

### II.3. LA FISIOLOGIA CELLULARE DELLE CORDE VOCALI

E. Cunsolo\*, D. Casolino\*\*, G. Cenacchi\*\*\*

«the core biologic processes affecting vocal folds are cellular»  
*Steven Gray, 2000*

La fisiologia laringea studia la dinamica funzionale dell'organo e dei meccanismi di controllo che ne consentono le tre fondamentali azioni: respirazione, fonazione e deglutizione.

Lo studio della fonazione richiede competenze multidisciplinare che, nel tempo, hanno portato all'acquisizione di un vasto corpo dottrinale, relativo alla processazione del segnale vocale ed all'analisi acustica della voce.

Negli anni più recenti, la definizione della funzione fonatoria ha approfondito l'analisi degli aspetti morfologici, strutturali ed ultrastrutturali, e biochimici delle corde vocali. Si è aperto così un filone di ricerca, tuttora in fase di sviluppo, che ha lo scopo di precisare gli intimi rapporti forma-funzione di queste strutture iperspecializzate, che possono considerarsi un vero e proprio «organo nell'organo».

Le corde vocali hanno una struttura istologica complessa. Sono, infatti, presenti tutte le varianti istologiche dei tessuti: epiteliale, connettivale, muscolare e nervoso. La fisiologia cellulare più recente ha focalizzato il proprio interesse sulle peculiarità dell'epitelio e della lamina propria e della membrana basale che fa da interfaccia tra i due tessuti. Esamineremo la fisiologia cellulare cordale, secondo un criterio anatomico, dalla superficie alla profondità: epitelio, membrana basale, lamina propria.

#### EPITELIO CORDALE

La porzione membranosa delle corde vocali è rivestita da epitelio squamoso stratificato. Una piccola striscia di epitelio ciliato pseudo-stratificato può essere presente occasionalmente nella commessura anteriore, mentre la commessura posterio-

---

\* U.O. ORL Ospedale «C.A. Pizzardi», Bologna

\*\* U.O. ORL Ospedale «Bufalini», Cesena

\*\*\* Anatomia ed Istologia Patologica, Policlinico «S. Orsola», Bologna

re si caratterizza per la regolare presenza di tal epitelio. Questa differente distribuzione dell'epitelio nell'ambito glottico risponde a precise esigenze funzionali. La glottide membranosa è, infatti, dotata del rivestimento epiteliale maggiormente specializzato nella resistenza meccanica, mentre a livello commessurale è presente l'epitelio più efficace nella gestione della Clearance Muco-Ciliare (CMC).

Le cellule dell'epitelio stratificato cordale hanno necessità fisiologiche diverse rispetto a quelle dell'epidermide. Devono, infatti, resistere ad intense sollecitazioni vibratorie e devono essere ottimizzate per un ambiente mucoso. Per rispondere a tali esigenze, le cellule epiteliali cordali sono prive dello strato corneo superficiale e si mantengono metabolicamente attive anche nei piani più superficiali, sino alla loro desquamazione nel lume aereo. Gli elementi cellulari mostrano, inoltre, un citoscheletro particolarmente sviluppato, con un efficace sistema di desmosomi, che garantisce coerenza tra le cellule anche sotto forti sollecitazioni vibratorie. Sono tuttora in corso ricerche per verificare se l'attività metabolica mantenuta nelle cellule degli strati superficiali, biologicamente «più vecchie», sia anche in relazione ad un controllo sul trasporto attivo dell'acqua.

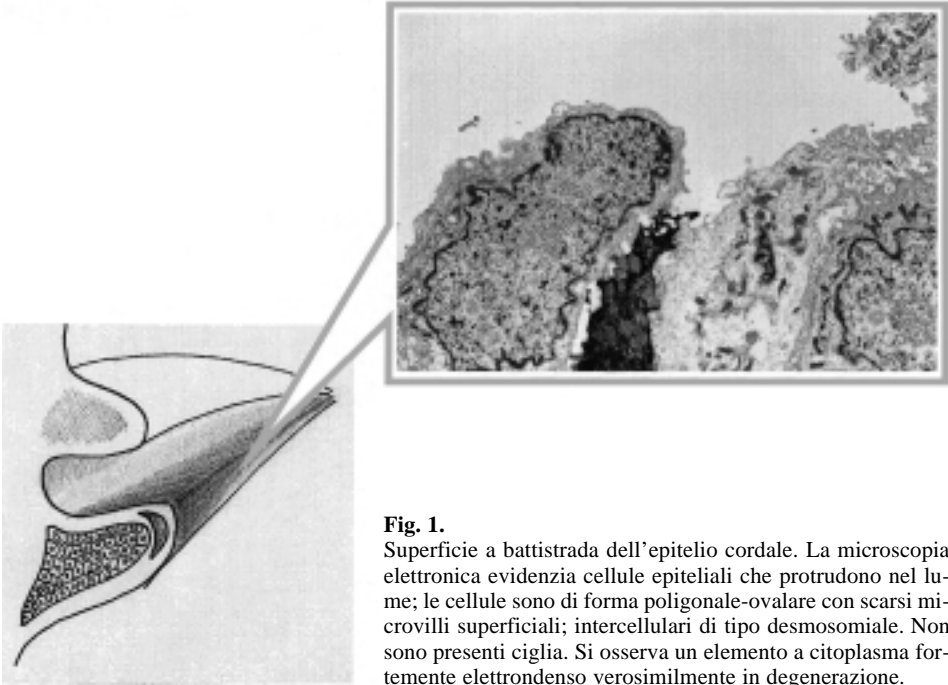
Gli studi di microscopia elettronica hanno evidenziato un aspetto a microcreste della superficie di rivestimento dell'epitelio squamoso, presente già nelle cellule di ricambio, immediatamente sottostanti a quelle in via di desquamazione<sup>12</sup>. Queste, prima di staccarsi definitivamente, presentano una fase di fluttuazione, nella quale rimangono legate alle cellule più giovani mediante ponti che si distaccano dalla sommità delle creste di queste ultime. Vi sono numerose ipotesi circa il significato funzionale delle microcreste: maggiore aderenza del muco, maggior assorbimento dell'acqua mediante aumento della area d'interfaccia. La superficie frastagliata delle corde vocali può essere paragonata al battistrada di un pneumatico, con la funzione di aumentare la trazione del flusso aereo fonatorio sulle corde vocali, ottimizzandone così la vibrazione (Fig. 1).

Nella glottide umana la funzione della Clearance Muco Ciliare (CMC) riguarda fondamentalmente l'epitelio cilindrico ciliato della commessura posteriore. Nell'uomo sono molto evidenti le vie della CMC nella trachea, dirette in alto, con verso antero-posteriore atto a raggiungere la regione commessurale posteriore (Fig. 2).

Lo scopo di questa disposizione è quello di orientare i flussi di muco delle vie respiratorie inferiori verso l'ipofaringe, destinandolo alla deglutizione. Ciò potrebbe spiegare l'elettiva localizzazione alla glottide posteriore di malattie delle basse vie respiratorie, come nel caso della TBC laringea.

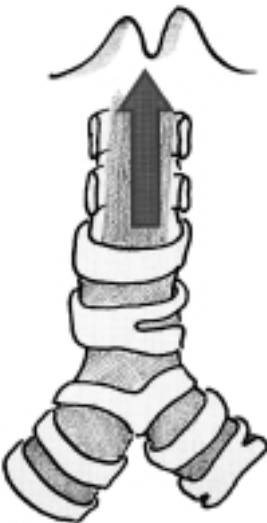
Fukuda<sup>6</sup> ha condotto studi comparativi sui flussi della CMC laringo-tracheale nel cane e nell'uomo. Nei modelli canini si è riusciti ad identificare delle vere e proprie correnti di CMC cordale, dirette in senso antero-posteriore (Fig. 3).

