



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**IDROGEL INIETTABILI PER IL TRATTAMENTO DELLE  
CICATRICI ALLE CORDE VOCALI**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureando: Stefano Mingoni**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 21/11/2023**



## Indice

Abstract.....	5
Introduzione.....	7
Capitolo 1: Struttura anatomica del tratto vocale.....	9
1.1 La laringe.....	9
1.1.1 Localizzazione e sezioni della laringe.....	10
1.1.2 Cartilagini della laringe.....	10
1.1.3 Muscolatura della laringe.....	12
1.1.4 Vascolarizzazione e innervazione della laringe.....	13
1.2 Anatomia delle corde vocali.....	13
1.3 Istologia delle corde vocali.....	15
1.3.1 Epitelio cordale.....	15
1.3.2 Membrana basale.....	16
1.3.3 Lamina propria.....	17
Capitolo 2: Le cicatrici cordali: primi studi sui biomateriali iniettabili.....	19
2.1 Eziopatogenesi e diagnosi delle cicatrici cordali (laringostroboscopia).....	19
2.2 Trattamento delle cicatrici cordali.....	20
2.2.1 Trattamento logopedico delle cicatrici cordali.....	20
2.2.2 Trattamento chirurgico delle cicatrici cordali.....	21
2.3 Primi biomateriali per il trattamento chirurgico delle cicatrici cordali.....	21
2.4 Risultati sperimentali.....	22
Capitolo 3: Idrogel per il trattamento e la prevenzione delle cicatrici cordali.....	25
3.1 Gli idrogel.....	25
3.2 Idrogel acellulare a base di matrice extracellulare di corde vocali.....	26
3.2.1 Preparazione del gel acellulare a partire da laringi bovine.....	26
3.2.2 Studio in vivo sugli animali e analisi laringoiatrica.....	27
3.2.3 Risultati delle analisi sulle laringi bovine.....	28
3.2.4 Risultati delle analisi immuno-istologiche delle laringi prelevate dai	

conigli.....	29
3.2.5 Risultati di imaging ad alta velocità e videochimografia.....	31
3.2.6 Conclusioni della ricerca sul VF-ECM hydrogel.....	32
3.3 Idrogel ibrido per la prevenzione della formazione di cicatrici vocali.....	32
3.3.1 Preparazione e struttura dell'HA-PUS hydrogel.....	34
3.3.2 Analisi di biocompatibilità e biodegradabilità in vitro e in vivo.....	35
3.3.3 Analisi microscopica delle corde vocali trattate con HA-PUS hydrogel...37	
3.3.4 Analisi immuno-istologica delle corde vocali.....	39
3.3.5 Conclusioni della ricerca sull'HA-PUS hydrogel.....	40
Conclusioni.....	41
Fonti bibliografiche.....	43
Fonti sitografiche.....	45

## **Abstract**

Le cicatrici cordali sono una delle principali cause della disfonia a lungo termine e sono ancora un problema per la laringoiatria e per la fonochirurgia moderna, i cui interventi possono spesso esserne la causa. In presenza di cicatrici cordali, le corde vocali lavorano asimmetricamente e sono sottoposte a tensioni maggiori rispetto a quelle fisiologiche. Il problema è risolvibile tramite metodi della laringologia classica, come l'iniezione di grasso autologo o collagene, ma a volte questi metodi possono risultare fallimentari per via dell'elevato tasso di biorisorbibilità dei materiali iniettati. Per far fronte a queste problematiche, l'ingegneria tissutale si è adoperata nella produzione di idrogel per la cura di corde vocali danneggiate, evitandone la cicatrizzazione.

Nel presente elaborato si riportano due di questi idrogel: uno di origine biologica, ottenuto dalla solubilizzazione della matrice extracellulare delle corde vocali bovine (VF-ECM), l'altro di origine artificiale, sintetizzato a partire da un'emulsione di poliuretano e da una soluzione di acido ialuronico ossidato (HA-PUS). Entrambi gli idrogel hanno dimostrato ottima biocompatibilità, causando una risposta immunitaria contenuta almeno su modello animale. Inoltre, i depositi collagenici nel sito dell'iniezione presentano un volume nettamente inferiore rispetto a quello che presenterebbero presso una cicatrice cordale completamente formata. Le stesse corde vocali, inoltre, hanno dimostrato un'ottima meccanica e una buona capacità di fonare durante le prove fonomeccaniche e le prove di imaging ad alta velocità.

Tutte queste caratteristiche rendono i due idrogel biomateriali promettenti per la medicina rigenerativa applicata alla cura senza cicatrici delle corde vocali.



## **Introduzione**

In genere, si indica con il termine di cicatrice un tipo di tessuto fibroso che si forma tramite la proliferazione delle cellule del derma in seguito ad una lesione o ad un trauma a livello di un epitelio. Nella cute esse servono sia per bloccare l'eventuale emorragia, che può derivare da una ferita, sia per isolare l'ambiente interno da patogeni e da sostanze nocive.

Tuttavia, se le cicatrici si formano a livello dell'epitelio cordale, ovvero l'epitelio di rivestimento delle corde vocali (o pieghe vocali), possono rivelarsi causa di disfonia a lungo termine. Le cicatrici cordali si formano in seguito a traumi di natura laringologica, tra cui lo stress vocale o un uso improprio della voce da parte di persone che usano la voce come strumento nel loro lavoro, come cantanti, insegnanti, oratori.

Le cicatrici cordali si sono rivelate negli anni uno dei principali problemi della laringoiatria e della fonochirurgia, in quanto la loro formazione può anche essere di natura iatrogena, ovvero derivante dalle stesse procedure fonochirurgiche. Fra le cause della loro formazione si trovano le terapie di disturbi vocali come l'edema di Reinke, il sulcus glottidis e la leucoplachia, oppure l'asportazione di polipi vocali e di cisti epidermoidi che possono formarsi sulle corde vocali. Anche l'intubazione, procedura usata in ambiti non laringoiatrici, può creare un trauma alle pieghe vocali, risultando la causa della formazione di cicatrici.

Le cicatrici, essendo in discontinuità morfologica con i tessuti circostanti e possedendo percentuali diverse di fibre di collagene e fibre elastiche, creano uno scompenso nella biomeccanica della struttura delle corde vocali e della laringe stessa. Questo scompenso genera una disfonia e porta il soggetto che ne soffre a correggere spontaneamente e in maniera erronea questo disturbo vocale, rischiando di peggiorare la situazione a livello vocale. Se il disturbo peggiora, la disfonia può persistere per un lungo periodo di tempo.

La cura delle cicatrici cordali spesso inizia con un percorso di terapia logopedica, in cui vengono insegnate al paziente delle tecniche per evitare comportamenti sbagliati a livello vocale come l'ipercinesia delle false corde, che può portare le corde vocali ad uno stress eccessivo.

Nei casi di cicatrici cordali particolarmente sviluppate, si tenta il loro riassorbimento tramite l'iniezione di materiali biologici, come cellule adipose autologhe o collagene bovino. I biomateriali della laringologia iniettiva classica presentano però una elevata bioriassorbibilità e possono risultare controproducenti per il riassorbimento delle cicatrici, in quanto scompaiono troppo in fretta dal sito dell'iniezione.

Un biomateriale iniettabile ideale per la cura e per la prevenzione delle cicatrici cordali, dovrebbe essere in grado di mimare l'ambiente microscopico della lamina propria, la più importante struttura connettivale dell'epitelio cordale, che conferisce loro forma e funzionalità. La maggior parte dei biomateriali iniettabili (naturali o sintetici) non possiedono lo stesso livello di complessità, né la specificità tissutale della lamina propria. Negli ultimi anni però sono stati sviluppati degli idrogel per la cura e per la prevenzione delle cicatrici cordali in seguito a traumi vocali.

Nel presente elaborato, dopo un'introduzione sull'anatomia di laringe e corde vocali e dopo aver spiegato l'eziopatogenesi delle cicatrici cordali, verranno esposti due di questi biomateriali: uno di origine biologica, ottenuto a partire dalla matrice extracellulare delle corde vocali bovine (VF-ECM hydrogel), e uno di origine sintetica, ottenuto a partire da soluzioni di acido ialuronico ossidato e di poliuretano sintetico (HA-PUS hydrogel).

Entrambi gli idrogel sono stati testati in vivo su conigli White New Zealand, tramite la loro iniezione nel sito di un trauma vocale provocato chirurgicamente. Un altro gruppo di conigli è stato usato come controllo iniettando soluzione fisiologica. Dopo un certo periodo dall'iniezione, gli animali di entrambi i gruppi sono stati sacrificati e le laringi sono state prelevate per essere sottoposte ad analisi meccanica e immuno-istologica. Il confronto fra le diverse analisi, è stato utile per lo studio delle proprietà di questi idrogel, come la loro biocompatibilità, e degli effetti che questi hanno sulla lesione, dalla deposizione di fibre di collagene al miglioramento della biomeccanica cordale.



