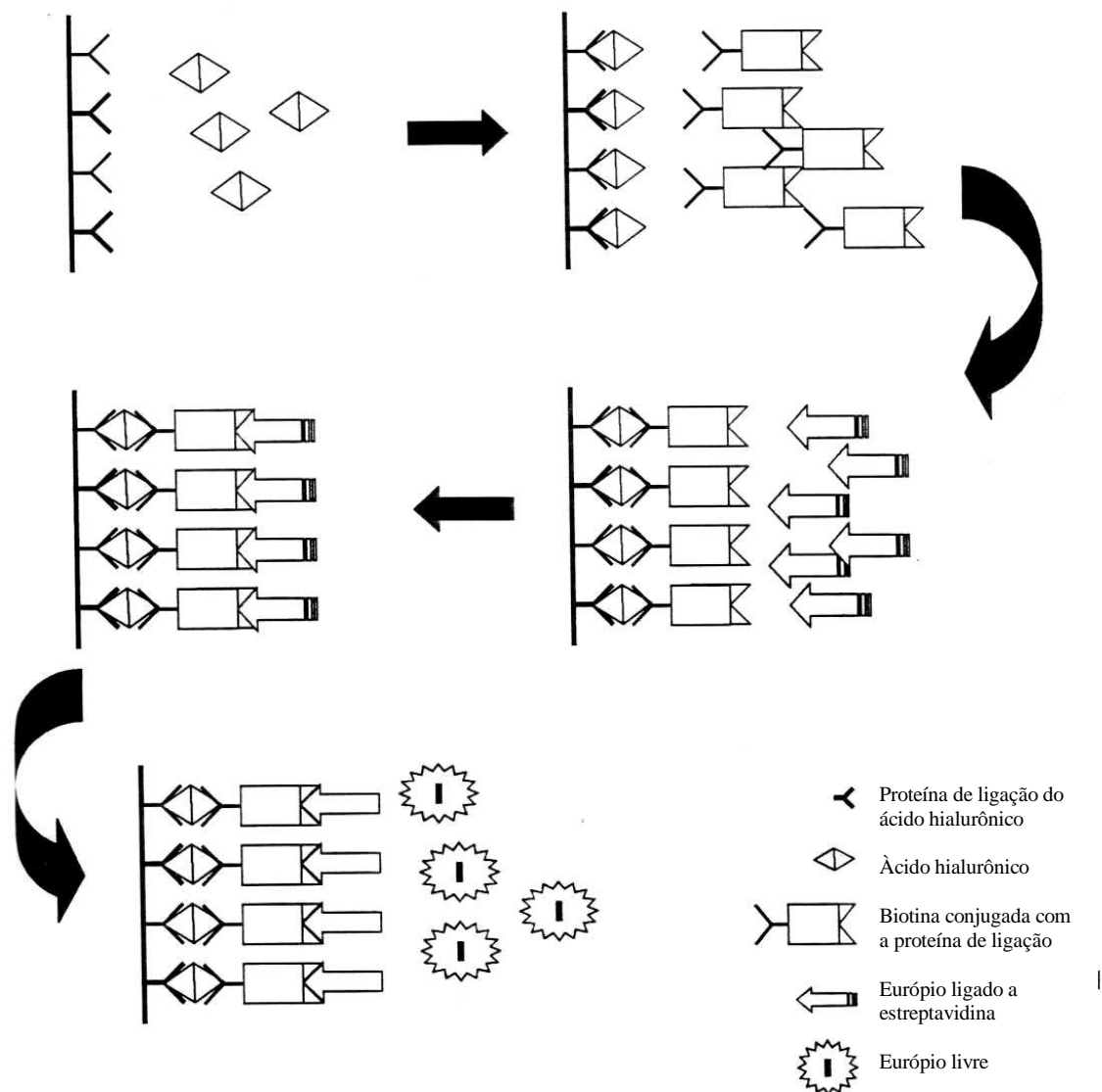
### Análise da concentração do ácido hialurônico

O método utilizado foi desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (figura-11) e

trata-se de um método fluorimétrico para a determinação do AH em fluidos biológicos, utilizando “sondas” de ligação do AH. A sonda é isolada de cartilagem nasal bovina e é constituída da região globular do agregam (um proteoglicano formado por um esqueleto protéico ao qual se ligam cadeias de queratam sulfato e condroitim sulfato) e da proteína de ligação do AH. A sonda é usada tanto imobilizada em placas de ELISA, à semelhança de um anticorpo de captura, como sonda biotinilada, funcionando nesse último caso como anticorpo secundário marcado.

#### **Determinação da concentração do AH por método fluorométrico.**

À placa de ELISA com sonda adsorvida foram adicionados 100 µl/poço de soluções de AH padrão em várias concentrações (0 a 500 µg/l), diluídas no tampão de ensaio Tris-HCL 0,05 M, pH 7,75 e BSA 1% (albumina bovina sérica), além das soluções das amostras obtidas dos tecidos diluídas no mesmo tampão de ensaio (1:100), em triplicatas. Foi realizada a incubação a 4° C por 12 horas, sendo a placa então lavada com tampão de lavagem (Tris-HCL 0,05 M , Ph 7,75) por três vezes. Em seguida foram adicionadas 100 µl da sonda (1mg/ml) 1:10000 em tampão de ensaio. A placa foi agitada por 2 horas e em seguida lavada nove vezes com tampão de lavagem. Após esta operação, foram adicionados à placa 100 µl/poço de estreptavidina marcada com európio diluído 1:10000 em tampão de ensaio. A estreptavidina tem afinidade pela biotina conjugada à sonda. A placa foi agitada por meia hora e a seguir lavou-se com tampão de lavagem nove vezes. Por fim, com o objetivo de soltar o európio ligado à estreptavidina, adicionou-se uma solução de “enhancement”, 280µl/poço, agitou-se cinco minutos e o európio livre na placa foi lido em um fluorímetro. O resultado foi obtido em ng/ml.