Queste osservazioni non si sono ripetute nelle laringi umane. Nell'uomo manca, infatti, una vera e propria CMC glottica. La notevole efficacia e velocità della CMC tracheale e sottoglottica, che riescono a sospingere un film mucoso molto fluido sull'epitelio squamoso glottico, e la superficie frastagliata di quest'ultimo sono, tuttavia, in grado di garantire un'ottimale lubrificazione ed umidificazione cordali. Le differenze di CMC tra la glottide del cane e quella umana rispondono, verosimilmente ad esigenze funzionali differenti. L'assenza di un vero e proprio mantello mucoso, nell'uomo, può rendere più fine e modulabile la vibrazione cordale. Le due



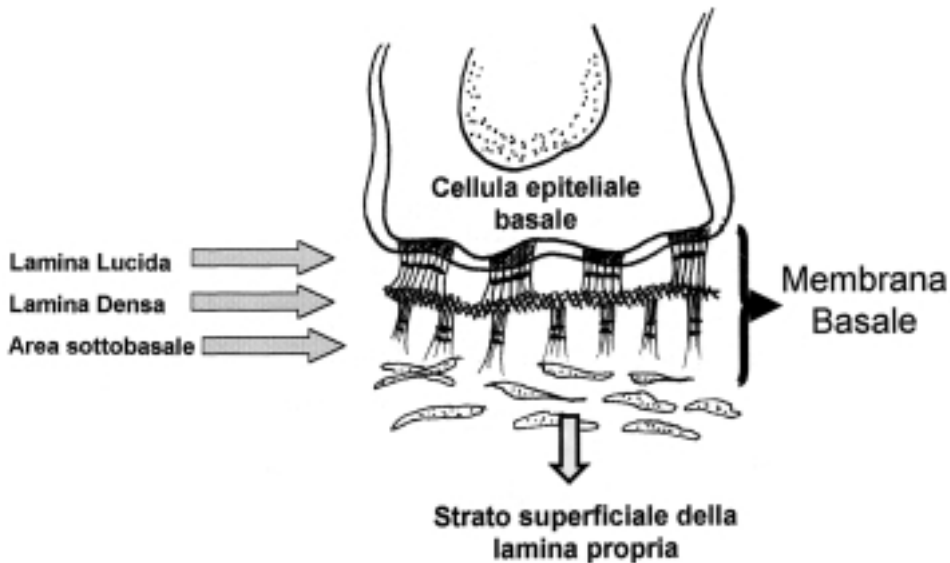
**Fig. 1.**

Superficie a battistrada dell'epitelio cordale. La microscopia elettronica evidenzia cellule epiteliali che protrudono nel lume; le cellule sono di forma poligonale-ovalare con scarsi microvilli superficiali; intercellulari di tipo desmosomiale. Non sono presenti ciglia. Si osserva un elemento a citoplasma fortemente elettrondenso verosimilmente in degenerazione.



**Fig. 2.**

CMC tracheale e sottoglottica nell'uomo (Da Gray <sup>12</sup>, modificata).



**Fig. 3.**  
Membrana basale cordale (Da Gray <sup>12</sup>, modificata).

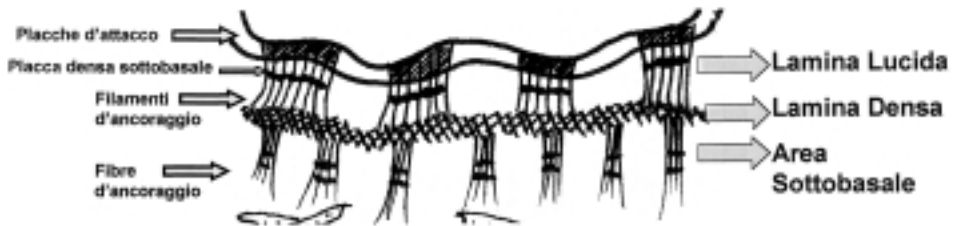
tipologie d'epitelio esprimono così un notevole sinergismo funzionale nell'ottimizzare la vibrazione fonatoria.

## MEMBRANA BASALE

Oltre a quanto già esposto, il rivestimento epiteliale glottico ha la funzione di conferire forma e consistenza alla lamina propria. Lo strato epiteliale è, infatti, un tessuto prevalentemente cellulare, con le cellule mantenute in coesione dai desmosomi, che va a ricoprire la lamina propria, tessuto essenzialmente non cellulare e perciò tendenzialmente amorfo. Ad ottimizzare questa giunzione, resa assai complessa dalle intense vibrazioni alle quali è sottoposta, è chiamata una struttura d'interfaccia altamente specializzata, qual è la membrana basale (MB). Questa deve assolvere essenzialmente a due compiti: contribuire a mantenere la coesione tra le cellule basali dell'epitelio squamoso ed assicurare queste ultime alle masse proteiche extracellulari presenti nella lamina propria. Dal punto di vista ultrastrutturale la Membrana Basale può essere distinta in tre zone (Lamina Lucida, Lamina Densa ed Area Sottobasale), alle quali corrispondono costituzione biochimica e ruoli funzionali differenti <sup>8</sup>. La vera struttura portante della MB è la Lamina Densa, costituita da proteine laminari. L'ultrastruttura ad essa sovrapposta (Lamina Lucida) è specializzata nell'assicurare la coerenza dell'epitelio vibrante, mentre quella ad essa sotto-

posta (Area Sottobasale) deve assolvere alla necessità di garantire l'ancoraggio con la lamina propria.

La Lamina Lucida offre appoggio alle cellule basali dell'epitelio squamoso ed è attraversata da strutture fibrillari, definite Filamenti d'Ancoraggio, essenzialmente costituite da collagene tipo IV, che «ancorano» gli emidesmosomi delle cellule epiteliali alla Lamina Densa. Da questa si distaccano le Fibre d'Ancoraggio, costituite da collagene tipo VII che agganciano, con veri e propri loops, tale struttura agli strati superficiali della lamina propria (Fig. 4).



**Fig. 4.**

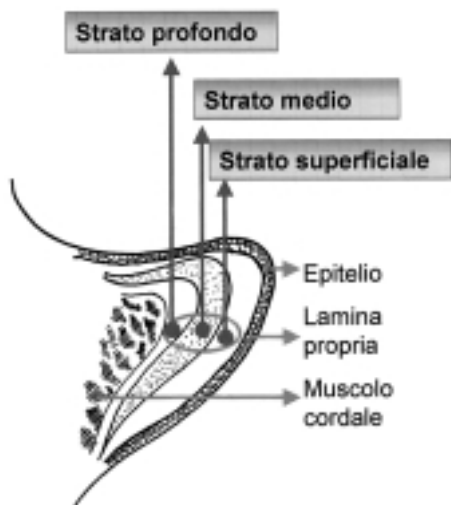
Costituenti della membrana basale cordale (Da Gray <sup>12</sup>, modificata).

Il numero delle Fibre d'Ancoraggio (densità di popolazione delle Fibre d'Ancoraggio) è geneticamente determinato. Normalmente vi sono 80-120 Fibre d'Ancoraggio per unità d'area di membrana basale <sup>9</sup>. Nei pazienti eterozigoti, per una variante recessiva del gene che codifica per queste proteine, la densità di popolazione scende a 40-60 fibre d'ancoraggio/unità. Negli omozigoti per il gene recessivo, le fibre d'ancoraggio sono invece completamente assenti, come si riscontra nell'epidermolisi bullosa <sup>36</sup>. La regolazione genica della densità di popolazione delle Fibre d'Ancoraggio apre suggestivi spunti interpretativi sulla predisposizione genetica ad alcune patologie delle corde vocali. Una bassa densità di popolazione di Fibre d'Ancoraggio potrebbe predisporre ad una maggiore suscettibilità alla formazione dei noduli cordali <sup>7</sup>.

## LAMINA PROPRIA

Le proprietà viscoelastiche della Lamina Propria (LP) della mucosa delle corde vocali umani sono essenziali per la vibrazione cordale e dipendono essenzialmente dalla sua matrice extracellulare.