## Capitolo 1: Struttura anatomica del tratto vocale

Negli esseri umani e, in generale, in tutto il mondo animale, il tratto vocale (o condotto vocale) è la cavità nella quale il suono viene filtrato dopo essere stato prodotto dalla sorgente sonora. Può essere diviso in cinque regioni: la laringe, la faringe, il palato duro (da cui diparte posteriormente il velo palatino, costituito dal cosiddetto palato molle e dall'ugola), la cresta alveolare e le labbra<sup>[1]</sup>.

Si stima che la lunghezza media del tratto vocale sia di 16.9 cm nei maschi adulti e di 14.1 cm nelle femmine adulte. Quando il velo palatino si rilascia e ostruisce l'accesso alle fosse nasali, il canale del tratto vocale si dice gutturo-boccale (attraversa gola e bocca). Se invece il velo palatino si abbassa, impedendo la respirazione della bocca, il canale si dice gutturo-nasale (attraversa gola e naso)<sup>[2]</sup>.

Nel tratto vocale dell'uomo la sorgente sonora si riconosce nella laringe, sede delle corde vocali.

### 1.1 La laringe

La laringe è un organo della gola di forma tubulare in cui sono situate le corde vocali e regola il passaggio dell'aria dentro e fuori la trachea. Rappresenta l'ultimo tratto delle vie aeree superiori ed è un complesso di cartilagini tenute insieme da una serie di legamenti, membrane e muscoli. Compresa tra la III e la VI vertebra cervicale (Figura 1.1), la laringe può essere suddivisa in tre sezioni: a partire dalla sezione superiore si trovano sopraglottide, glottide e sottoglottide.

La laringe è coinvolta nella fonazione, nella respirazione e nel meccanismo che impedisce al cibo di imboccare la via della trachea e quindi di ostruire le vie respiratorie.

Quest'organo può essere al centro di svariate condizioni di rilevanza medica, tra cui la laringite (infiammazione della laringe e delle corde vocali), il laringospasmo (contrazione involontaria/incontrollata dei muscoli laringei, seguita da un restringimento o chiusura della glottide e/o delle corde vocali) o il tumore alla gola. Essa è anche, più banalmente, il bersaglio di tutti i disturbi influenzali, o comunque di origine virale, quali raucedine, mal di gola, tosse secca e irritante.



Figura 1.1: localizzazione della laringe

### *1.1.1 Localizzazione e sezioni della laringe*

La laringe è posizionata nella gola, sotto la faringe, davanti all'esofago e sopra la trachea, con la quale comunica; è un organo interno del compartimento antero-superiore del collo. Esternamente, è individuabile alla stessa altezza del pomo d'Adamo, la sporgenza anteriore del collo, più prominente nell'uomo che nella donna.

Come già detto, può essere suddivisa in tre sezioni:

- **sopraglottide**: è la sezione superiore della laringe. Situata al confine con l'orofaringe (suddivisione della faringe a stretto contatto con la cavità orale), si estende dall'epiglottide, o cartilagine faringea, alle **pieghe vestibolari** (conosciute più comunemente come false corde vocali);
- **glottide**: è la sezione intermedia della laringe. È la sede delle corde vocali, nonché la via di passaggio che regola l'entrata o l'uscita dell'aria attraverso la trachea;
- **sottoglottide**: è la sezione inferiore della laringe. Si estende dalla parte inferiore della glottide al bordo inferiore della cartilagine laringea, nota come cartilagine cricoide, da dove si mette in comunicazione con la trachea.

### *1.1.2 Cartilagini della laringe*

La laringe è formata da due gruppi di cartilagini: il gruppo delle **cartilagini impari** (o cartilagini singole) e le **cartilagini pari**, denominate così in quanto si presentano a coppie nella struttura della laringe (Figura 1.2).

Il tessuto connettivo che costituisce queste strutture è denominato **cartilagine ialina**, una cartilagine la cui matrice extracellulare è costituita da una moderata quantità di fibre di collagene incluse in una sostanza fondamentale molto compatta, per molti aspetti simile a quella dei tessuti connettivi propriamente detti. La componente organica di questa sostanza

fondamentale consiste per il 30-40% di proteoglicani uniti a lunghe molecole di acido ialuronico e in misura minore di glicoproteine adesive, lipidi e glicoproteine [3].

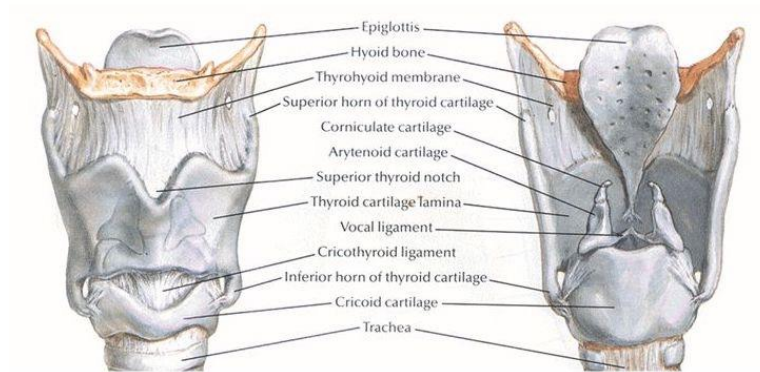


Figura 1.2: vista anteriore e posteriore dei complessi cartilaginei della laringe

Tra le cartilagini impari si annoverano:

- l'**epiglottide**, una cartilagine elastica di forma simile a un cucchiaio, che prende posto sulla sopraglottide. Chiude l'ingresso della laringe durante la deglutizione, in modo da evitare che il cibo vada ad occupare e quindi ad ostruire le vie respiratorie. In normali condizioni, l'epiglottide assume una posizione tale per cui l'aria è libera di entrare e uscire dalla laringe.
- La **cartilagine tiroidea**, disposta sulla porzione anteriore della laringe, è la struttura cartilaginea che forma il cosiddetto pomo d'Adamo. Sulla cartilagine tiroidea si inserisce uno dei due terminali del **legamento tiroideo laterale** che unisce la laringe all'**osso ioide**, osso impari a forma di ferro di cavallo utile alla fonazione e unico osso dell'intero scheletro che non si articola con nessun altro osso, ma resta in posizione grazie a diverse formazioni muscolari.
- La **cartilagine cricoide** è un anello cartilagineo che forma la porzione inferiore della laringe. È il punto di collegamento tra laringe e trachea ed è collegata alla cartilagine tiroidea per mezzo del legamento cricotiroideo.

Tra le cartilagini pari della laringe si trovano invece:

- le **cartilagini aritenoidi**, di forma piramidale, sono situate a cavallo tra la glottide e la sopraglottide. Sono le più importanti cartilagini pari della laringe: da esse dipende l'inserzione delle corde vocali nella laringe e il movimento di queste ultime.

- Le **cartilagini corniculate** sono cartilagini particolarmente elastiche simili a piccoli corni, situate al di sopra delle cartilagini aritenoidi.
- Le **cartilagini cuneiformi** sono dotate di buona elasticità e risiedono davanti alle cartilagini corniculate.

Tutta la struttura cartilaginea è tenuta assieme da due gruppi di legamenti e membrane fibro-connettivali: il gruppo dei legamenti e delle membrane **estrinseci** e il gruppo dei legamenti e delle membrane **intrinseci**.

Tra i legamenti e le membrane estrinseci rientrano tutti i legamenti e le membrane aventi un'estremità attaccata alla laringe e un'estremità agganciata ad una struttura anatomica diversa dalla laringe. I legamenti e le membrane intrinseci, invece, presentano entrambe le estremità collegate alla laringe e deputati a mantenere unite le varie cartilagini.

### 1.1.3 Muscolatura della laringe

Come per i legamenti, anche i muscoli della laringe si dividono in estrinseci e in intrinseci, con la stessa definizione. I muscoli intrinseci della laringe servono soprattutto per la respirazione e, in particolare, per la fonazione (Figura 1.3).