**Figura 12. Representação esquemática do ensaio fluorimétrico do AH.** Placas de ELISA foram revestidas com a proteína de ligação do AH (PLAH) e sucessivamente incubadas com amostras desconhecidas, PLAH conjugada com biotina e estreptavidina marcada com európio. Após a liberação do európio com solução "enhancement" a fluorescência final é medida em um fluorímetro (Martins, 2002).

### Preparo do material para cortes histológicos

No preparo do material para os procedimentos histológicos, a laringe foi mergulhada em uma solução de formaldeído 10% para a fixação. Após 24 horas, as



peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas em parafina líquida.

Os cortes na laringe foram coronais, tendo sido feitos três cortes de 4 µm sequenciais na região membranácea média. . Foram distribuídos em lâminas, colocados em estufa a 60° C, por 45 minutos, e depois mantidos em estufa regulada à temperatura de 37° C, por 24 horas, para secagem.

A desparafinação dos cortes foi feita mediante três incubações sucessivas com xilol, por 10 minutos cada. Posteriormente, os cortes foram hidratados com dois banhos de 10 minutos em etanol absoluto e um banho de 10 minutos em etanol 70%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em água destilada por 10 minutos.

Um corte foi submetido à coloração de hematoxilina-eosina (HE), outro à coloração com azul de alcian e o terceiro corte submetido a tratamento com hialuronidase de *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma Chemical Co. –St Louis, MO,USA), sendo posteriormente também corado pela técnica do azul de alcian.

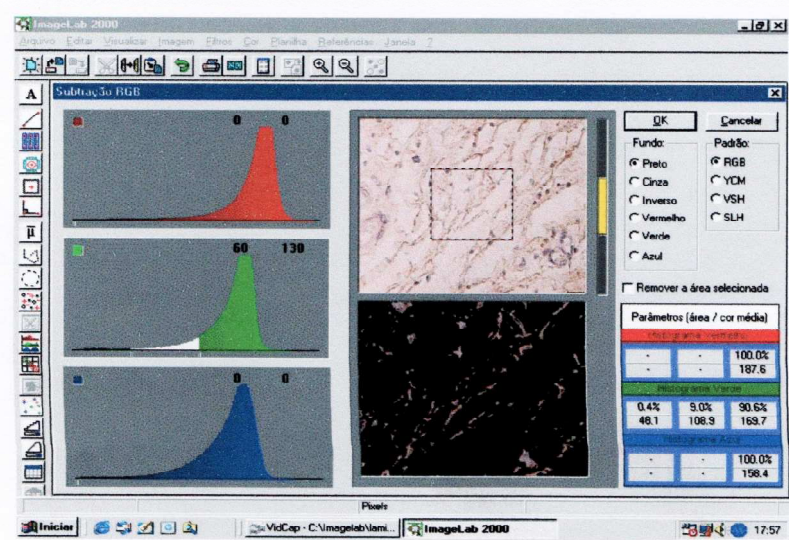
Para o tratamento com a hialuronidase, a lâmina foi lavada com PBS duas vezes, por cinco minutos, depois com acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (tampão da enzima hialuronidase) duas vezes, por cinco minutos. Incubamos com hialuronidase 500 unidades/ml em acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 ON. Lavamos com PBS duas vezes durante cinco minutos e, finalmente, coramos com a técnica do azul de alcian pH 2,5.

### **Determinação do AH por titulação eletrônica**

O processo de Titulação eletrônica foi realizado no Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia (LIDO) do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP).

As lâminas com cortes corados com azul de alcian tiveram as imagens digitalizadas por câmera digital (Sony Hyper HAD SSC-DC14), acoplada a microscópio óptico (Laboval 4, Carl Zeiss), utilizando-se aumento de 40 vezes. Para titulação eletrônica da PV foram incluídos no campo o epitélio, lâmina própria e o músculo das pregas vocais. Foram coletadas as informações de um campo por lâmina e enviadas ao computador, via placa de vídeo (VID Cap), onde foram analisadas pelo *software* Imagelab 2000® (desenvolvido no LIDO). (Novelli et al, 1997)

O Software Imagelab 2000® (versão atualizada do programa DIRACOM 3) permite, por processo de decomposição da cada “pixel” nas cores elementares RGB (R= vermelho; G= verde; B= azul), identificar estruturas a partir de um espectro de cor selecionado, escolhido dentre 126 tons para cada uma das cores elementares. Após a definição do espectro de cores, que seleciona somente as estruturas de coloração azul (positividade para glicosaminoglicanos), o programa apresenta os valores da concentração (em porcentagem) da cor selecionada em relação ao campo total (fig-12).



**Figura 13. Tela de trabalho software Imagelab 2000.**

**Estatística**

Os resultados dos subgrupos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). O teste de ANOVA é indicado quando se quer comparar três ou mais grupos de informações com nível de mensuração numérica. As amostras são independentes e/ou pareadas e deseja-se saber se em médias os grupos são diferentes. Pode-se testar mais de um efeito com um único modelo.

## **5. RESULTADOS**

### Concentração do Ácido Hialurônico

Os valores das dosagens das concentrações do AH, obtidos por meio do método fluorimétrico, pertencentes aos vários subgrupos estão expressos na tabela 1 e na tabela 2.

**TABELA 1.** Dados sobre a amostra no ciclo estral: peso, quantidade e concentração do ácido hialurônico. Subgrupos: E-estro, D-diestro, M-metaestro, P-proestro.