La definizione delle caratteristiche morfo-funzionali della LP si deve fondamentalmente agli studi di Hirano. Quest'autore accoppiò le osservazioni istologiche sulla LP <sup>22 23</sup> alla «cover-body theory» della fonazione <sup>25</sup>. La LP delle corde vocali è



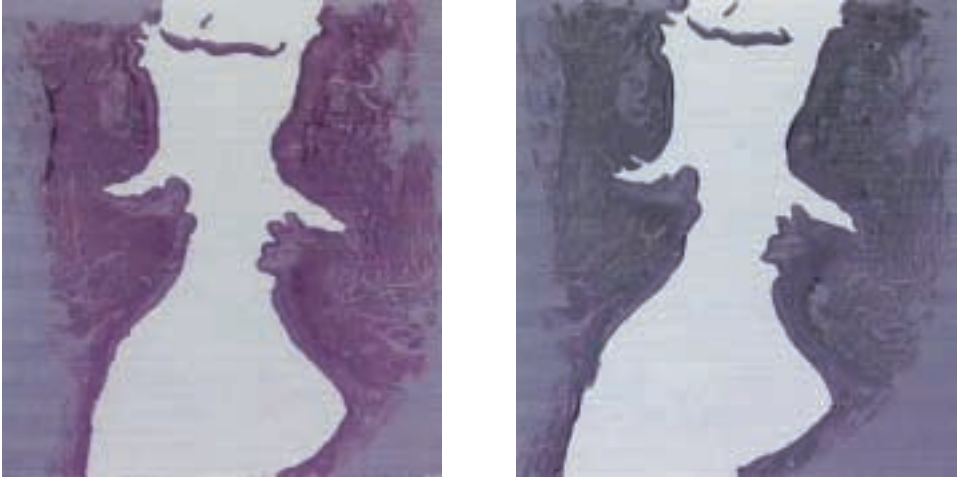
**Fig. 5.**  
I tre strati della lamina propria.

suddivisa in tre strati, secondo un criterio isto-morfologico basato sul diverso contenuto d'elastina e fibre collagene: strato Superficiale della Lamina Propria (SSLP), Strato Intermedio o Medio della Lamina Propria (SMLP) e Strato Profondo della Lamina Propria (SPLP) (Figg. 5, 6, 7).

Sezione sagittale di laringe comprendente corde vocali vere e false; con la colorazione per le fibre elastiche (Fig. 6) e reticolari (Fig. 7) si dimostra la ricchezza di tessuto connettivo ed elastico della sottomucosa, particolarmente nelle corde vocali vere.

Lo SSLP è un tessuto lasso, con poche fibre collagene ed elastiche. Lo SMLP ha un elevato contenuto di fibre elastiche, mentre nello SPLP prevalgono le fibre collagene. Lo SSLP definisce lo Spazio di Reinke (SR), mentre SMLP e SPLP nel loro insieme formano il Legamento Vocale. Questa suddivisione istologica della LP ben si accorda con la «cover-body theory» della fonazione, che prevede una porzione più superficiale di tessuti (cover) che scivoli, con ampia libertà di movimento in tutte le direzioni, rispetto ad un corpo (body) tissutale profondo e rigido. Si viene così a definire il substrato morfologico sul quale prende corpo l'onda mucosa. La cover delle corde vocali è costituita dall'insieme Epitelio-MB-SSLP, mentre il body è rappresentato dall'unità SPLP-Muscolo Vocale. Lo SMLP, dal punto di vista funzionale, si può considerare come uno strato di transizione. Nella cover-body theory viene individuata un'altra importante struttura: il legamento vocale, che risulta dall'unione tra SMLP e SPLP. Questo è costituito da fibre collagene ed elastiche con disposizione longitudinale, parallela alle fibre del muscolo vocale. Il ruolo funzionale di questa struttura è di distribuire uniformemente, tra i vari strati muscolari, la tensione derivante dalla contrazione muscolare e di garantire, nello stesso tempo, una stabilità geometrica del muscolo vocale durante la vibrazione fonatoria.

Secondo Hirano, si viene pertanto a delineare una struttura delle corde vocali a



**Figg. 6, 7.**

Sezione sagittale di laringe comprendente corde vocali vere e false; con la colorazione per le fibre elastiche (Fig. 6) e reticolari (Fig. 7) si dimostra la ricchezza di tessuto connettivo ed elastico della sottomucosa, particolarmente nelle corde vocali vere.

cinque strati istologici (epitelio, SSLP, SMLP, SPLM e Muscolo Vocale) e tre strati biomeccanici (cover, strato transizionale e body), con rispettivi coefficienti di rigidità di uno, otto e dieci. Tale organizzazione anatomo-strutturale non è però ugualmente rappresentata lungo tutta l'estensione delle corde vocali e nelle diverse età della vita<sup>24</sup>. La LP presenta, infatti, differenze strutturali topografiche nelle diverse sezioni delle corde vocali e va incontro a modificazioni morfologiche al variare dell'età.

Alle due estremità delle corde vocali la LP s'ispessisce e forma anteriormente la macula flava anteriore, sulla quale s'inserisce il tendine commisurale anteriore, e posteriormente la macula flava posteriore, connessa all'apofisi vocale. Queste due strutture funzionano come dissipatori della vibrazione cordale. Nel neonato non si riconoscono i tre strati della LP e non esistono le macule flave ed il legamento vocale. Questo comincia ad individualizzarsi tra il primo ed il quarto anno di vita, mentre la tristratificazione della LP si rende completamente evidente alla pubertà. Nell'anziano la LP perde il contenuto di fibre elastiche dello SMLP, mentre le fibre collagene s'ispessiscono e si disorganizzano<sup>28</sup>.

#### *Ultrastruttura e biochimica funzionali della LP*

Gli attuali studi sulla LP hanno spostato l'interesse dai dati istologici, desumibili dagli studi con microscopio ottico, a quelli ultrastrutturali, mediante microscopia elettronica, ed a quelli biochimici.

La LP è attualmente suddivisa secondo i suoi due componenti fondamentali: cellule della LP e Matrice Extra-Cellulare della LP<sup>12</sup>. Questa suddivisione non va intesa in senso netto, ma come l'una l'espressione dell'altra. Le attività metaboliche

delle cellule determineranno, infatti, le caratteristiche della matrice extra-cellulare. Queste condizioneranno, a loro volta, le proprietà dell'oscillazione cordale che, chiudendo il cerchio, andrà ad esercitare un'influenza sull'attività di sintesi cellulare. Harris <sup>21</sup> e Margolis <sup>30</sup> hanno stabilito che forze fisiche possono modificare l'espressione genica cellulare. Le differenti condizioni fisiche, alle quali sono sottoposte le cellule degli strati superficiali e profondi della LP possono, pertanto, esercitare una differente spinta differenziativa, determinando la sintesi di matrici extracellulari «strato-dipendenti».

#### *Cellule della Lamina Propria delle Corde Vocali*

Nella lamina propria sono presenti diversi tipi cellulari: fibroblasti, miofibroblasti, macrofagi ed altri cito-tipi, quali le cellule stellate. I fibroblasti sono le cellule che sintetizzano i costituenti della lamina propria, assicurando il turn-over della matrice extracellulare. Sono rappresentati in uguale misura in tutti gli strati della lamina propria. Hirano, Sato e Nakashima <sup>27</sup> hanno però individuato sottopopolazioni di fibroblasti, con diversa distribuzione topografica in ambito cordale e con varie specializzazioni funzionali. I fibroblasti presenti nelle macule flave hanno forma a stella e mostrano un'intensa attività di sintesi di fibre collagene ed elastiche. Nel bambino sono deputate alla costituzione del legamento vocale, mentre nell'adulto ne regolano il metabolismo. Sato <sup>34</sup> ha ulteriormente definito il ruolo di queste cellule della macula flava. Per la loro morfologia a stella, sono ora definite «cellule stellate delle corde vocali». Mostrano un'intensa sintesi di collagene (tipo III) e di fibre reticolari, nonché d'altri costituenti della matrice extracellulare: fibre elastiche e proteoglicani (acido ialuronico). Queste cellule presentano anche gocce lipidiche nel citoplasma, verosimilmente rappresentate da vitamina A. È perciò possibile che tali elementi cellulari rivestano un ruolo fondamentale nella definizione della matrice extracellulare della LP e perciò delle proprietà viscoelastiche dell'intera corda vocale.