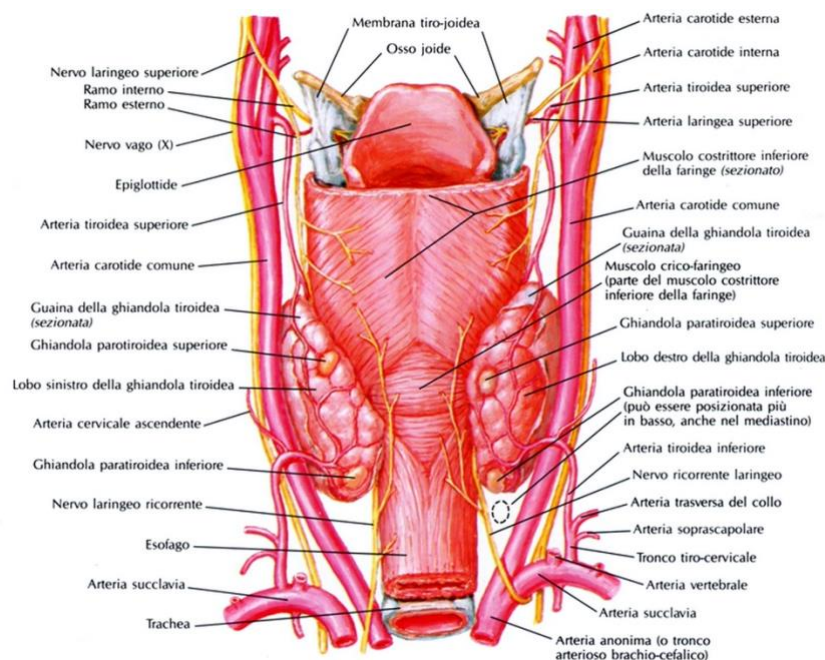


Figura 1.3: vista anteriore di muscolatura, innervazione e vascolarizzazione arteriosa della laringe

Tra questi si citano:

- il **muscolo cricotiroide** deputato a tendere e ad allungare le corde vocali;

- il **muscolo cricoaritenoido posteriore** che abduce e ruota esternamente le cartilagini aritenoidi, in modo da abdure le corde vocali e aprire la rima della glottide;
- il **muscolo cricoaritenoido laterale** che abduce e ruota internamente le cartilagini aritenoidi, in maniera da abdure le corde vocali e chiudere la rima della glottide;
- il **muscolo aritenoido trasverso** che abduce le cartilagini aritenoidi, in modo da favorire la chiusura della glottide;
- i **muscoli aritenoidi obliqui** deputati a ridurre la distanza tra le cartilagini aritenoidi, che induce la chiusura della glottide;
- i **muscoli tiroaritenoidi** deputati al rilassamento delle corde vocali, che produce a sua volta l'abbassamento del tono della voce.

#### *1.1.4 Vascolarizzazione e innervazione della laringe*

Il flusso di sangue ossigenato alla laringe proviene dall'**arteria laringea superiore**, branca dell'arteria tiroidea superiore, a sua volta branca dell'arteria carotide esterna, e dall'**arteria laringea inferiore**, branca dell'arteria tiroidea inferiore, che deriva dal tronco tireocervicale.

Il sangue povero di ossigeno, invece, viene drenato dalla laringe tramite la **vena laringea superiore** e la **vena laringea inferiore**.

A occuparsi infine dell'innervazione sensitiva e motoria della laringe sono due branche del **nervo vago**, conosciute come **nervo laringeo ricorrente** e **nervo laringeo superiore**. Il primo provvede all'innervazione sensitiva della sottoglottide e controlla tutti i muscoli intrinseci della laringe, fatta eccezione per il muscolo cricotiroide, mentre il secondo provvede all'innervazione sensitiva della glottide e della sopraglottide e controlla il muscolo cricotiroide.

## **1.2 Anatomia delle corde vocali**

Situate a livello della glottide, sovrastate dalle pieghe vestibolari (o false corde vocali), le corde vocali sono particolari formazioni anatomiche che, grazie alla loro meccanica vibratoria, permettono la fonazione, ossia l'emissione di suoni dalla bocca. Sono attaccate posteriormente alle cartilagini aritenoidi e anteriormente alla cartilagine tiroidea. Hanno una forma triangolare piatta (Figura 1.4).

Le corde vocali sono costituite da epitelio, ma contengono anche fibre muscolari. Esse delimitano uno spazio variabile chiamato **rima della glottide**, la via di transito dell'aria per la trachea.

Le corde vocali sono scarsamente vascolarizzate (avascolari) ed è per ciò che presentano una colorazione biancastra (Figura 1.5).

Le dimensioni della piega vocale dipendono dal sesso del soggetto. Le voci dei maschi adulti sono solitamente più basse a causa delle pieghe più lunghe e più spesse. Le corde vocali maschili hanno infatti una lunghezza compresa tra 1,75 cm e 2,50 cm, mentre le corde vocali femminili hanno una lunghezza compresa tra 1,25 cm e 1,75 cm <sup>[4]</sup>, che permette alle femmine di avere una fonazione più acuta.

L'apertura e la chiusura delle corde vocali quando si respira o quando le si fa vibrare per parlare o per cantare sono controllate dal **nervo vago**<sup>[S1]</sup>.

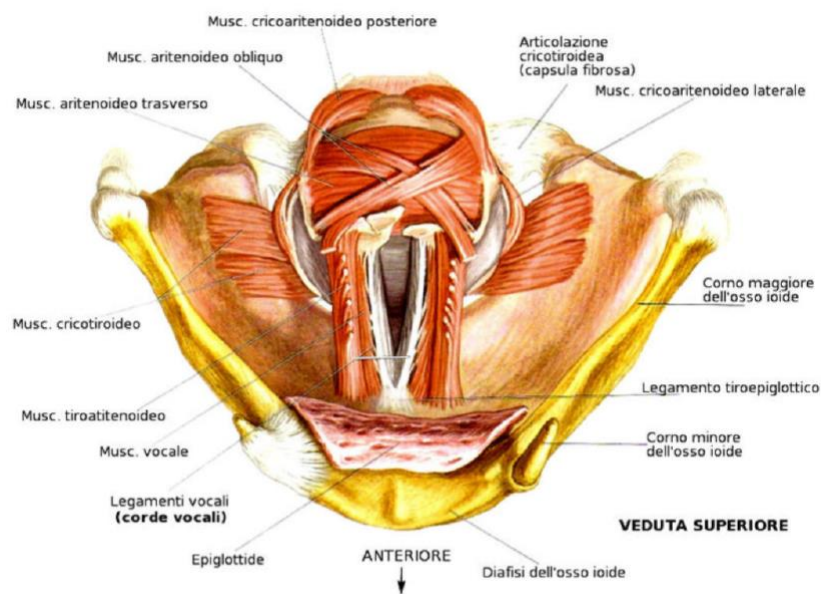


Figura 1.4: vista superiore schematica delle corde vocali



Figura 1.5: fotografia delle corde vocali ottenuta tramite sonda nasale

### 1.3 Istologia delle corde vocali

Le corde vocali hanno una struttura istologica complessa. In esse sono 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, della lamina propria e della lamina basale, che fa da interfaccia fra i due tessuti. Per spiegare meglio i concetti che si presenteranno nei prossimi capitoli, si analizza ciò che si può trovare a partire dalla superficie delle corde vocali fino al tessuto più profondo.

#### 1.3.1 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 nell'attacco anteriore delle corde vocali, più efficace nella gestione della Clearance Muco-Ciliare (CMC), ovvero il meccanismo di auto-pulizia delle vie respiratorie e, in generale, dell'intero sistema respiratorio [5].

Le cellule dell'epitelio stratificato delle corde vocali hanno necessità fisiologiche diverse rispetto a quelle dell'epidermide: devono resistere ad intense sollecitazioni vibratorie e devono essere ottimizzate per un ambiente mucoso. Per rispondere a tali esigenze, il tessuto epiteliale cordale è privo di uno strato corneo superficiale, ovvero quello strato presente in vari epiteli, tra cui l'epidermide, costituito da 20-30 lamine cellulari, ognuna di esse composta da cellule morte. Questo epitelio si mantiene metabolicamente attivo anche nei piani più superficiali, sino alla sua desquamazione nel lume aereo. Gli elementi cellulari mostrano inoltre un citoscheletro particolarmente sviluppato, con un efficace sistema di desmosomi, che garantisce aderenza e coerenza tra le cellule anche sotto forti sollecitazioni vibratorie.

Gli studi di microscopia elettronica hanno evidenziato anche la presenza di microcreste sulla superficie di rivestimento dell'epitelio squamoso, presente già nelle cellule di ricambio, immediatamente sottostanti a quelle in via di desquamazione [6]. Queste, prima di staccarsi definitivamente, presentano una fase di fluttuazione, nella quale rimangono legate alle cellule più giovani sottostanti mediante ponti che si distaccano dalla sommità delle creste di queste ultime. Il significato di queste microcreste è ancora sotto ipotesi: potrebbero servire per la maggiore aderenza del muco o per il maggior assorbimento dell'acqua mediante l'aumento dell'area di interfaccia.

La superficie frastagliata delle corde vocali ha la funzione di aumentare la trazione del flusso aereo fonatorio sulle corde vocali, ottimizzandone così la vibrazione (Figura 1.6). In Figura 1.7 è riportata una schematizzazione dell'epitelio esterno delle corde vocali.