Subgrupos	peso (g)	AH (ng)	
		na amostra	AH μg/g tec
E-I	0,0114	971,152	85,2
E-II	0,0124	1015,980	81,9
E-III	0,0122	1657,432	135,9
E-IV	0,0118	940,968	79,7
			95,7 média
			23,3 DP
D-I	0,0123	1176,448	95,6
D-II	0,0136	1622,096	119,3
D-III	0,0136	1319,360	97,0
D-IV	0,0127	1138,928	89,7
			100,4 média
			11,2 DP
M-I	0,0118	915,068	77,5
M-II	0,0125	851,284	68,1
M-III	0,0126	1094,464	86,9
M-IV	0,0122	1329,916	109,0
			85,4 média
			15,2 DP
P-I	0,0124	1644,272	132,6
P-II	0,0131	1515,276	115,7
P-III	0,0129	1217,804	94,4
P-IV	0,0138	1359,708	98,5
			110,3 média
			15,1 DP

**TABELA 2.** Dados sobre a amostra no ciclo gravídico-puerperal: peso, quantidade e concentração do ácido hialurônico. Subgrupos: 7° - sétimo dia, 14° - décimo quarto dia, 21 - vigésimo primeiro dia, P- décimo quarto dia de puerpério.

Sub Grupos	peso (g)	AH (ng/mL) Na amostra	AH $\mu\text{g/g}$ tec
7-I	0,0125	1181,236	94,5
7-II	0,0133	949,284	71,4
7-III	0,0134	955,304	71,3
7-IV	0,0136	1397,704	102,8
			85,0 média
			14,0 DP
14-I	0,0124	1571,612	126,7
14-II	0,0126	956,732	75,9
14-III	0,0127	1209,824	95,3
14-IV	0,0123	490,532	39,9
			84,5 média
			31,5 DP
21-I	0,0115	759,78	66,1
21-II	0,0124	953,484	76,9
21-III	0,0129	1138,088	88,2
21-IV	0,0121	917,028	75,8
			76,7 média
			7,9 DP
P-1	0,0040	1036,992	259,2
P-2	0,0038	1022,508	269,1
P-3	0,0052	783,132	150,6
P-4	0,0046	1479,612	321,7
			250,1 média
			62,2 DP

**TABELA 3.** Comparativo entre subgrupos no grupo estral, segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.

	ESTRO	DIESTRO	METAESTRO	PROESTRO
Média	95,68	100,40	85,38	110,30
Desvio-padrão	26,88	12,97	17,52	17,49
N	4	4	4	4

ANOVA (p) = 0,372 Não significante. Não houve diferença entre os subgrupos quanto à medida avaliada.

**TABELA 4.** Comparativo entre subgrupos no grupo gravídico-puerperal no 7°, 14°, 21° e 14° dia de puerpério (P), segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.

	7° DIA	14° DIA	21° DIA	P
Média	84,98	84,45	76,74	250,15*
Desvio-padrão	16,12	36,35	9,07	71,80
N	4	4	4	4

ANOVA (p) < 0,001 \*Significante. Por comparações múltiplas, temos que o grupo P teve respostas maiores que os demais grupos.

**TABELA 5.** Comparativo total entre subgrupos no grupo estral (E, D, M e P) e subgrupos no grupo prenhez (7, 14, 21 e P), segundo a medida AH  $\mu$ /g tecido seco.

	ESTRAL				PRENHEZ			
	E	D	M	P	7	14	21	P
Média	95,68	100,40	85,38	110,30	84,98	84,45	76,74	250,1*
Desvio-padrão	26,88	12,97	17,52	17,49	16,12	36,35	9,07	71,80
N	4	4	4	4	4	4	4	4

ANOVA ( $p$ ) < 0,001 \* Significante. Por comparações múltiplas temos que o grupo prenhez P teve respostas maiores que os demais grupos.

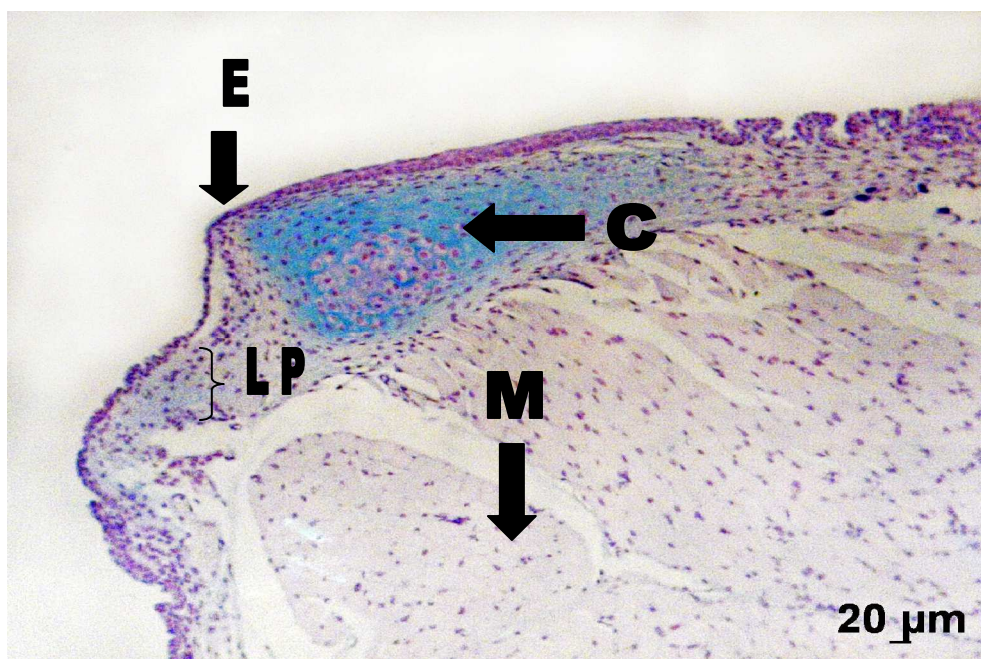
### Resultado da histologia



**Figura 14.** Corte da prega vocal de rata corada com HE no puerpério, onde E é o epitélio, LP-lâmina própria e M-músculo.