I fibroblasti presenti nello SR hanno forma ovalare ed esibiscono una scarsa attività di sintesi proteica. Rappresentano il pool cellulare dal quale si differenziano i miofibroblasti, con finalità riparative.

I Macrofagi sono cellule della flogosi. Catten <sup>1</sup> ha descritto, in circa 1/3 delle corde vocali normali, una discreta concentrazione di macrofagi immediatamente al disotto della MB e negli strati superficiali dello SSLP. Tale osservazione dimostra l'esistenza di un modesto stato flogistico sottoepiteliale, a seguito di insulti infettivi, da inalazione o da microtraumi vocali.

I Miofibroblasti sono fibroblasti, che si sono differenziati in cellule con capacità riparative, nei confronti della matrice extra-cellulare <sup>5</sup>. La loro presenza è pressoché costante negli stessi strati superficiali dove si riscontrano i macrofagi. L'esistenza di queste due popolazioni cellulari da un lato dimostra un persistente stato flogistico sotto-epiteliale, dall'altro testimonia una spiccata capacità riparatrice tessutale, che consente la restitutio ad integrum anatomico-funzionale di microlesioni cordali, nell'arco di 36-48 ore.

### *Matrice extracellulare della Lamina Propria delle corde vocali*

Gli elementi della matrice extracellulare possono essere suddivisi secondo le loro caratteristiche istochimiche in: proteine fibrose (fibre collagene e fibre elastiche), proteine interstiziali (glicoproteine e glicosaminoglicani o proteoglicani) ed altre molecole interstiziali: carboidrati, lipidi <sup>11</sup>. Queste molecole sono definite «interstiziali» in quanto occupano gli spazi, gli «interstizi», tra le proteine fibrose <sup>32</sup>.

In maniera schematica, è possibile attribuire a ciascuno dei componenti della matrice extracellulare un preminente ruolo funzionale.

Le fibre collagene assicurano l'impalcatura strutturale delle corde vocali, alle quali conferiscono anche le proprietà di resistenza allo stiramento.

Le fibre elastiche conferiscono elasticità alle corde vocali. Questa definisce la capacità di un tessuto di poter subire una deformazione e di riacquistare la forma originale, una volta cessata la causa deformante (Fig. 8).

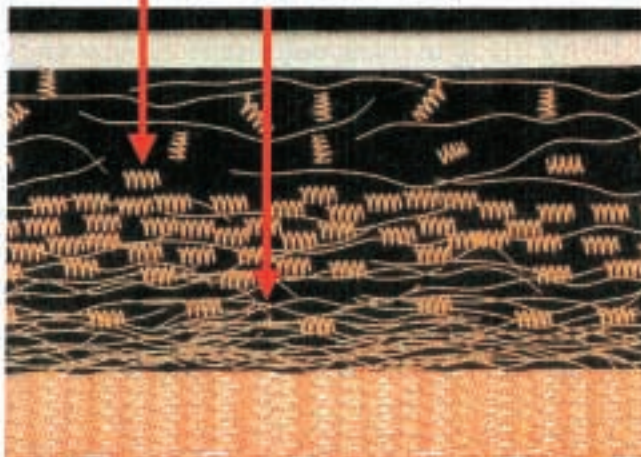
Le proteine interstiziali condizionano numerose caratteristiche delle corde vocali, quali la viscosità, il volume, il contenuto d'acqua, la dimensione e la densità delle fibre collagene.

### *Proteine Fibrose delle corde vocali*

Le proteine strutturali (collagene ed elastine) sono riconoscibili già istologicamente e sono, come già visto, alla base della classificazione di Hirano.

**Fibre elastiche**: funzione elastica, "a molla"

**Fibre collagene**: funzione tensile, "a fune"



**Fig. 8.**

Matrice extracellulare della lamina propria: proteine fibrose (da Gray <sup>11</sup>, modificata).

### *Collagene*

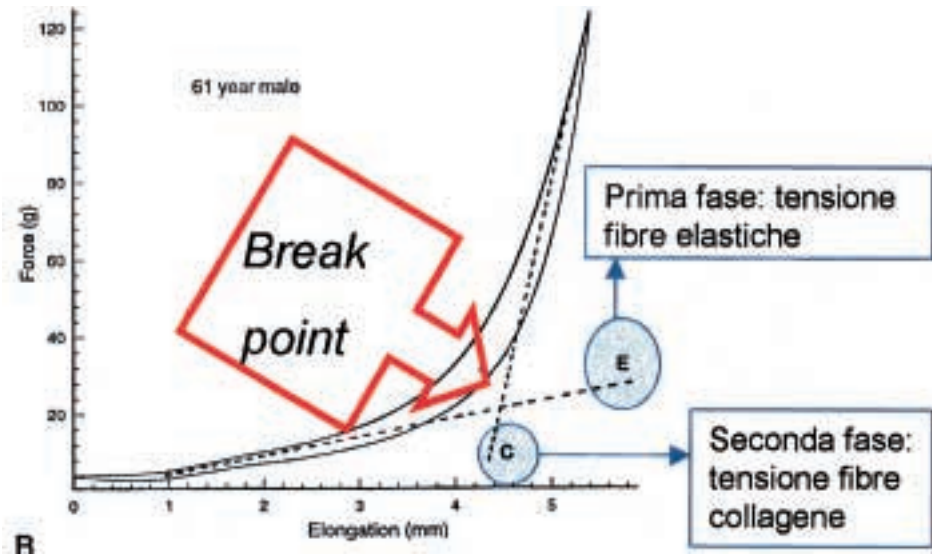
Il collagene presente nella LP è di tipo I, II e III <sup>8</sup>, mentre i tipi IV e VII sono localizzati nella MB <sup>7</sup>. Gli studi sulla distribuzione dei diversi tipi di collagene nella LP cordale normale sono ostacolati dal suo rapido deterioramento antigenico post-mortem. Le fibre collagene sono orientate in senso antero-posteriore, parallelamente ai fasci del muscolo cordale. Quest'orientamento spaziale ottimizza il loro ruolo funzionale, che è quello di resistere allo stiramento. Hammond <sup>19</sup> ha studiato le variazioni della distribuzione delle fibre collagene della LP in funzione dell'età e del sesso. In tutti i casi considerati si è confermata la prevalente localizzazione del collagene negli strati profondi della LP. Non sono emerse differenze statisticamente correlate all'età, mentre nella popolazione maschile il collagene è presente in quantità statisticamente superiore rispetto alle donne. Nelle corde vocali il collagene è presente anche sotto forma di fibre reticolari. Nel 1998 Sato <sup>33</sup> ha evidenziato l'importanza funzionale della struttura tridimensionale (3-D) delle fibre reticolari delle corde vocali. Queste sono costituite da sottili fibre collagene tipo III e formano un reticolo tridimensionale particolarmente evidente negli strati più superficiali della LP, a livello del margine libero delle corde vocali. Le fibre collagene reticolari sono molto sottili (40 nm) e formano una rete a larghe maglie nella quale sono disposte le fibre elastiche, le glicoproteine ed i proteoglicani. Rappresentano così un elemento chiave nella stabilità strutturale delle corde vocali e nella definizione delle loro proprietà viscoelastiche.

### *Elastine*

Nella LP l'elastina è presente secondo tre forme: elaunin, oxytalan e fibre d'elastina <sup>18</sup>. Solo quest'ultima forma si evidenzia con i coloranti per l'elastina usati per l'esame istologico. La Microscopia ottica comporta perciò una sottovalutazione del reale contenuto dell'elastina nella LP. Hammond et al. <sup>18</sup> hanno mostrato variazioni significative del contenuto di elastina con l'età, ma non con il sesso. Nel bambino vi è un contenuto d'elastina pari al 23% di quella che si riscontra nell'adulto, mentre nell'anziano si registra una vera e propria impennata, con una quantità dell'87% superiore a quella misurata nell'adulto. A tutte le età l'elastina si concentra prevalentemente nello SMLP, con il diametro delle singole fibre che aumenta proporzionalmente con l'età.