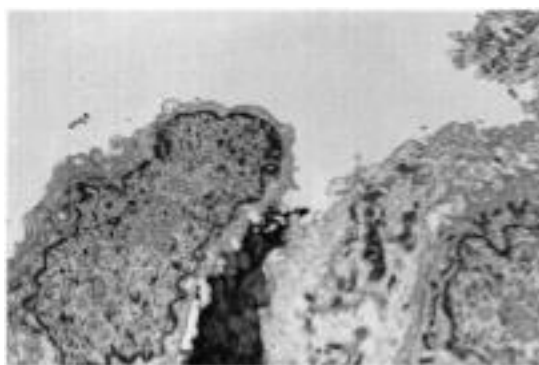


Figura 1.6: epitelio superficiale frastagliato delle corde vocali

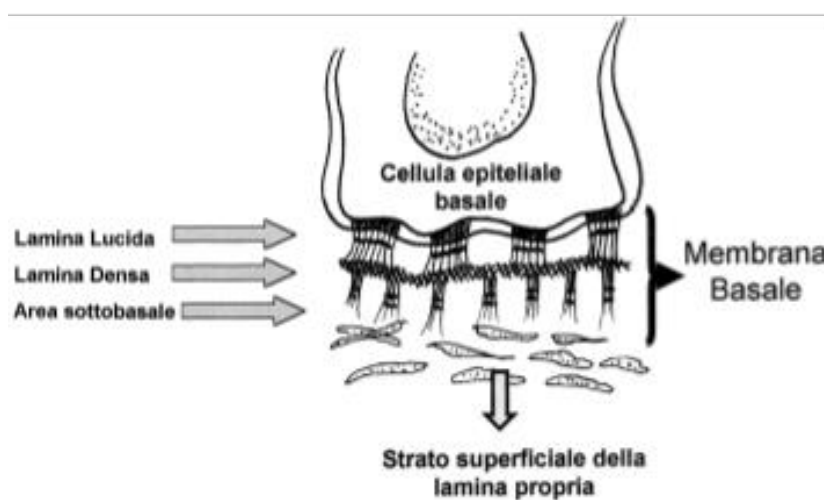


Figura 1.7: Struttura istologica completa dell'epitelio delle corde vocali

### 1.3.2 Membrana basale

La membrana basale è una struttura di interfaccia tra lo strato epiteliale esterno e la lamina propria sottostante (Figura 1.8). Essa rappresenta il supporto su cui poggiano le cellule epiteliali, fornisce protezione al sottostante tessuto connettivo e regola lo scambio di molecole e macromolecole tra il connettivo e l'epitelio <sup>[3]</sup>. Può essere divisa a sua volta in altre tre parti: la **lamina lucida** (in superficie), specializzata nell'assicurare la coerenza dell'epitelio vibrante con filamenti di ancoraggio, essenzialmente composti da collagene di tipo IV; la **lamina densa**, la vera struttura portante della membrana basale costituita da proteine laminari, e l'**area sottobasale**, che garantisce l'ancoraggio con la lamina propria.



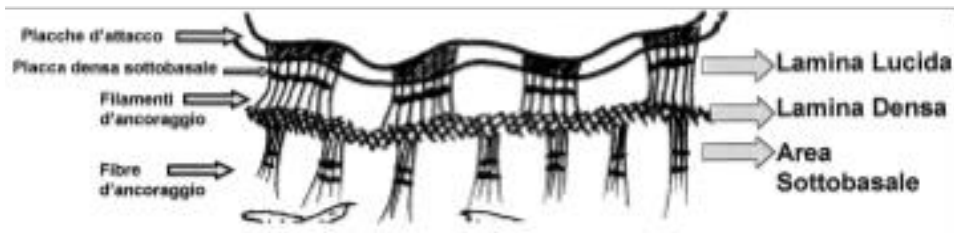


Figura 1.8: struttura della membrana basale

### 1.3.3 Lamina propria

Le proprietà viscoelastiche della lamina propria (LP) della mucosa delle corde vocali umane sono essenziali per la vibrazione cordale e dipendono sostanzialmente dalla sua matrice extracellulare. Anche la lamina propria è divisa in tre sottostrati: lo Strato Superficiale della Lamina Propria (SSLP), tessuto lasso con poche fibre di collagene ed elastiche, lo Strato Medio (o intermedio) della Lamina Propria (SMLP), ad elevato contenuto di fibre elastiche, e lo Strato Profondo della Lamina Propria (SPLP), dove prevalgono le fibre collageniche.

La forma dello strato superficiale della lamina propria definisce la forma dello **spazio di Reinke** (posto a destra dello strato più esterno dell'epitelio nella Figura 1.9), ovvero lo spazio virtuale posto fra le due corde vocali dove avviene la fonazione (se queste sono chiuse) o il passaggio dell'aria.

La copertura protettiva delle corde vocali è data dall'insieme di epitelio squamoso, membrana basale e SSLP. Dall'unione di SMLP e SPLP nasce invece il **legamento vocale**, costituito da fibre di collagene e fibre elastiche con disposizione longitudinale, parallele alle fibre del **muscolo vocale** (o **muscolo cordale**, in Figura 1.4 e 1.9), sito più in profondità. Il ruolo funzionale e biomeccanico di questa struttura è distribuire uniformemente, tra i vari strati muscolari, la tensione derivante dalla contrazione muscolare e, allo stesso tempo, di garantire una stabilità geometrica del muscolo vocale durante la vibrazione fonatoria [7].

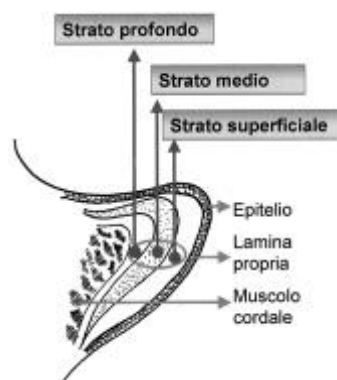


Figura 1.9: struttura istologica completa della piega vocale



## Capitolo 2: Le cicatrici cordali: primi studi sui biomateriali iniettabili

Le cicatrici cordali rappresentano uno dei problemi più complessi che un laringologo possa affrontare. Si tratta di lesioni cordali benigne acquisite che si localizzano presso la lamina propria, provocando una perdita di elasticità della corda vocale e una compromissione della sua biomeccanica ondulatoria. L'alterazione morfologica impedisce la normale vibrazione del margine libero della corda vocale causando una chiusura non completa della rima glottica con conseguente disfonia.



Figura 2.1: cicatrice iatrogena della corda vocale sinistra (a destra nell'immagine) dopo un intervento di stripping per il trattamento dell'edema di Reinke

### 2.1 Eziopatogenesi e diagnosi delle cicatrici cordali (laringostroboscopia)

Tra gli elementi che si possono rilevare dall'anamnesi di un paziente con disfonia da cicatrici cordali, vi possono essere traumi laringei con sanguinamento del piano glottico, terapie radianti su collo e laringe, intubazione prolungata [8].

Sicuramente gli aspetti più comuni sono costituiti dagli esiti di intervento chirurgico laringeo (Figura 2.1): una delle situazioni più frequenti è l'esito di uno "stripping" della mucosa (separazione meccanica delle membrane) per il trattamento dell'edema di Reinke, lesione benigna che si presenta quasi costantemente con un'evidente iperemia per la quale le corde si presentano molto più voluminose del normale e con un profilo non rettilineo, ma ricurvo, riducendo così lo spazio respiratorio [S2]. Nelle circostanze descritte, gli esiti cicatriziali sono causati dalla presenza di ampie zone di legamento vocale non ricoperte dalla mucosa, o, peggio ancora, dall'asportazione di una sua parte in seguito ad un trauma.

Le cicatrici cordali prendono spesso il nome di **cicatrici cordali iatrogene**, termine che sta ad indicare una loro comparsa in seguito ad una terapia.

La valutazione che meglio permette un'analisi approfondita delle alterazioni morfo-dinamiche delle corde vocali è la **videolaringostroboscopia**. Essa consiste in un'endoscopia laringea che utilizza una particolare sorgente luminosa, in grado di produrre l'**effetto stroboscopico**. Questo si basa sull'illusione ottica dovuta alla risoluzione temporale dell'apparato visivo umano: secondo la legge di Talbot, ogni impressione luminosa che colpisce la retina lascia su di essa un'immagine positiva della durata di 0,2 secondi. Una serie di immagini singole, presentate ad intervalli inferiori a 0,2 secondi, appare quindi come un'immagine continua. Movimenti vibratorii o rotatori che si susseguono con rapidità tale da non poter essere percepiti dall'occhio umano, possono essere resi visibili illuminando a rapidi tratti le singole fasi di vibrazione e facendo in modo che la durata dei lampi sia inferiore alla durata del periodo di vibrazione. Se le frequenze coincidono, l'oggetto appare ai nostri occhi come fermo, in quanto viene illuminata sempre la stessa fase vibratoria. Se la frequenza dei lampi non coincide esattamente con la frequenza di vibrazione (scopo della strumentazione stroboscopica), ad ogni passaggio non viene illuminata sempre la stessa posizione, bensì quella immediatamente adiacente, rendendo il movimento delle corde vocali molto lento durante la visualizzazione del video, composto da singole fasi di periodi successivi, che producono un effetto ottico di continuità se prese nel loro insieme. Praticamente, la stroboscopia fornisce un'immagine illusoria, che si compone di piccoli frammenti del ciclo vibratorio reale, mentre l'oggetto in esame rimane per la maggior parte del tempo al buio <sup>[9]</sup> ed è caratterizzato da un movimento molto più veloce di quello registrato.