No corte das pregas vocais de ratas coradas com HE, observamos na borda livre a presença de epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, constituído por cerca de três ou quatro camadas. A LP abaixo do epitélio apresenta em algumas regiões duas camadas e, em outras, chega a três camadas. Logo abaixo podemos observar o músculo tireoaritenóideo



**Figura 15.** Corte da prega vocal da fase puerpério corada com azul de alcian.

**E-epitélio, C-cartilagem aritenóide, LP-lâmina própria e M-músculo.**

Nos cortes da prega vocal de ratas coradas com azul de alcian, podemos observar uma coloração azul mais intensa no epitélio, lâmina própria, glândulas e principalmente na cartilagem, indicando a presença de GAGs nestas estruturas.

**Tabela 6.** Os resultados apresentados pela análise quantitativa das concentrações de GAGs, no corte com coloração azul de alcian e corte tratado com hialuronidase específica para o AH.

		Cortes histológicos		
		Azul de alcian em %	Azul de alcian com hialuronidase em %	DIFERENÇA
CICLO	ESTRO	15,6	9,2	6,4
ESTRAL	DIESTRO	20,9	16,7	4,2
	METAESTRO	21,0	18,0	3,0
	PROESTRO	19,8	18,9	0,9
CICLO	7° DIA	13,1	12,2	0,9
GRAVÍDICO	14° DIA	19,2	11,7	7,5
PUERPERAL	21° DIA	18,9	9,2	9,7
	14° PUER.	16,5	11,5	5,0

## **5. DISCUSSÃO**

Há uma grande dificuldade em se pesquisar, dos pontos de vista histológico e bioquímico, a PV de cadáveres femininos em relação à fase hormonal, uma vez que geralmente em seus prontuários não constam dados do ciclo menstrual e medicações usadas.

Coelhos e cães já foram utilizados em experimentos com PPVV (Rousseau et al, 2003; Rousseau et al, 2004), mas, segundo Tateya et al (2005), o rato é um modelo melhor, pois a LP das suas PPVV tem características semelhantes às humanas: pode ser dividida em camadas, sendo que a profunda contém mais fibras colágenas que a superficial. Além disso, no rato, dispomos de extensa informação genética e, como ele tem um ciclo de vida curto, possibilita que diversos ciclos sejam investigados. Devido ao seu tamanho e fertilidade, é um modelo economicamente mais viável. A porção cartilaginosa da laringe é cerca de cinco vezes maior no rato que no humano, fato que pode ser apontado como uma desvantagem neste modelo.

Quando determinamos o intervalo de tempo para o sacrifício dos animais no ciclo gravídico-puerperal, escolhemos a cada sete dias, pois, como a gestação da rata dura cerca de 21 dias, estamos dividindo este período em três fases iguais. Escolhemos o 14º dia de puerpério para o sacrifício, uma vez que é neste dia que começaria o desmame, e a rata voltaria a ter os mesmos estímulos que no ciclo estral.

Nos cortes histológicos realizados com a coloração de HE, foi observado que a estrutura das PPVV de ratos é semelhante à dos humanos: com epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado com algumas camadas (3 ou 4), a LP com 2 camadas e, mais profundamente, o músculo, os vasos e os nervos. Foi encontrada cartilagem aritenóide em quase toda a extensão da PV, o que confirma os achados de Tateya et al (2005).

Tivemos muita dificuldade na utilização do software Imagelab 2000, para estabelecer um espectro de cores em que a medida fosse realizada, porque as variações de cores eram todas em azul. O tamanho do campo também foi fator limitante, pois a LP da rata é muito pequena. Assim, ficava difícil ocupar um campo inteiro para as medidas, mesmo nos maiores aumentos, e a cartilagem não podia fazer parte dessas medidas. Quando realizamos a quantificação do AH através do programa Imagelab 2000, esperávamos confirmar os achados do método fluorimétrico, observando um aumento ou diminuição da coloração, mas, devido às dificuldades já mencionadas, os resultados não puderam ser comparados.

Os métodos utilizados para a pesquisa do AH em outros trabalhos são indiretos, como demonstram Pontes et al (1989), Hammond et al (1997) e Butler et al (2003), nos quais são utilizados reagentes para os GAGs e proteínas, sendo que, depois, é usada hialuronidase testicular, para se diferenciar onde havia presença do AH por comparação ou subtração. Ocorre que esta hialuronidase não é específica para o AH, podendo degradar também o condroitin sulfato. Portanto, nesses trabalhos, pode-se estar incluindo outras substâncias além do AH.

O método empregado para a detecção da concentração do ácido hialurônico foi desenvolvido na Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, no Departamento de Biologia Molecular, e é um dos mais sensíveis descritos na Literatura. É utilizada uma hialuronidase específica para o AH e, no método fluorimétrico, é usada uma proteína de ligação ao AH, isolada de cartilagem bovina que reconhece especificamente o AH.