### *Ruolo biomeccanico delle proteine fibrose*

Dal punto di vista biomeccanico vi è un sinergismo d'azione tra le fibre collagene e le fibre elastiche. L'elastina, in vitro, può subire un allungamento fino a 5 volte rispetto alla dimensione originaria, senza subire alterazioni della sua elasticità. L'interazione con le fibre collagene limita queste proprietà elastiche, consentendo un ritorno elastico delle corde vocali solo per stiramenti fino al doppio della lunghezza originaria <sup>8</sup>. Le proprietà biomeccaniche che l'interazione tra le proteine fibrose conferiscono alle corde vocali sono ben evidenti nei diagrammi forza/tensione. Una forza applicata secondo il maggior asse di una corda vocale ne produce l'allungamento e genera una tensione secondo una risposta non lineare. La curva sforzo/tensione che si otterrà avrà un andamento bimodale. La prima fase della risposta



**Fig. 9.**

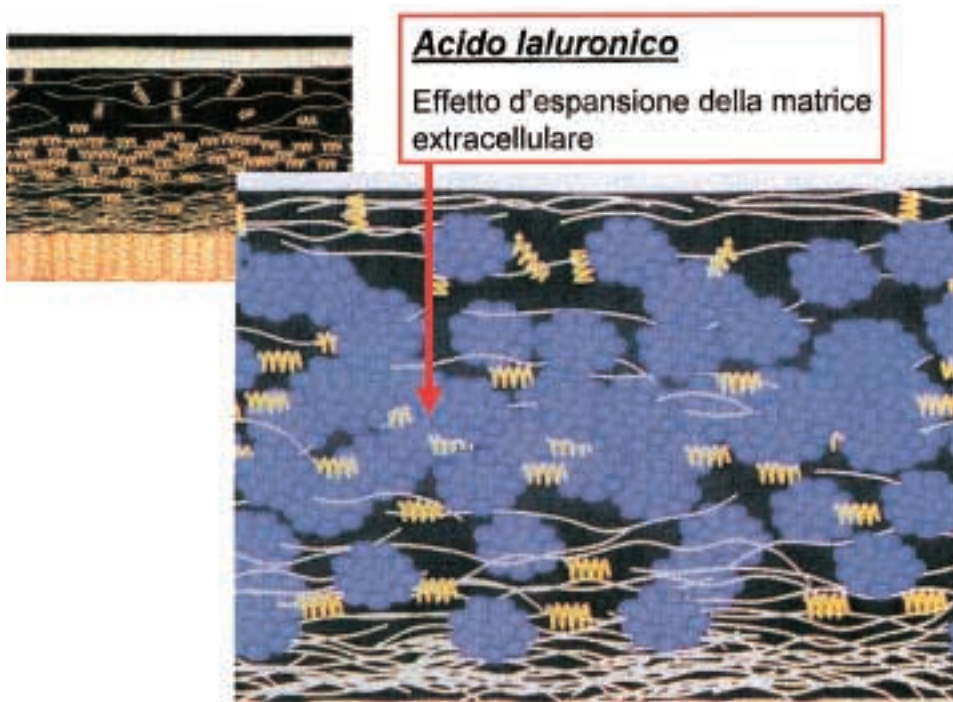
Curva sforzo/tensione del legamento cordale umano (da Gray <sup>13</sup>, modificata).

mostrerà un incremento lineare della tensione, quale espressione delle proprietà elastiche dell'elastina. Raggiunto un valore di tensione critico («break-point») si registrerà un'impennata della curva sforzo/tensione, dovuta alla marcata resistenza allo stiramento, propria delle fibre collagene (Fig. 9) <sup>13</sup>.

#### *Proteine interstiziali delle corde vocali*

Le proteine interstiziali comprendono i Proteoglicani e le Glicoproteine. I Proteoglicani (PG) presentano un core proteico che, mediante proteine «d'aggancio» (linkage proteins), si lega ad altri core proteici oppure a carboidrati o a lipidi. Tale conformazione molecolare conferisce ai PG numerose e peculiari proprietà biologiche. Queste, in parte, esprimono le attività biochimiche delle differenti catene legate al core proteico, in parte derivano dalla capacità di alcuni PG a formare enormi aggregati macromolecolari, a struttura ripetitiva, avvolti a spirale, molto idratati e con caratteristiche ideali per il riempimento di spazi tessutali e l'assorbimento di traumi meccanici. I PG possono essere distinti in due grandi gruppi: proteoglicani a grande catena (Aggregani, Versicani ed Acido Ialuronico) e proteoglicani a piccola catena (Decorina, Biglicano, Fibromodulina) <sup>29</sup>.

I proteoglicani a larga catena sono ampiamente diffusi nell'organismo, dove esercitano compiti d'alta specializzazione. Gli aggregani, principali costituenti delle cartilagini, assorbono traumi meccanici; l'acido ialuronico regola viscosità e movimento di fluidi (es. fluido sinoviale) e riempie spazi specializzati (es. umor vitreo). È perciò verosimile che tali macromolecole mostrino il loro ampio repertorio funzionale anche a livello delle corde vocali.



**Fig. 10.**  
Matrice extracellulare della lamina propria.  
Proteine Fibrose + Acido Ialuronico (da Gray <sup>11</sup>, modificata).

L'Acido Ialuronico (AI) rappresenta il PG a grande catena maggiormente rappresentato e funzionalmente più importante delle corde vocali. Ha un ruolo essenzialmente biomeccanico, legato alla disposizione tridimensionale delle sue macromolecole. L'AI cordale forma enormi aggregati macromolecolari, avvolti in larghe maglie, con conformazione porosa. All'interno dei pori dell'AI sono contenute le proteine fibrose, elastiche e collagene, con disposizione longitudinale ed addensate a formare strutture fascicolate, simil-legamentose (Fig. 10).

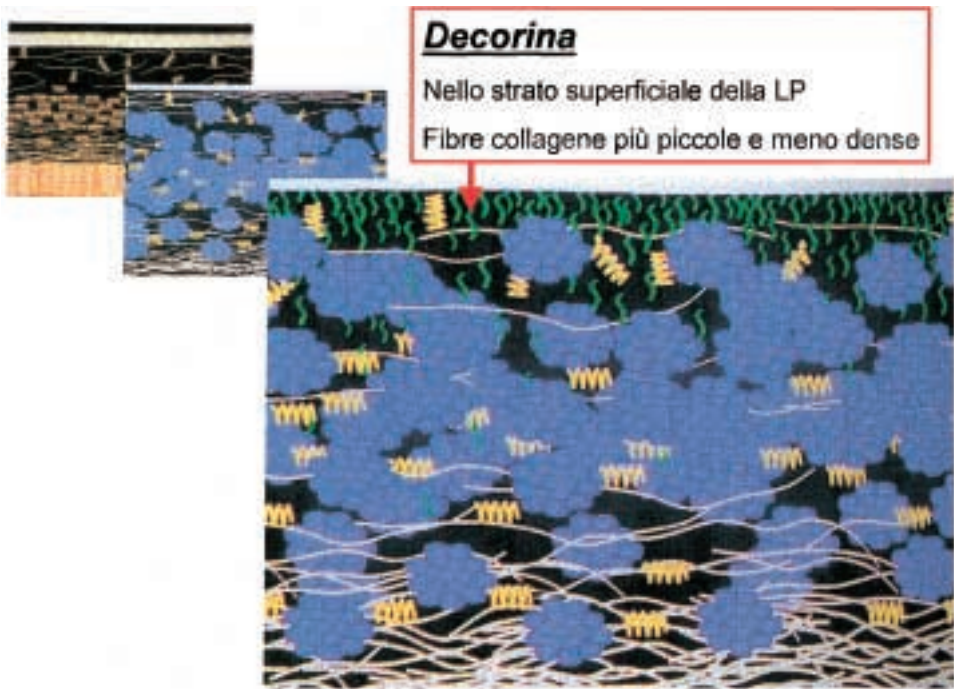
L'AI assume così caratteristiche ideali nell'ammortizzare il trauma vibratorio cordale ed è fondamentale nel determinare la massa e la viscosità delle corde vocali. Questo PG si concentra nello SMLP ed è massimamente rappresentato sulla faccia inferiore delle corde vocali (infracordale area). Hammond <sup>17</sup> ha condotto ricerche sulla distribuzione dell'AI nei due sessi, con risultati contrastanti. È, infatti, emerso che il contenuto cordale di AI nelle donne mediamente sia solo un terzo rispetto a quello dosabile negli uomini. Non vi è, tuttavia, una differenza statisticamente significativa di AI nei due sessi, poiché vi sono donne con quantità di AI cordale talmente elevato da influenzare i risultati statistici complessivi. L'importante ruolo