La videolaringostroboscopia permette di individuare la presenza di anomalie vibratorie cordali non visibili in laringoscopia diretta: lo studio in "slow-motion" del movimento cordale individua i segmenti adinamici delle corde vocali, che creano un'asimmetria durante la vibrazione o la chiusura delle corde vocali <sup>[7]</sup>.

## **2.2 Trattamento delle cicatrici cordali**

Le cicatrici cordali possono essere trattate con guarigione a lungo termine tramite trattamenti logopedici, ma questi sono sempre più spesso rimpiazzati con iniezioni chirurgiche nei casi più gravi.

### *2.2.1 Trattamento logopedico delle cicatrici cordali*

La **terapia logopedica** è considerata come il punto iniziale del trattamento, prima di procedere eventualmente ad un intervento chirurgico. Il trattamento logopedico serve soprattutto per inibire un'abitudine sbagliata acquisita in seguito alla disfonia, ovvero un'**ipercinesia delle**

**false corde** per compensare in parte il difetto fonatorio. L'ipercinesia delle false corde vocali si registra quando un soggetto disfonico produce una fonazione distorta rispetto a quella normale, dovuta però alla vibrazione delle pieghe vestibolari (messe in contatto per effetto di una riduzione della sezione del canale fonatorio in seguito alla contrazione volontaria non controllata dei muscoli laringei). In realtà, questo pseudo-compenso peggiora ulteriormente la qualità della voce e lo stato di salute delle corde vocali, per cui è necessaria l'applicazione di tecniche logopediche per il rilassamento muscolare.

### 2.2.2 *Trattamento chirurgico delle cicatrici cordali*

Le opzioni del **trattamento chirurgico** delle cicatrici cordali possono consistere in un **aumento volumetrico** della corda vocale, sede della cicatrice, oppure nella **ricostituzione di una certa funzionalità della lamina propria**. Nella maggior parte dei casi le due tecniche vengono associate. Il più semplice fra i metodi chirurgici vede l'**iniezione intracordale di grasso autologo**, quindi di adipociti (Figura 2.2) autologhi provenienti dall'organismo del paziente stesso, **o collagene** (Figura 2.3), proteina fibrosa strutturale presente nella matrice extracellulare di tutti i tessuti connettivi dell'organismo.

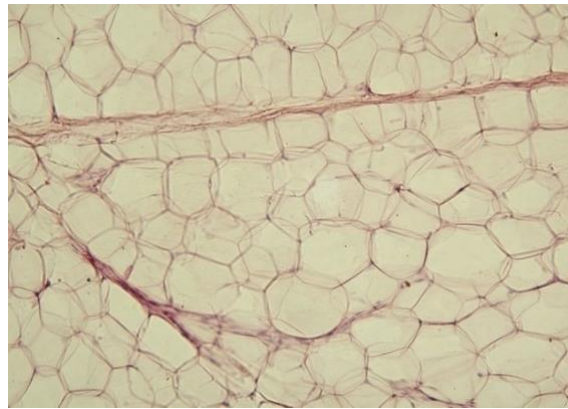


Figura 2.2: immagine microscopica di tessuto adiposo formato dagli adipociti (o lipociti), cellule caratterizzate da un citoplasma occupato quasi completamente da un vacuolo centrale (goccia lipidica) contenente molecole lipidiche e dagli organelli comuni agli altri tipi di cellule ammassati in una zona periferica.

## 2.3 **Primi biomateriali per il trattamento chirurgico delle cicatrici cordali**

L'iniezione di steroidi e corticosteroidi non ha mostrato di produrre risultati utili a lungo termine, anzi, raramente si hanno significative modificazioni della cicatrice cordale.

L'iniezione di **collagene bovino**, largamente impiegata negli ultimi anni del secolo scorso, mostra risultati più incoraggianti, ma risente di alcuni svantaggi: il materiale presenta un

**notevole riassorbimento** (40-60%), di conseguenza l'iniezione doveva essere continuamente ripetuta <sup>[10]</sup>. Studi più recenti di biomeccanica sui materiali utilizzabili per il trattamento dell'insufficienza glottica, specificatamente nel caso delle cicatrici cordali, hanno evidenziato incoraggianti risultati ottenuti con collagene a bassa densità, materiale assimilabile allo strato superficiale della lamina propria <sup>[7]</sup>.

Lo stesso problema dell'iniezione di collagene bovino si presenta con l'iniezione di **grasso autologo**, in particolare se l'iniezione avviene in sede di una corda vocale mobile, come nel caso preso in esame (la corda vocale non mobile si ha, per esempio, in casi di trattamento laringoplastico iniettivo di un'emiparesi vocale). Ciò è dovuto ad un "massaggio continuo" che si verifica nella corda mobile, che favorisce il riassorbimento dei materiali impiantati riassorbibili e la dislocazione dei materiali impiantati non riassorbibili. L'iniezione intracordale di grasso autologo deve essere effettuata "**in eccesso**" iniettando una quantità doppia del materiale necessario alla correzione dell'insufficienza glottica, prevedendo un riassorbimento a distanza di alcuni mesi di circa il 30-50% del materiale iniettato. Questa eccessiva iniezione è una soluzione al problema del veloce riassorbimento. Infatti, a distanza di quattro mesi dall'impianto intracordale di grasso autologo, si può considerare che il tessuto adiposo presente nella sede dell'impianto resti in quantità stabile nel tempo per la creazione di nuovi adipociti. Il vantaggio del grasso autologo, rispetto ad altri materiali riassorbibili, è dovuto alla presenza di cellule staminali contenute nel tessuto adiposo, soprattutto quando quest'ultimo viene centrifugato <sup>[11]</sup>. La riserva di cellule staminali sta nella frazione vascolare del tessuto adiposo che, nonostante la lisi delle cellule causata dalla centrifugazione, appare ben preservata.

#### **2.4 Risultati sperimentali**

Negli anni di sperimentazione delle procedure chirurgiche per il trattamento delle cicatrici cordali tramite l'iniezione di collagene bovino e di grasso autologo (1998-2000) sono state operate 38 cicatrici cordali iatrogene in 29 pazienti sottoposti ad una procedura chirurgica (Tabella 2.1).

<b>Intervento precedente</b>	<b>Casi</b>
Asportazione di polipi alle corde vocali	8
Edema di Reinke	14
Sulcus glottidis	9
Cisti epidermoide	2
Leucoplachia	5

Tabella 2.1: casi chirurgici relativi ai pazienti del campione sperimentale prima della comparsa delle cicatrici cordali nel periodo di sperimentazione 1998-2000. Tra questi l'asportazione di polipi e la cura dell'edema di Reinke (cfr. paragrafo 2.1); asportazione di cisti epidermoidi, formatesi nello strato più esterno della corda vocale e che possono rendere vani i trattamenti logopedici; la cura del sulcus glottidis, invaginazione della mucosa cordale nello spazio di Reinke sino al legamento vocale <sup>[S3]</sup>; cura della leucoplachia, lesione che si manifesta con la formazione di una placca bianca causata da un eccessivo accumulo di cheratina sull'epitelio cordale <sup>[S4]</sup>.

La valutazione della voce veniva effettuata il giorno prima dell'intervento e sei mesi dopo. Il protocollo di valutazione prevedeva la videolaringostroboscopia (in cui venivano particolarmente prese in considerazione la fase di chiusura delle corde e l'onda mucosa), la valutazione percettiva della voce, l'analisi acustica dalla quale veniva rilevata la presenza di rumore nello spettrogramma vocale e l'autovalutazione del paziente stesso sulla fatica fonatoria, rapportata alla situazione preoperatoria <sup>[7]</sup>.

La **videolaringostroboscopia a 6 mesi dall'intervento** ha evidenziato una fase di chiusura più completa. Si è avuta la ricomparsa dell'onda mucosa in 35 casi, mentre in 3 casi si è avuto un peggioramento dovuto all'eccessivo riassorbimento del collagene iniettato e alla comparsa di una marcata "disfonia da conversione", una disfonia psicogena conseguente da un malessere emozionale generale che interferisce con il normale controllo volontario della fonazione. È sostanzialmente caratterizzata dall'improvvisa scomparsa della sonorità vocale, dalla involontaria comparsa di voce molto "soffiata" o bisbigliata o da voce afona alternata da voce pressata e iperacuta. La disfonia da conversione è più frequente in soggetti nella seconda infanzia e di sesso femminile <sup>[S5]</sup>.