Likar & Likar (1964), em seu estudo em células de mama e parede uterina de bovinos, encontrou um aumento dos mucopolissacarídeos e, junto com estes, a fração de hialuronato, de acordo com a fase do ciclo estral. Durante a fase chamada de

folicular (diestro, proestro e estro), houve aumento do estrógeno e aumento gradativo da quantidade de hialuronato, que após a ovulação (fase lútea) volta a diminuir. Pontes et al (1989) e Cubas (2001) realizaram trabalhos nos quais eram feitas as quantificações do AH na mucosa nasal e colo uterino de ratas, respectivamente, sendo que ambos observaram não haver variação da quantidade de AH nestes tecidos durante o ciclo estral. Na pesquisa de Likar & Likar (1964), o modelo animal era diferente e a técnica para a quantificação do AH também. Provavelmente estes fatores culminaram com resultados divergentes em relação aos nossos.

Em nosso trabalho não observamos variação significativa da concentração do AH nas pregas vocais de ratas durante o ciclo estral. Este resultado confirma os achados de Pontes et al (1989) e Cubas (2001) que, em suas pesquisas, utilizaram o mesmo modelo animal, mas em tecidos diferentes, a técnica por nós utilizada para a determinação do AH foi a mesma do segundo autor.

Kofoed et al (1972) demonstraram que a variação do conteúdo do AH no útero de ratas sofre a influência dos hormônios. O estrógeno faria diminuir a concentração do AH, portanto, era de se esperar que a concentração do mesmo variasse durante o ciclo estral, uma vez que o estrógeno tem seu pico durante a fase folicular e torna a diminuir logo após a ovulação. Acontece, entretanto, que o autor não realizou seu experimento com a variação fisiológica dos hormônios, tendo castrado e administrado doses diferentes de benzoato de estradiol, e, talvez por esta razão, tenha encontrado uma variação mais evidente nos seus resultados.

Pontes et al (1989) observaram na sua amostra a existência de um mucopolissacarídeo ácido não sulfatado, possivelmente o AH, que diminuía com a evolução da gravidez. Nos trabalhos de Cabrol et al (1985) e Laurent et al (1995), os tecidos estudados, provenientes de órgãos urogenitais de animais no período

gestacional, são alvos mais sensíveis à ação dos hormônios, pois com a evolução da gestação temos uma diminuição do estrógeno e, como demonstrou Kofoed et al (1972), isto causaria o aumento da quantidade de AH. Rajabi et al (1992) e Kobayashi et al (1999) estudaram o AH no soro de porcas da Guiné e em mulheres, respectivamente, encontrando um aumento do AH com a evolução da prenhez. É provável que isto ocorra por aumento na mobilização do AH nos tecidos.

Na nossa amostra não notamos variação na concentração de AH durante a prenhez. Era de se esperar que houvesse, pois Newman et al (2000) demonstraram que a PV apresenta receptores para os hormônios gonadotróficos. Para explicar estes dados, podemos supor que os hormônios teriam uma ação diferente nos tecidos de órgãos urogenitais, que participam de maneira mais ativa do processo gestacional, aumentando a concentração do AH e mobilizando o AH através do sangue, enquanto nos outros tecidos sua ação seria menos evidente.

Pontes et al (1989) observaram que no puerpério o mucopolissacarídeo ácido não sulfatado reaparecia. Em nosso trabalho, encontramos um aumento significativo da concentração do AH neste período. Era de se esperar que, após o parto, com a volta dos hormônios aos níveis normais, o AH também voltasse a níveis observados anteriormente. Segundo Rajabi (1992), os níveis do AH no soro de porcas da Guiné voltam ao normal dois dias após o parto. Verificamos que mesmo comparando com o período do ciclo estral, isto é, fora da gestação, a concentração do AH estava significativamente aumentada no puerpério, o que nos leva a crer que, provavelmente com a amamentação, outras substâncias passam a agir e podem causar mudanças na dinâmica do AH.

Talvez nossa amostra fosse pequena e, para podermos detectar variações mais substanciais, tivéssemos que usar uma amostra maior. Por outro lado, no

nosso experimento, o método realizado é um dos mais sensíveis para a análise da concentração do AH.

Nosso estudo demonstrou que a concentração do AH pode variar nas pregas vocais e que, provavelmente, este fenômeno sofre a ação de muitos fatores. A importância desta substância na função fonatória nos inspira a aprofundar as pesquisas nesta área, para uma possível correlação clínica no futuro.



**CONCLUSÕES**

Da análise da concentração de ácido hialurônico nas pregas vocais de ratas no ciclo estral e gravídico-puerperal, podemos concluir que:

1. Não há variação da concentração do ácido hialurônico durante ciclo estral.
2. No puerpério há um aumento da concentração do ácido hialurônico
3. Comparando-se todos os subgrupos do ciclo estral e ciclo gravídico-puerperal, só no puerpério há aumento da concentração do ácido hialurônico.

**7. REFERÊNCIAS**

Abitbol J, Abitbol P, Abitbol B. Sex hormones and Female voice. *J Voice* 1999;13(3):424-46.

Altman KW, Haines III GK, Vacalanka SK, Keni SP, Koop PA, Radosevich JA. Identification of Thyroid Hormone Receptors in the Human Larynx. *Laryngoscope* 2003;113(11):1931-4.

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

De Biase N, Silva MC . Estudo da frequência fundamental da voz em mulheres jovens com síndrome pré-menstrual. *Dist. Com.* 2000;11(2):301-11.

Cabrol D, Dallot E, Cedard L, Sureau C. Pregnancy-related changes in the distribution of glycosaminoglycans in the cervix and corpus of the human uterus. *Europ J Obstet Gynec reprod Biol* 1985;20:289-95.

Chan RW, Titze RI. Hyaluronic Acid (With Fibronectin) As a Biopimplant for the Vocal Fold Mucosa. *Laryngoscope* 1999;109(8):1142-9.

Chan RW, Gray SD, Titze RI. The Importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otol Laringol Head Neck Surg* 2001;124(6):607-14.