biomeccanico dell'AI della LP propria cordale è stato sperimentalmente verificato paragonando le proprietà reologiche di preparati di corde vocali dapprima con tutto il loro contenuto di AI e successivamente private di tale costituente, degradato enzimaticamente mediante una ialuronidasi testicolare bovina <sup>11 3</sup>.

Tra i PG a piccola catena della LP cordale, i più importanti sono la Decorina, il Biglicano e la Fibromodulina. Questi PG hanno un core proteico ricco in leucina, hanno dimensione molecolari modeste ed assumono disposizione spaziale compatta. Hanno la caratteristica comune di legarsi al collagene tipo I, in siti diversi secondo i vari PG, andando ad esercitare un'azione di regolazione sulle proprietà di assemblaggio delle fibre collagene.

La Decorina si localizza selettivamente nello SSLP (Fig. 11).

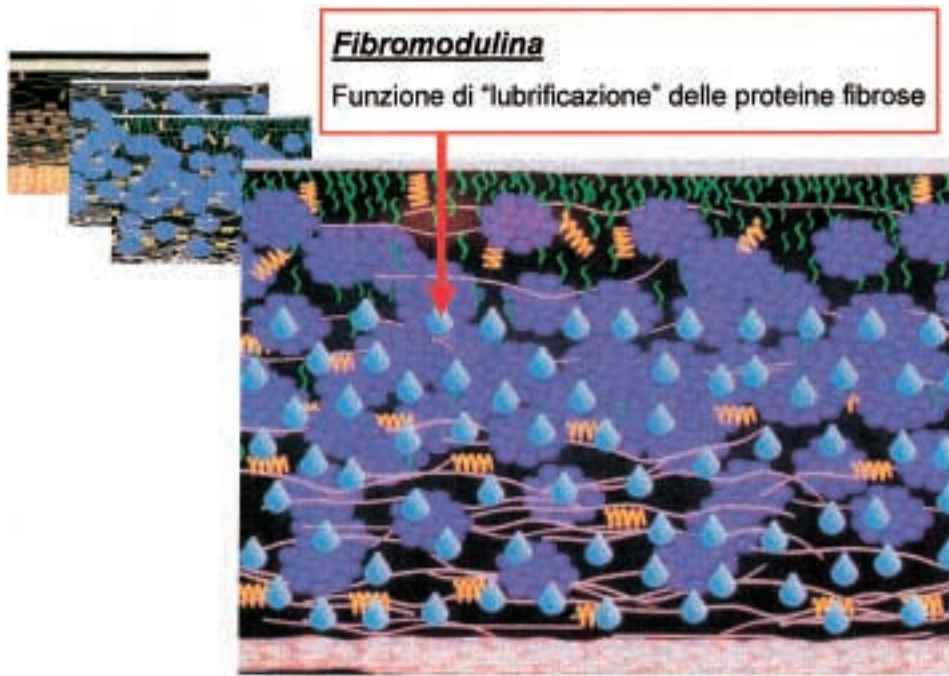
In presenza di questo PG le fibre collagene tendono ad essere più piccole e più sottili. Si è perciò ipotizzato che la scarsa densità di collagene in questo strato della LP sia da mettere in relazione proprio all'azione della Decorina. È inoltre possibile che questo PG svolga una funzione di regolazione su quei processi riparativi tissutali che si verificano pressoché costantemente in sede sotto-epiteliale. Diverse



**Fig. 11.**

Matrice extracellulare della lamina propria.

Proteine Fibrose + Acido Ialuronico + Decorina (da Gray <sup>11</sup>, modificata).

**Fig. 12.**

Matrice extracellulare della lamina propria.

Proteine Fibrose + Acido Ialuronico + Decorina + Fibromodulina (da Gray <sup>11</sup>, modificata).

evidenze sperimentali hanno, infatti, dimostrato che la Decorina previene l'evoluzione in fibrosi, a seguito dell'attivazione fibroblastica. È, pertanto, del tutto verosimile che la Decorina eserciti tale funzione anche nei confronti del trauma chirurgico, scongiurando l'evoluzione cicatriziale post-operatoria dello SSLP <sup>11</sup>.

Il Biglicano è un altro PG a piccola catena che ha un rapporto di proporzionalità inversa rispetto alla Decorina. La sua funzione è, infatti, diametralmente opposta, favorendo l'assemblaggio di grandi molecole di collagene. Si riscontra in elevate concentrazioni nelle cicatrici immature o ipertrofiche <sup>35</sup>. Per tale motivo, non sorprende come le locazioni elettive del Biglicano siano negli strati profondi della LP.

La Fibromodulina ha una costituzione biochimica simile alla Decorina, ma svolge un ruolo funzionale differente (Fig. 12).

La Fibromodulina si concentra nello SMLP e qui si associa intimamente alle proteine fibrose che formano il legamento vocale <sup>32</sup>. La funzione di questo PG è quella di «lubrificare» le fibre collagene ed elastiche del legamento vocale. Anche questo PG, similmente all'AI, ha elettiva concentrazione nell'infrafold area, zona critica nell'innesco della vibrazione cordale.

La Fibronectina rappresenta la più importante glicoproteine della LP delle corde vocali. È distribuita ubiquitariamente nei diversi strati della LP e sembra avere un ruolo nella coesione tra le proteine fibrillari e nei processi riparativi tissutali<sup>14</sup>. La Fibronectina è stata ritrovata in elevate concentrazioni nei noduli cordali<sup>4</sup>.