La **valutazione percettiva della voce** ha individuato un miglioramento del grado globale della disfonia in 23 pazienti, un risultato invariato in 4 casi e un peggioramento in 2 casi.

L'**analisi acustica** tramite il fonografo ha visto una riduzione del rumore in 25 pazienti, nessun cambiamento in 3 casi e un aumento del rumore in 1 caso.

L'**autovalutazione da parte del paziente** sulla qualità della voce e sulla fatica fonatoria ha visto un miglioramento in 27 casi, nessun cambiamento in 1 caso e un peggioramento in altri 1 caso <sup>[7]</sup>.

I risultati sperimentali del trattamento chirurgico con l'iniezione di collagene bovino o di grasso autologo hanno fornito quindi risultati incoraggianti, sia dal punto di vista della qualità della voce che dal punto di vista della biomeccanica delle pieghe vocali e della ricomparsa dell'onda mucosa.



## Capitolo 3: idrogel per il trattamento e la prevenzione delle cicatrici cordali

Nel capitolo precedente sono stati affrontati gli studi sui primi biomateriali iniettabili utilizzati per il trattamento delle cicatrici cordali iatrogene, ovvero il collagene bovino e il grasso autologo. In questo capitolo si illustreranno le ricerche condotte negli ultimi anni su due tipi di idrogel, uno di origine biologica e uno di origine artificiale, e sulla loro capacità di risolvere, almeno in maniera parziale, il problema delle cicatrici cordali: il primo utile per curare le cicatrici, il secondo per prevenirle.

Si parte dal presupposto che, per essere efficace per il trattamento previsto, un qualsiasi biomateriale iniettabile dovrebbe riprodurre al meglio i meccanismi fisiologici e meccanici del microsistema della lamina propria vocale. Al momento, nessun biomateriale riesce a riprodurre i meccanismi: come già specificato, gli interventi più classici hanno limitazioni dovute all'elevato tasso di riassorbimento del biomateriale o ad una seconda comparsa delle cicatrici vocali in seguito a interventi chirurgici.

### 3.1 Gli idrogel

Un **idrogel** (o idrogelo) è un colloide, miscela in cui le particelle finemente disperse hanno dimensioni comprese fra i nanometri e i micron. Esso è un materiale **bioriassorbibile** costituito da **catene polimeriche disperse in acqua**, il cui contenuto può superare il 99% [S6]. Gli idrogel si possono creare a partire da composti naturali (tra cui varie molecole polisaccaridiche) e da composti artificiali (p. es., siliconi, poliacrilammide). Le molecole disperse sono caratterizzate dalla presenza di numerosi gruppi idrofilici, quindi gruppi chimici che instaurano un buon legame intermolecolare con le molecole d'acqua, con le quali interagiscono.

Negli ultimi anni gli idrogel sono stati al centro di molti studi di bioingegneria. Presentano infatti un'**ottima biocompatibilità** e sono spesso usati come supporto per la crescita e la proliferazione cellulare in ingegneria tissutale e come costituenti delle protesi al seno e di preparati farmaceutici per la cura di lesioni cutanee. Dagli anni Sessanta, sono stati utilizzati anche per fabbricare le prime lenti a contatto morbide.

Per ciò che concerne la laringoiatria, negli ultimi anni gli idrogel si sono rivelati utili per il trattamento delle cicatrici cordali.

### 3.2 Idrogel acellulare a base di matrice extracellulare di corde vocali

Una ricerca su un gel acellulare tessuto-specifico per il trattamento delle cicatrici cordali è stata effettuata nel 2019 all'University of Texas Southwestern Medical Centre a Dallas, a partire dall'analisi della laringe bovina. Per creare il gel acellulare si è deciso di utilizzare come precursore il **tessuto laringeo bovino**, per via della grande somiglianza tra il collagene di tipo 1 umano e bovino, per la grandezza delle corde vocali bovine e per l'immediata disponibilità di queste, oltre che per il loro basso costo. Tutto ciò ha reso possibile la creazione di una sufficiente quantità di biomateriale ingegnerizzato per queste ricerche.

#### 3.2.1 Preparazione del gel acellulare a partire da laringi bovine

Sei laringi bovine sono state recise immediatamente dopo la morte degli animali. La parte interessata del tratto laringeo, che andrà a costituire poi il campione, è costituita dall'epitelio cordale e dalla lamina propria, isolati tramite strumenti microchirurgici. Ogni campione è stato successivamente fatto analizzare da laringologi, in modo da riconoscere gli eventuali tessuti danneggiati o non sani.

In seguito, i campioni sono stati sottoposti a **decellularizzazione** tramite un approccio osmotico capace di rimuovere la totalità dei nuclei cellulari e il 99% del DNA dalle cellule. Sequenzialmente, essi sono stati inizialmente fissati ad un supporto plastico per simulare la tensione locale che avrebbero sperimentato in condizioni fisiologiche e sono stati poi incubati in soluzione di cloruro di sodio 3M, in soluzione salina tampone con enzimi DNAsi e RNAsi; infine, sono stati esposti ad una soluzione di etanolo concentrato al 75% <sup>[12]</sup>. Successivamente, sono stati refrigerati per una notte e sterilizzati per lo studio in vivo.

Per trasformare il tessuto bovino decellularizzato in un idrogel è stata utilizzata la **pepsina** per mediare la solubilizzazione della matrice extracellulare (ECM) e della piega vocale decellularizzata: 5mg di ECM polverizzata sono stati quindi immersi in 0,5 ml 0,04N di soluzione di acido cloridrico (HCl) con una concentrazione di pepsina dello 0,1% e mantenuti in agitazione meccanica per circa 24 ore; una volta **solubilizzata l'ECM**, è stato aggiunto idrossido di sodio (NaOH) per tamponare la soluzione e portarla al pH neutro <sup>[12]</sup>. È stato ottenuto così l'idrogel desiderato.

In seguito alla trasformazione in idrogel, sono stati effettuati saggi in laboratorio per la quantificazione dei glicosamminoglicani (GAG) delle proteine totali presenti sul gel.

### 3.2.2 Studio in vivo sugli animali e analisi laringoiatrica

Prima di effettuare lo studio sugli animali, è stata testata l'iniezione del gel nelle corde vocali del cadavere di coniglio. Il gel è risultato correttamente distribuito sulla lamina propria della piega vocale (Figura 3.1).

Successivamente, la sperimentazione è stata eseguita su un campione di cinque femmine di coniglio White New Zealand, sottoposte inizialmente ad una prima operazione chirurgica sotto anestesia per provocare un **danno bilaterale alle corde vocali** tramite delle piccole pinzette. Sei mesi dopo questa prima operazione, i conigli sono stati anestetizzati e sottoposti ad una **seconda operazione** in cui sono stati iniettati, subito sotto l'epitelio della corda vocale destra, **0,05 ml di idrogel**. Il quantitativo di idrogel iniettato è stato ridotto a solo 0,05 ml dato che un volume più grande avrebbe generato una fuoriuscita dal sito dell'iniezione. Nella corda vocale sinistra, usata come controllo, è stata iniettata semplicemente soluzione fisiologica per favorire la guarigione dei tessuti.

Tutti gli animali si sono ripresi senza alcuna complicanza e sono stati sacrificati tre mesi dopo l'iniezione. Dopo il sacrificio, le loro laringi sono state prelevate e analizzate.

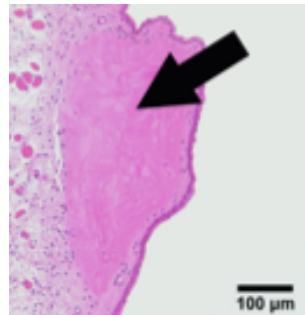


Figura 3.1: sezione istologica dell'emilaringe di un cadavere di coniglio che mostra il gel di ECM nella lamina propria della piega vocale subito dopo la sua iniezione.

L'analisi della fonazione della laringe dei conigli è stata effettuata tramite un apparato meccanico (successivamente descritto in breve) utilizzato anche per l'analisi delle laringi umane. I tessuti molli superiori della laringe sono stati rimossi per permettere una corretta visione delle corde vocali tramite un sistema di imaging digitale ad alta velocità. L'**apparecchiatura da banco per l'analisi biomeccanica** è composta principalmente da un compressore e da un supporto per il tessuto: il compressore insuffla l'aria compressa in un dispositivo che mantiene un livello di umidità del 100% e ad una temperatura di 37°C. L'aria esce da una corta pipetta di PVC e viene introdotta nella laringe posta sul supporto. Il segnale acustico proveniente dalla laringe viene monitorato da un microfono a condensatore posto a 8

cm dalla glottide ad un angolo azimutale di 45° [13]. La vibrazione delle corde viene inoltre registrata dal sistema di imaging sopra citato. La visione dei video serve ad identificare il comportamento delle primissime vibrazioni cordali (chiusura della rima della glottide) subito dopo l'avvio dell'apparecchiatura.