Collins S A, Missing C . Vocal and Visual attractiveness are related in women. *Anim Behav* 2003;65:997-1004

Cubas JMC. Análise histomorfológica e caracterização dos glicosaminoglicanos no colo uterino de ratas durante o ciclo estral. [Tese] São Paulo:Universidade Federal de São Paulo; 2002.

Figueiredo LC, Gonçalves MIR, Pontes A, Pontes P. Estudo do comportamento vocal no ciclo menstrual: avaliação perceptivo-auditiva, acústica e auto-perceptiva. *Rev Bras Otol* 2004 ;70(3):331-9.

Gray SD, Titze IR, ChaR, Hammond TH. Vocal Fold Proteoglycans And Their Influence on Biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109(6):845-54.

Greene RJ, Dalton K .The Premenstrual Syndrome. *Brit Med J* 1953;1: 4118-25.

Hallén L, Dahqvist A, Laurent C. Dextranomers in Hyaluronan (DiHA): A promising Substance in Treating Vocal Cord Insufficiency 1998;108(3):393-7.

Hamilton JB, Wolf JM. The effect of male hormone substances upon birth and prenatal development in the rat. *Anat Rec*1938;70:433-39.

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 fold. *J Voice* 1997;11(1):59-66.

Hertergård S, Hallén L, Laurent C, Lindström E, Olafsson K, Dahlqvist A. Cross-Linked Hyaluron Used as Augmentation Substance for treatment of Glottal Insufficiency: Safety Aspects and Vocal fold Function. *Laryngoscope* 2002;112(12):2211-9.

Hertergård S, Dahlqvist A, Laurent C, Borzacchiello A, Ambrosio L. Viscoelastic properties of rabbit vocal folds after augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128(3):401-6.

Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states- anatomical and physical studies. In: Ludlow CL, Hard MO, eds. *Proceedings of the conference on the assessment of vocal pathology*. Rockville, MD: American Speech Language-Hearing Association; 1981. p.11-30.

Kobayashi H, Sun GW, Tanaka Y, Kondo T, Terao T. Serum hyaluronic acid levels during pregnancy and labor. *Obstet Gynecol* 1999;93(4):480-4.

Kofoed A J, Houssay AB, Tocci AA, Curbelo HM. Effects of oestrogens upon glycosaminoglycans in the uterus of rats. *Acta Endocr* 1972;69:87-94.

Laurent C, Hellström , Engström-Laurent A, Wells AF, Bergh A. Localization and quantity of hyaluronan in urogenital organs of male and female rats. *Cell Tissue Res* 1995;279:241-48.

Lebl MDA. Estudo da concentração e disposição do ácido hialurônico em pregas vocais humanas. Tese de mestrado- Unifesp-EPM 2004:38 pgs.

Lida N, Bourguignon LYW. Coexpression Variant (v10/ex14) and CD in Human Mammary Epithelial Cells Promotes Tumorigenesis. *J Cell Physiol* 1997;171:152-60.

Likar IN, Likar JL. Acid mucopolysaccharides and mast cells in the bovine uterus at different stages of the sexual cycle. *Acta Endocr* 1964;46:493-506.

Lindholm P, Vilkmann E, Skoski TR, Luukkonen ES, Kauppila S. The Effect of postmenopausal HRT on measured voice values and vocal symptoms. *Mat J Clim & Postm* 1997;28:47-53.

Martins JRM. O papel do glicosaminoglicanos na definição da atividade inflamatória da oftalmopatia de Graves. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2002.

Meyer K, Palmer JW. The Polysaccharide of Vitreous Humor. *J Biol Chem* 1934; 107:629-34.

Newman RS, Butler J, Hammond EH, Gray S . Preliminary Report on Hormone Receptors in Human Vocal Fold. *J Voice* 2000;14(1):72-81.

Novelli MD, Barreto E, Matos D, Saad SS, Borra RC. Aplicação do processamento de imagens para computador na quantificação das variáveis histopatológicas na reparação tecidual de anastomose coloclíca em cães. *Rev Ass Méd Bra-s* 1997;43:277-82

Pawlak AS, Hammond TH, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:6-11.

Perazzo PSL. Estudo do comportamento histológico da prega vocal do coelho após a injeção do Ácido Hialurônico.[Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2005.

Pontes PAL, Simões MJ, Merzel J . Histoquimic detection of glicoproteins and glycosaminoglycans on respiratory mucose of albine mouses duringestral cicle and pregnant. *Rev Bras Biol* 1989; 49:1125-9

Rajabi RM, Quillen EW, Nuwayhid BS, Brandt R, Poole AR. Circulating hyaluronic acid in nonpregnant, pregnant, and postpartum guinea pigs: Elevated levels observed at parturition. *Am J Obst Gynecol* 1992;166:242-6.

Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV,Thibeault S, Chan RW, Bless DM. Charaterization of Vocal Fold Scarring in a Canine Model. *Laryngoscope* 2003;113(4):620-7.

Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV,Thibeault S, Ford CN, Bless DM. Charaterization of Chronic Vocal Fold Scarring in a Rabbit Model. *J Voice* 2004;18(1):116-24.

Santos AV, Ferrazzoli MO. Ciclo estral nos animais. Portal veterinário: Artigos científicos. 2001[consultado em 2005]: 6 pgs. Disponível em: <http://www.redevet.com.br/artigos/estral1.htm> .

Short DJ, Woodnott DP. The IAT Manual of Laboratory Animal Praticce and Thecniques In: Mamaliam Reproduction. Rowlands W. CR Austin pgs 340-49

Satalof RT, Emerich KA, Hoover CA. Endocrine dysfunction In: Satalof RT 1997. Professional voice : the science and art of clinical care 2 ed San Diego, Singular Publishing Group 291-7.