#### *Ruolo biomeccanico delle proteine interstiziali*

Per comprendere il ruolo biomeccanico delle proteine interstiziali bisogna introdurre due concetti di biofisica della fonazione. Si tratta dei concetti di «Soglia di pressione fonatoria» e di «Energia dissipata per la fonazione». Per Soglia di pressione fonatoria si intende quel valore di minima pressione sottoglottica necessario a produrre la vibrazione cordale. È una grandezza misurabile, espressa dall'equazione  $PdF = VDW/T$ , dove V esprime la velocità dell'onda mucosa, D è il coefficiente d'idratazione tissutale (proporzionale alla viscosità tissutale), W è l'ampiezza glottica pre-fonatoria e T è lo spessore delle corde vocali<sup>38</sup>. Questi fattori definiscono lo «sforzo» necessario affinché abbia inizio la fonazione. L'Energia dissipata per la fonazione misura, invece, la quantità di energia necessaria al mantenimento della vibrazione cordale. Anche in questo caso è una grandezza misurabile, definita dall'equazione  $E = (LT/D) \eta \omega^2 \xi^2$ , dove L, T e D sono rispettivamente lunghezza, spessore e profondità delle corde vocali,  $\eta$  è la viscosità tissutale,  $\omega$  è la frequenza angolare e  $\xi$  è l'ampiezza della vibrazione<sup>37</sup>. Ai fini della presente trattazione, occorre sottolineare l'importanza della viscosità cordale quale fattore determinante nel condizionare lo «sforzo» necessario sia per l'avvio della fonazione, sia per il mantenimento della stessa. La viscosità delle corde vocali varia, secondo una scala logaritmica, in funzione della frequenza di vibrazione. A 10 Hz la viscosità delle corde vocali si attesta a 1-3 Pa/s (pascal/sec), valore sovrapponibile a quello del grasso adomominale<sup>39</sup>. Gli studi del gruppo di Gray, dell'Università dello Utah, pubblicati nel 1999 hanno confermato il ruolo cardine dell'AI nell'ottimizzare la viscosità cordale<sup>11</sup>. Lo stesso gruppo di ricercatori, in un successivo studio del 2001<sup>3</sup>, ha meglio definito le proprietà reologiche cordali, ricorrendo a misurazioni più rigorose, secondo criteri dell'ingegneria reologica. Oltre alla viscosità ( $\eta$ ), è stato definito e misurato il modulo di scorrimento elastico ( $G'$ ). Questa grandezza condiziona l'elasticità tissutale ed è determinante nel controllo della frequenza fondamentale ( $F_0$ ). La digestione enzimatica dell'AI con ialuronidasi testicolare, comporta un aumento di circa il 70% della viscosità ed una riduzione del 35% del modulo di scorrimento elastico, rispetto alle condizioni di base. Il risultato è pertanto quello di una cover più rigida e molto meno «scorrevole». Questi dati rendono, inoltre, ragione dell'elettiva concentrazione dell'acido ialuronico nell'infrafold area. Questa corrisponde alla regione dove ha inizio l'onda mucosa (upheaval). L'AI si concentra, perciò, nella sede dove può esplicare nel modo migliore il suo effetto di facilitazione nella genesi dell'onda mucosa.

#### *Glicidi e Lipidi*

Nella matrice extracellulare della LP delle corde vocali sono presenti anche macromolecole di natura non proteica, quali carboidrati e lipidi. Il loro ruolo funzionale al momento non è però ben delineato, anche per la non antigenicità di tali so-

stanze che ne rende difficoltoso lo studio. Tale difficoltà metodologica non deve però portare a sottovalutarne il ruolo funzionale, che si ritiene importante soprattutto per i lipidi. Chan e Titze <sup>2</sup> hanno, infatti, dimostrato che il tessuto adiposo ha uguale viscosità rispetto alle corde vocali.

#### *Considerazioni conclusive sulla biomeccanica della LP*

La LP presenta struttura e funzioni complesse. Ciò non deve meravigliare, considerando la quantità di suoni generati da un «semplice paio» di corde vocali. Questa considerazione è ancora più evidente, considerando la varietà di forme e dimensioni degli strumenti musicali, necessaria perché essi producano suoni differenti <sup>26</sup>. L'eccezionale versatilità funzionale delle corde vocali è, in larga misura, legata alle proprietà biomeccaniche della matrice extra-cellulare della LP. Queste sono il risultato del doppio livello d'interazione che si stabilisce tra i suoi costituenti molecolari.

Il primo avviene tra gli elementi di una stessa famiglia molecolare: elastina e collagene, tra le proteine fibrose; AI, decorina/biglicano e fibromodulina, tra le proteine interstiziali.

Il secondo si stabilisce tra le due famiglie molecolari principali: quella delle proteine fibrose, responsabili della risposta tensile delle corde vocali, e quella delle proteine interstiziali, che invece determinano le proprietà di scorrimento visco-elastico cordale. Le proteine fibrose consentono un'enorme dinamica vocale, grazie alle loro proprietà di generare, con facilità e grande modulabilità, tensione cordale. Le proteine interstiziali promuovono, invece, un ottimo «rendimento fonatorio», con una minima dispersione d'energia grazie ad un'ottimale viscosità ed elasticità tissutale. Nella LP si costituisce, in definitiva, un mirabile esempio di compromesso funzionale tra due caratteristiche (rigidità e cedevolezza) tra loro opposte.

#### *Regolazione della matrice extracellulare*

La distribuzione e le percentuali relative delle proteine fibrose ed interstiziali sono regolate dai fibroblasti ed obbediscono a tre principali variabili: profondità dello strato della lamina propria, sesso ed età. Particolarmente importanti a tal proposito sono i lavori di Hammond, che mostrano come l'elastina sia condizionata dall'età e non dal sesso <sup>18</sup> e viceversa per le fibre collagene <sup>19</sup> e per l'acido ialuronico <sup>17</sup>. Si è supposto che le differenti sollecitazioni fisiche alle quali sono sottoposti i fibroblasti alle varie profondità degli strati della LP influenzino diverse espressioni geniche e pertanto le varie composizioni della matrice extracellulare.

I fibroblasti della matrice extracellulare esercitano un continuo controllo sulla composizione quali-quantitativa della matrice extracellulare (turn-over/regolazione della matrice extracellulare). Quest'attività di controllo si esercita mediante una modulazione dell'attività di specifici enzimi e dei loro inibitori tissutali. I fibroblasti producono tre principali enzimi, classificati come Metalloproteinasi, che si distinguono in: Collagenasi, che degrada il collagene tipo I e tipo III; Gelatinasi, che distrugge il collagene tipo VII e l'Elastasi, specifico per l'elastina. L'organismo, a sua volta, produce Inibitori Tissutali delle Metalloproteinasi (TIMPS) <sup>31</sup>. Il controllo della matrice extracellulare è, in definitiva, il risultato dell'interazione tra 3 variabi-

li: sintesi proteica, degradazione enzimatica ed inibizione enzimatica. Da studi condotti sugli animali si è reso evidente come queste attività risentano in misura differente dell'invecchiamento. Con l'età si ha una significativa riduzione della sintesi di collagene e delle rispettive collagenasi, mentre non varia la produzione delle rispettive TIMPS. Ciò significa una riduzione del turn-over e perciò la presenza di fibre collagene mediamente più «vecchie». A livello biochimico l'invecchiamento di una proteina di collagene si traduce nel fenomeno di «cross-linking». Questo consiste nella formazione di legami chimici tra parti della molecola, che normalmente ne sono sprovvisti. La conseguenza è una modificazione della struttura molecolare e pertanto delle sue caratteristiche meccaniche. In ultima analisi ciò si traduce in una ridotta elasticità dell'elastina ed in un aumento di rigidità del collagene <sup>11</sup>.

#### *Fisiologia cellulare delle corde vocali: implicazioni cliniche*

La fisiologia cellulare delle corde vocali ha due essenziali campi d'interesse clinico. Da un lato, consente l'interpretazione delle patologie cordali, dall'altro permette di esplorare possibili applicazioni delle conoscenze di fisiopatologia molecolare nel trattamento delle disfonie.

Sulla base delle attuali conoscenze della fisiologia cellulare delle corde vocali si è tentata un'interpretazione fisiopatologica relative alle tre principali patologie benigne delle corde vocali: noduli, polipi ed edema di Reinke. In tutte queste patologie l'alterazione cellulare riguarda gli strati più superficiali delle corde vocali. La patogenesi dei noduli cordali è ben definita. Rappresentano la conseguenza di un'eccessiva vibrazione cordale, localizzata all'interfaccia membrana basale/SSLP. A questo livello si verifica una disorganizzazione ultrastrutturale delle Fibre d'Ancoraggio, con aumento del collagene tipo IV e della Fibronectina. Queste modificazioni, verosimilmente, conseguono a ripetuti tentativi rigenerativi da parte dei meccanismi d'autoriparazione cordali, che però sono quantitativamente inadeguati all'entità della causa lesiva <sup>4 10</sup>.