Dopo le prove biomeccaniche, le laringi sono state sottoposte ad **analisi istologica**, per evidenziare lo spessore dello strato cellulare della lamina propria che sarebbe venuto a formarsi e la quantità di collagene, elastina e GAGs effettivamente presente dopo l'iniezione. Tramite le osservazioni microscopiche è possibile vedere eventuali porzioni di idrogel non riassorbite dai tessuti. Dopo l'analisi istologica, è stata valutata la **risposta immunitaria** dell'organismo in cui è stato iniettato l'idrogel tramite la determinazione degli anticorpi specifici per il gel.

### 3.2.3 Risultati delle analisi sulle laringi bovine

Il contenuto proteico del VF-ECM hydrogel è stato analizzato tramite elettroforesi e spettrometria di massa, misurando un totale di **266 proteine** di diversa grandezza e complessità presenti nelle ECM delle laringi dei bovini (analisi effettuate prima dell'iniezione sui conigli, subito dopo la creazione dell'idrogel), 75 delle quali presenti in tutte le diverse ECM (Figura 3.2) e costituenti il  $94,78 \pm 3,29\%$  del totale. Queste proteine possono essere suddivise in 5 classi:

- proteine collageniche;
- proteine costituenti l'asse dei proteoglicani e glicoproteine;
- proteine associate alla matrice extracellulare (ECM-associated) e proteine secretorie;
- proteine non appartenenti ai matrisomi, ovvero strutture connettivali collegate l'una con l'altra formate da proteoglicani (PGs), GAGs, proteine reticolari, glicoproteine strutturali e altre proteine come citochine, fattori di crescita, proteasi, metaboliti e cataboliti [S7];
- altre proteine non caratterizzate.

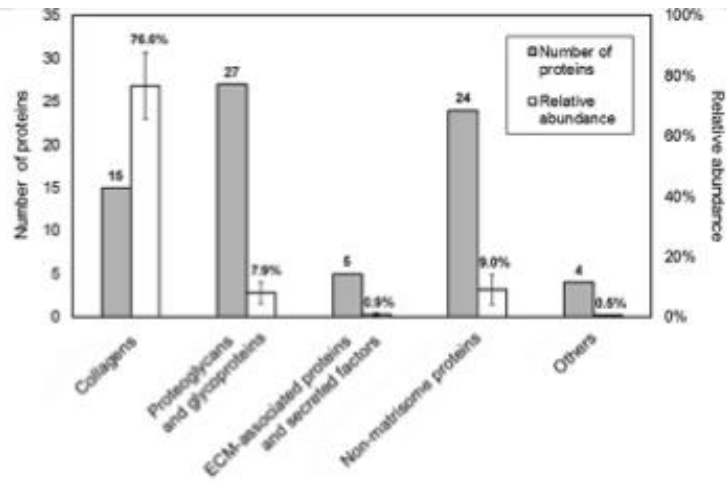


Figura 3.2: quantità effettiva (grigio) delle proteine presenti nell'ECM delle laringi bovine prelevate e relativa percentuale (bianco).

Dalla Figura 3.2 si può evincere che le **proteine del matrisoma**, quindi proteine collageniche, glicoproteine e proteoglicani, si sono **ben preservate** in numero e in percentuale nonostante i processi meccanici e chimici attuati per la decellularizzazione e per la solubilizzazione dell'ECM. L'idrogel è visibilmente costituito per la maggior parte di fibre collageniche (76,6%), in particolar modo di **fibre collageniche di tipo I e tipo III**, ovvero i tipi di collagene dominanti nel tessuto della lamina propria delle corde vocali. Un'altra importante proteina fibrosa costituente la matrice extracellulare, l'elastina, non è stata trovata nell'idrogel, nonostante fosse presente nella ECM della lamina propria decellularizzata delle corde vocali bovine prima della solubilizzazione. D'altro canto, l'idrogel ottenuto presenta **fibulina-2** e **fibulina-5**, glicoproteine associate a microfibrille di fibre elastiche, e una grande quantità di **fibrilline**, componenti primarie delle microfibrille elastiche. Insieme a fibuline e fibrilline, è stato identificato in tutti i 6 gel ottenuti un totale di 27 proteoglicani e glicoproteine (tra cui fibronectina, fibrinogeno, etc.).

Il contenuto medio di **GAGs** nei campioni di gel di ECM bovina è approssimativamente del  $15,67 \pm 8,99$   $\mu\text{g}$  sul totale delle proteine in mg. I risultati sono in perfetto accordo con la quantità media di GAGs trovata nelle membrane della piega vocale umana <sup>[12]</sup>.

#### 3.2.4 Risultati delle analisi immuno-istologiche delle laringi prelevate dai conigli

Nella Figura 3.3 sono riportate le sezioni coronali delle laringi prelevate dai conigli 3 mesi dopo l'iniezione dell'idrogel.

La lamina propria è stata trattata e studiata al microscopio dopo essere stata trattata inizialmente con ematossilina ed eosina, che colorano di viola i nuclei cellulari e le componenti

acide e di rosa il citoplasma<sup>[3]</sup>. Lo spessore della lamina propria (Fig. 3.3A) è notevolmente maggiore nella corda vocale trattata con il VF-ECM hydrogel ( $150,76 \pm 85,26 \mu\text{m}$ ) rispetto alla corda trattata con soluzione fisiologica ( $113,83 \pm 72,98 \mu\text{m}$ ). Una corda vocale sana di un coniglio presenta una lamina propria di spessore attorno ai  $210 \mu\text{m}$ , quindi si evidenzia la capacità del gel di **ridurre**, ma non di azzerare, **la contrazione della lamina propria** cronicamente cicatrizzata e di mantenere il suo **spessore attorno al 70% di quello originale**.

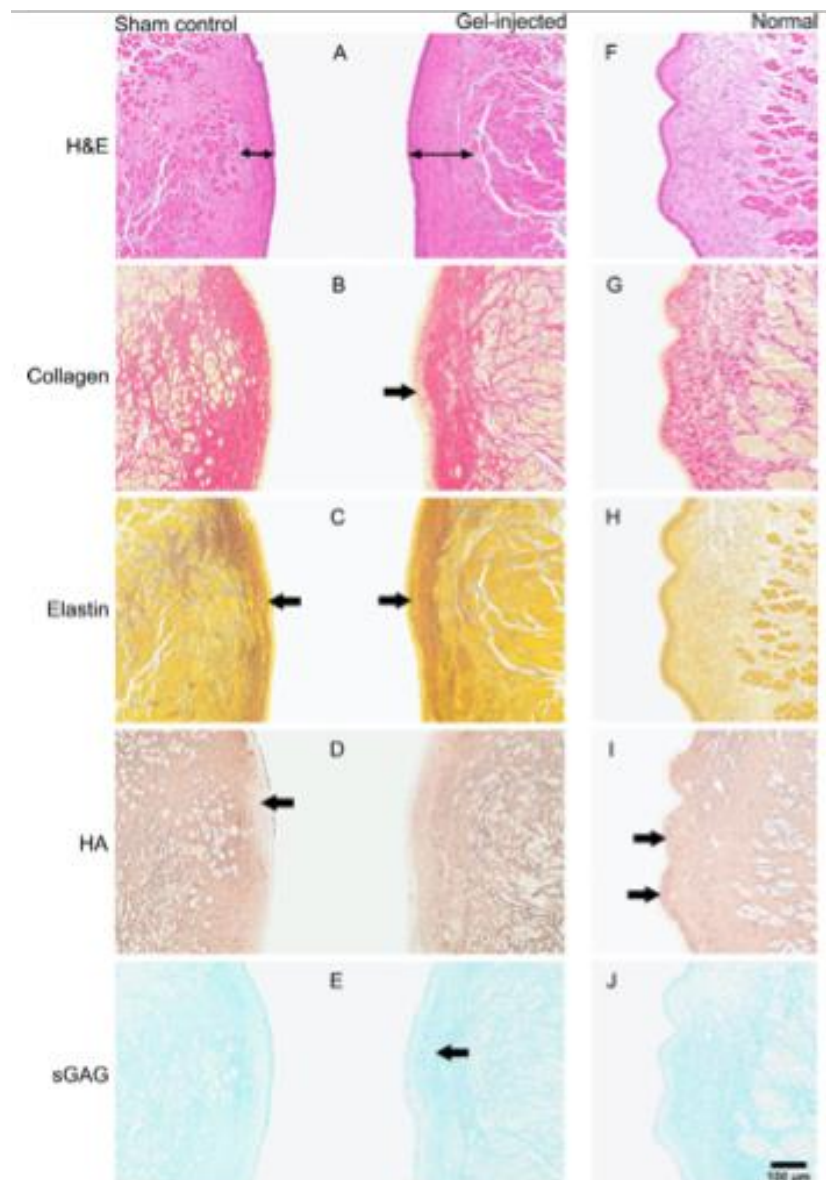


Figura 3.3: In figura sono riportate le sezioni coronali delle laringi prelevate dai conigli 3 mesi dopo l'iniezione dell'idrogel a base di ECM proveniente dai tessuti laringei bovini. Nella prima colonna sono riportate a destra le corde vocali trattate con l'idrogel e a sinistra le corde vocali di controllo trattate con soluzione fisiologica. Nella colonna di destra sono riportate invece le immagini delle stesse analisi istologiche eseguite sulla corda vocale di un coniglio sano.