Semple S, McComb K. Perception of female reproductive state from vocal cues in mammal species. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 2000;267:707-12.

Tateya T, Sohn JH, Tateya I, Bless DM. Histologic Characterization of Rat Fold Scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:183-92.

Thibeault S, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and Rheologic Characterization of Vocal Fold Scarring. *J Voice* 2002;16(1):96-104.

Thibeault S, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan Levels in Acute Vocal Scar. *Laryngoscope* 2004;114(5):760-4.

Vasconcelos AM, Silva MAA, Ferreira LP, Silva FLC. Percepções vocais relacionadas às alterações vocais nas mulheres. *Dist Com.* 2001;12(2):195-222

**8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Dados sobre a amostra no ciclo estral: quantidade do ácido hialurônico diluído 1:100, volume da solução e concentração do ácido hialurônico na solução.

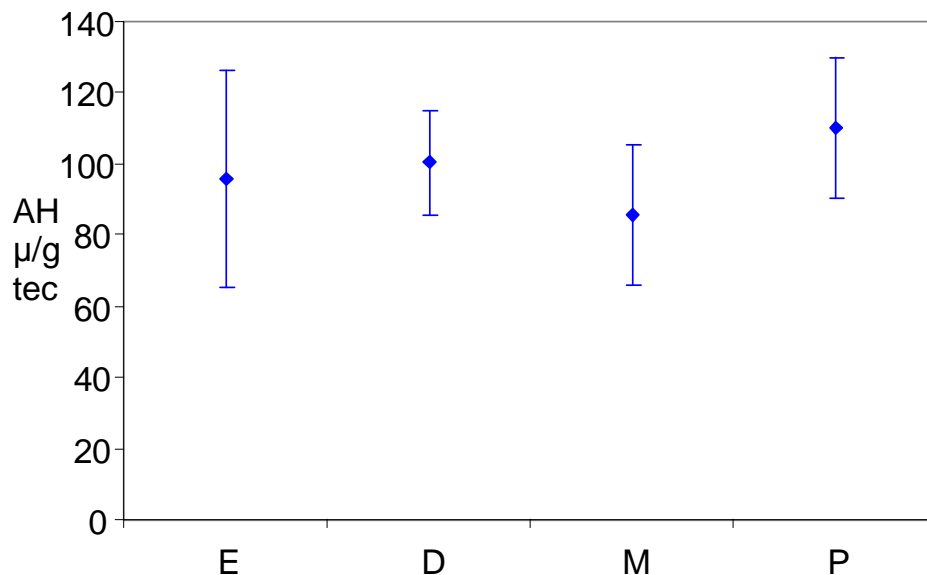
Sub grupos	Diluído 1:100		AH (ng/mL) na solução
	AH ng/mL	vol. Ress (µL)	
E-I	34,684	280	3468,4
E-II	36,285	280	3628,5
E-III	59,194	280	5919,4
E-IV	33,606	280	3360,6
D-I	42,016	280	4201,6
D-II	57,932	280	5793,2
DIII	47,12	280	4712
DIV	40,676	280	4067,6
M-I	32,681	280	3268,1
M-II	30,403	280	3040,3
M-III	39,088	280	3908,8
M-IV	47,497	280	4749,7
P-I	58,724	280	5872,4
P-II	54,117	280	5411,7
P-III	43,493	280	4349,3
P-IV	48,561	280	4856,1



**Anexo 2.** Dados sobre a amostra no ciclo gravídico-puerperal: quantidade do ácido hialurônico diluído 1:100, volume da solução e concentração do ácido hialurônico na solução.

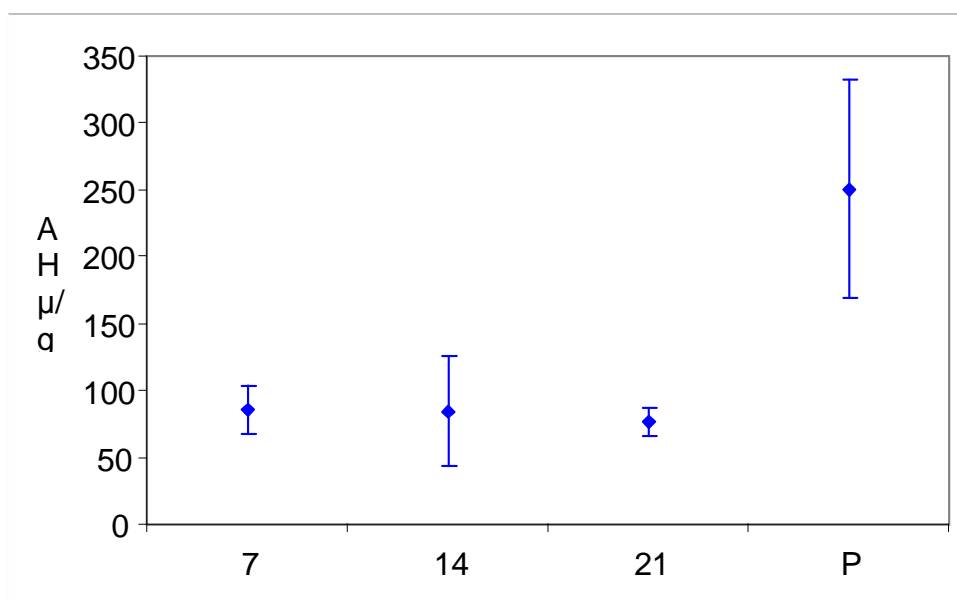
Sub Grupos	Diluído 1:100		AH (ng/mL) na solução
	AH ng/mL	vol. Res (μL)	
7-I	42,187	280	4218,7
7-II	33,903	280	3390,3
7-III	34,118	280	3411,8
7-IV	49,918	280	4991,8
14-I	56,129	280	5612,9
14-II	34,169	280	3416,9
14-III	43,208	280	4320,8
14-IV	17,519	280	1751,9
21-I	27,135	280	2713,5
21-II	34,053	280	3405,3
21-III	40,646	280	4064,6
21-IV	32,751	280	3275,1
P-1	86,416	120	8641,6
P-2	85,209	120	8520,9
P-3	65,261	120	6526,1
P-4	123,301	120	12330,1

**Anexo 3.** Gráfico comparativo entre subgrupos no grupo estral, segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.