Il secondo aspetto d'interesse clinico delle fisiologia cellulare delle corde vocali viene sviluppato indagando possibili applicazioni terapeutiche di costituenti della LP. In quest'ottica, sono stati condotti numerosi studi sull'utilizzo dell'AI come biomateriale, in vitro ed in vivo. Questi ultimi sono di maggior impatto clinico e si riferiscono all'impiego dell'AI per iniezioni intracordali. La finalità terapeutica di tale procedura è quella di restituire un'ottimale viscosità cordale ed un'adeguata onda mucosa alle corde vocali irrigidite da fibrosi cicatriziale. Hallen <sup>15</sup> ha iniettato AI nelle corde vocali di coniglio, constatandone il rapidissimo riassorbimento, nel giro di soli 3-5 giorni. Gli studi successivi sono stati ripetuti con AI modificato (Hylan B gel), con buoni risultati ad un anno dall'iniezione <sup>16</sup>. Devono ancora essere meglio chiarite le interazioni che si stabiliscono tra l'AI iniettato e gli altri costituenti della matrice extracellulare. Hallen ha documentato l'induzione della sintesi di collagene, alla presenza intracordale dell'AI. Recenti studi di Hertergard <sup>20</sup> riportano risultati incoraggianti per un possibile utilizzo clinico dell'AI modificato. L'Hylan B gel intracordale nel coniglio produce modificazioni tissutali, che però mantengono bassa la viscosità della LP.

## CONCLUSIONI

Lo studio della fisiologia cellulare delle corde vocali delinea una nuova dimensione per la comprensione della fisiopatologia della fonazione. È auspicabile un sempre maggior sviluppo di quest'area di ricerca in quanto le conoscenze che ne derivano non si limitano ad un ambito puramente speculativo, ma tendono a proporre applicazioni cliniche in campo riabilitativo, medico e chirurgico.

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Catten M, Gray SD, Hammond TH. *An analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria*. Otolaryngol Head Neck Surg 1998;118:663-9.
- <sup>2</sup> Chan RW, Gray SD, Titze IR. *Viscosities of injectible biomaterials in vocal fold augmentation surgery*. Laryngoscope 1998;108:725-31.
- <sup>3</sup> Chan RW, Gray SD, Titze IR. *The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics*. Otolaryngol Head Neck Surg 2001;124:607-14.
- <sup>4</sup> Courey MS, Shohet JA, Scott MA, Ossof RH. *Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1996;105:525-31.
- <sup>5</sup> Darby I, Skalli O, Gabbiani G. *Alpha-smooth muscle action is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing*. Lab Invest 1990;63:21-9.
- <sup>6</sup> Fukuda H, Kawaida M, Tatchara T. *A new concept of lubricating mechanism of the larynx*. In: Fujimura O, ed. *Vocal physiology: voice production, mechanisms of the larynx*. New York, NY: Raven Press 1988:83-92.
- <sup>7</sup> Gray SD. *Basement membrane zone injury in vocal fold nodules*. In: Gauffin J, Hammarberg B, eds. *Vocal fold physiology conference*. San Diego: Singular Publishing Group 1991:21-8.
- <sup>8</sup> Gray SD, Hirano M, Sato K. *Molecular and cellular structure of vocal fold tissue*. In: Titze IR, ed. *Vocal fold physiology: frontiers in basic science*. San Diego: Singular Publishing Group 1993:1-34.
- <sup>9</sup> Gray SD, Pignatari SN, Harding P. *Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone*. J Voice 1994;8:48-52.
- <sup>10</sup> Gray SD, Hammond EH, Hanson D. *Benign pathologic response of the larynx*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:8-13.
- <sup>11</sup> Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. *Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics*. Laryngoscope 1999;109:845-54.
- <sup>12</sup> Gray SD. *Cellular physiology of the vocal folds*. Otolaryngol Clin North Am 2000;33:679-97.
- <sup>13</sup> Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. *Biomechanical and histologic observation of vocal fold fibrous proteins*. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:77-85.
- <sup>14</sup> Grinnel F. *Fibronectin and wound healing*. J Biochem 1984;25:107-16.
- <sup>15</sup> Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. *Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency*. Laryngoscope 1998;108:393-7.
- <sup>16</sup> Hallen L, Johansson C, Laurent C. *Cross-linked hyaluronan (Hylan B Gel): a new injectable remedy for treatment of vocal fold insufficiency, an animal study*. Acta Otolaryngol (Stockh) 1999;119:107-11.
- <sup>17</sup> Hammond TH, Zhou R, Hammond E, 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;11:59-66.
- <sup>18</sup> Hammond TH, Gray SD, Butler JE, Zhou R, Hammond E. *A study of age and gender related elastin distribution changes in human vocal folds*. Otolaryngol Head Neck Surg 1998;119:314-22.
- <sup>19</sup> Hammond TH, Gray SD, Butler JE. *Age and gender-related collagen distribution in human vocal folds*. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:913-20.
- <sup>20</sup> Hertegard S, Laurent C, Borzacchiello S. *Viscoelastic properties of rabbits' vocal folds after augmentation*. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;123:P74-5.

- <sup>21</sup> Harris RC, Haralson MA, Badr KF. *Continuous stretch-relaxation in culture alters rat mesangial cell morphology, growth characteristics and metabolic activity*. Lab Invest 1992;66:548-54.
- <sup>22</sup> Hirano M. *Phonosurgery: basic and clinical investigations*. Otol Fukuoka 1975;21:239-42.
- <sup>23</sup> Hirano M. *Structure of the vocal fold in normal and disease states. Anatomical and physical study*. ASHA Rep 1981;11:11-30.
- <sup>24</sup> Hirano M, Kurita S, Nakashima T. *Growth, development and aging of human vocal folds*. In: Bless DM, Abbs JH, eds. *Vocal fold physiology*. San Diego: College Hill Press 1983:22-43.
- <sup>25</sup> Hirano M, Kakita Y. *Cover-body theory of vocal fold vibration*. In: Daniloff RG, ed. *Speech science*. San Diego: College Hill Press 1985:1-46.
- <sup>26</sup> Hirano M. *The Paul Moore lecture. Vocal mechanisms in singing: laryngological and phoniatric aspects*. J Voice 1988;2:51-69.
- <sup>27</sup> Hirano M, Sato K, Nakashima T. *Fibroblasts in human vocal fold mucosa*. Acta Otolaryngol (Stockh) 1999;119:271-6.
- <sup>28</sup> Lacau St Guily J, Roubeau B. *Voies nerveuses et physiologie de la phonation*. Encycl Med Chir Oto-rhino-laryngologie, 20-632-A-10. Paris: Editions techniques 1994.
- <sup>29</sup> Lander AD. *Proteoglycans*. In: Kreis T, Vale R, eds. *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*. New York: Oxford University Press 1993:12-6.
- <sup>30</sup> Margolis LB. *Induction of cell processes by local force*. J Cell Sci 1991;98:369-73.
- <sup>31</sup> Murphy G, Docherty AJP. *The matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:120-5.
- <sup>32</sup> Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gry SD. *Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1996;105:6-11.
- <sup>33</sup> Sato K. *Reticular fibers in the vocal fold mucosa*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1998;107:1023-8.
- <sup>34</sup> Sato K, Hirano M, Nakashima T. *Stellate cells in the human vocal fold*. Ann Otol Laryngol 2001;110:319-25.
- <sup>35</sup> Scott PG, Dodd CM, Terdget EE, Gharhary A, Rathemtulla F. *Immunohistochemical localization of the proteoglycans decorin, biglycan and versican and transforming growth factor-beta in human post burn hypertrophic mature scars*. Histopathology 1995;26:523-31.
- <sup>36</sup> Tidman MJ, Eady RAJ. *Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermal-epidermal junction in dystrophic epidermolysis bullosa by a quantitative ultrastructural technique*. J Invest Dermatol 1985;84:374-7.
- <sup>37</sup> Titze IR. *Heat generation of the vocal fold and possible effect on vocal endurance*. In: Lawrence V, ed. *Transcripts of the 10<sup>th</sup> symposium care of the professional voice*. Philadelphia: Voice Foundation 1982:52-9.
- <sup>38</sup> Titze IR. *The physics of small amplitude oscillation of the vocal folds*. J Acoust Soc Am 1988;83:1536-52.
- <sup>39</sup> Zhu WB, Mow VC. *Viscometric properties of proteoglycan solutions at physiologic concentrations*. In: Mow VC, Ratcliffe A, Woo S, eds. *Biomechanics of diarthrodial joints*. New York: Springer-Verlag 1990:313-44.