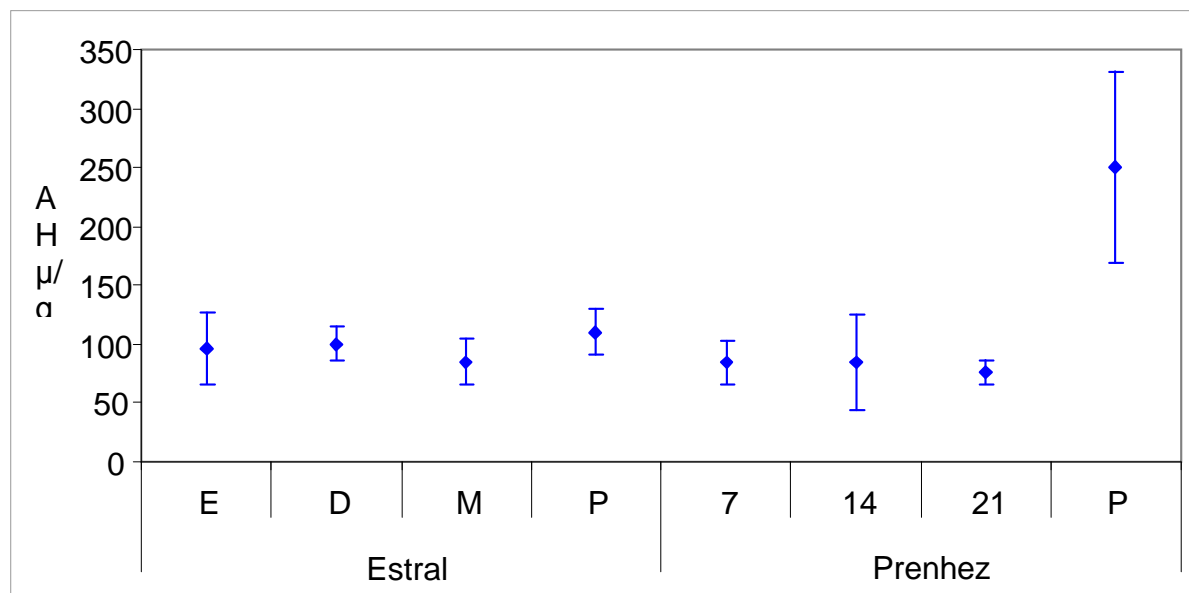
Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$

**Anexo 4.** Gráfico comparativo entre subgrupos no grupo ciclo gravídico-puerperal, 7°, 14°, 21° e 14° dia de puerpério (P), segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.



Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$

**Anexo 5.** Gráfico comparativo total entre subgrupos no grupo estral (E, D, M e P) e subgrupos no grupo prenhez (7, 14, 21 e P), segundo a medida AH  $\mu/g$  tecido seco.



Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ .

**9. ABSTRACT**

Hormones play an important role in the larynx. Voice variations are common in the clinical practice and may reflect alterations in the vocal folds at the macroscopic and ultrastructural levels. The vocal fold is composed of a number of substances that provide its viscoelastic properties, notably the hyaluronic acid. The concentration of hyaluronic acid in the tissues may vary according to hormone action. **OBJECTIVE:** the objective of this study is to analyze the concentration of hyaluronic acid in the vocal folds during estral and gravidic-puerperal cycles. **METHOD:** 40 adult female rats were divided into two groups: Group I- 20 adult female rats were to determine concentration of hyaluronic acid during the estral cycle, and group II, 20 animals were submitted to the same procedure but during the gravidic-puerperal cycle. The two groups were divided into sub-groups according to the rats phase of the cycle and according to gestational phase. In the sub-groups of five animals, four were used to analyze the HA concentration and one was used for histological procedures. The method used was developed in the Department of Molecular Biology of the Federal University of São Paulo University – *Escola Paulista de Medicina*. It is a fluorometric method that determines HA in biologic fluids, using a probe to bind HA. Histological sections were submitted to alcian blue/ hematoxylin-eosin staining method with and without hyaluronidase treatment. **RESULTS:** Variation in the concentration of hyaluronic acid was not observed during the estral cycle. In the gravidic puerperal cycle group, an increase in the hyaluronic acid concentration was observed only in the puerperal subgroup. No difference could be observed in the comparison between the two groups of estral and gravidic-puerperal cycles, **CONCLUSIONS:** When comparing all subgroups of the estral and gravidic-puerperal cycles, an increase in the hyaluronic acid concentration could be seen only in the puerperal phase.

**10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Collins Prático. Dicionário Inglês-Português. 2<sup>a</sup> edição. São Paulo: Harper Collins; 1985. Editora Siciliano; p. 367.

Ganância MM, Pontes PAL. METODOLOGIA CIENTÍFICA: normatização para redação de teses. São Paulo: UNIFESP-EPM, Programa de pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço; 2005. 44f.

Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa, 2<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Aurélio Buarque de Holanda Ferreira; 1986. Editora Nova Fronteira; p.1838.

Marwel DL, Satake E, Research and Statistical Methods in Communication Disorders. Baltimore US: Willians & Wilkins; 1997.