Inoltre, la lamina propria delle corde vocali normali di un coniglio non presenta visibilmente fasci longitudinali di collagene. Nell'analisi istologica con colorazione tramite picrosirius red (per identificare il collagene), si nota, tuttavia, che la corda vocale di controllo presenta spessi fasci di fibre di collagene lungo tutto lo spessore della lamina propria (Figura 3.3B). Al contrario, nella corda vocale trattata con l'idrogel, spesse fibre di collagene si presentano nella parte più profonda della lamina propria, mentre la porzione più superficiale del connettivo presenta una bassa quantità di fibre meno spesse. **La deposizione di collagene è quindi significativamente diminuita** nella corda trattata col VF-ECM gel, come si vorrebbe in una corda vocale normale.

Per quanto riguarda il quantitativo di elastina nel tessuto della lamina propria, essa è piuttosto scarsa nella corda vocale normale del coniglio, eccezion fatta per la “banda subepiteliale di elastina”, ovvero uno strato presente appena sotto l'epitelio della corda vocale in cui la concentrazione di elastina è localmente più elevata (linea facilmente distinguibile in Figura 3.3H). Per via della cicatrizzazione, **la concentrazione elastinica è più elevata** sia nella corda vocale di controllo sia in quella trattata (Figura 3.3C). Tuttavia, entrambe le corde vocali riescono a rigenerare la banda subepiteliale di elastina.

La quantità di acido ialuronico (Figura 3.3D), il principale costituente dell'ECM della lamina propria e il principale determinante delle sue proprietà reologiche, non è molto più alta nella corda vocale trattata con gel rispetto alla corda di controllo. Inoltre, nessuna delle due corde vocali ha riportato dopo il trattamento la banda di acido ialuronico che è presente nella corda vocale normale del coniglio (Figura 3.3I). Nonostante ciò, la corda vocale trattata con idrogel è capace di **ripristinare un tasso molto più elevato di GAGs all'interno della lamina propria cicatrizzata** rispetto a quanti non se ne avrebbero in condizioni fisiologiche<sup>[12]</sup>.

### *3.2.5 Risultati di imaging ad alta velocità e videochimografia*

Per 4 delle 5 corde vocali analizzate è stata ottenuta una **fonazione stabile**. Statisticamente, non c'è stata nessuna differenza sostanziale nell'ampiezza vibratoria delle corde vocali. In Figura 3.4 si riporta la chimografia media di entrambe le corde vocali (corda di controllo e corda trattata con gel). Si nota, infatti che l'andamento e l'ampiezza vibratoria sono molto simili in entrambe le corde vocali: la corda vocale sottoposta all'iniezione di soluzione fisiologica presenta un'ampiezza di  $0,41 \pm 0,15$  mm, mentre la corda vocale trattata con VF-ECM hydrogel presenta un'ampiezza leggermente maggiore di  $0,50 \pm 0,19$  mm.

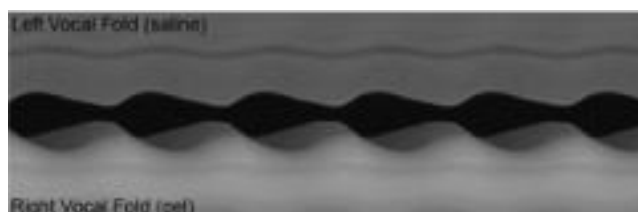


Figura 3.4: immagine tratta dalla videochimografia delle corde vocali del coniglio ottenuta tramite imaging ad alta velocità. In alto la cinetica della corda vocale di sinistra trattata con soluzione fisiologica e in basso la corda vocale di destra trattata con VF-ECM hydrogel.

Per quanto riguarda l'**onda mucosa**, ovvero il movimento sinusoidale delle corde vocali, essa è stata giudicata migliore per la corda trattata con gel in 2 delle laringi analizzate, mentre nelle altre l'onda mucosa non presenta significative differenze fra l'una e l'altra corda <sup>[12]</sup>.

### 3.2.6 Conclusioni della ricerca sul VF-ECM hydrogel

La grande quantità di proteine e di glicosamminoglicani solfati trovata nel VF-ECM gel si è dimostrata benefica per quanto riguarda la cura della ferita procurata sulle corde vocali dei conigli, ma soprattutto per la riduzione della contrazione dei tessuti e per la diminuzione del deposito di collagene che si viene a creare sulle corde vocali cronicamente cicatrizzate.

Inoltre, in tutti i 5 animali è stato riscontrato un **incremento minimo del titolo di immunoglobuline gamma (IgG)** durante i 3 mesi successivi all'iniezione, mostrando quindi una **minima risposta immunologica**. Si dimostra così anche l'ottima biocompatibilità del gel.

### 3.3 Idrogel ibrido per la prevenzione della formazione di cicatrici vocali

Come già visto, l'acido ialuronico (HA) è una componente importantissima della matrice extracellulare che favorisce la differenziazione e la motilità delle cellule, che determina anche le proprietà meccaniche dei tessuti in cui è presente. È una macromolecola appartenente alla famiglia dei GAGs, polimeri lineari costituiti dalla ripetizione di monomeri formati da due unità di natura glucidica, ed è costituito da residui di N-acetil-glucosammina, un amminozucchero, e di acido D-glucuronico <sup>[14]</sup> (Figura 3.5). L'HA possiede da solo scarse proprietà meccaniche, elevato assorbimento di acqua ed è soggetto a rapida degradazione enzimatica. Tuttavia, introducendo un altro polimero sintetico nell'HA, si può ottenere un **gel ibrido di acido ialuronico** avente proprietà meccaniche migliori e meno soggetto alla degradazione da parte dell'organismo rispetto all'originale HA. Nel campo dell'ingegneria tissutale, hanno richiamato l'attenzione del caso le **matrici di poliuretano (PU)**, strutture che promuovono la proliferazione dei macrofagi, l'adesione e la proliferazione delle cellule endoteliali e la rigenerazione di tessuti e vasi. I poliuretani sono materiali polimerici che si formano per



reazione tra alcoli ed isocianati bifunzionali. Essi sono spesso costituiti da copolimeri, a segmenti o a blocchi, composte da due fasi: una più morbida detta “soft segment” e una più rigida, denominata “hard segment” [14]. Le proprietà finali dei poliuretani dipendono sia dai monomeri scelti per la loro composizione che dal rapporto in peso tra le due fasi.

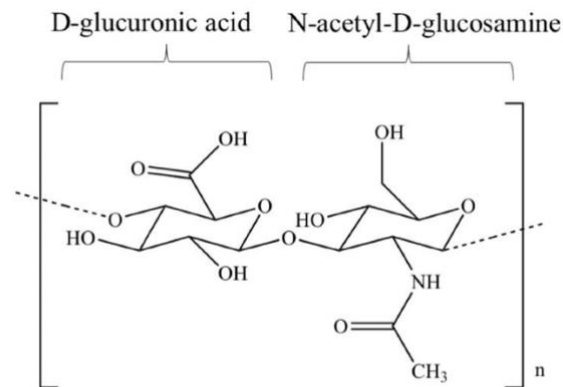


Figura 3.5: monomero dell'acido ialuronico

Nel 2022 è stato studiato in Cina (National Natural Science Foundation of China, State Key Laboratory of Polymer Materials Engineering) un nuovissimo idrogel iniettabile che promuove la riparazione delle corde vocali danneggiate e inibisce la formazione di cicatrici cordali. Una componente di questo idrogel è un **emulsione di poliuretano sintetico biodegradabile a base d'acqua (PUS)**, un polimero sintetico avente robuste proprietà meccaniche e molte funzionalità date dalla variabilità dei suoi segmenti. L'emulsione di PUS viene mescolata con una soluzione acquosa di **acido ialuronico ossidato (OHA)**, acquisendo un'enorme biocompatibilità e quindi capacità di ripristinare l'ECM della piega vocale e di interferire con la formazione delle cicatrici cordali (Figura 3.6) [15].

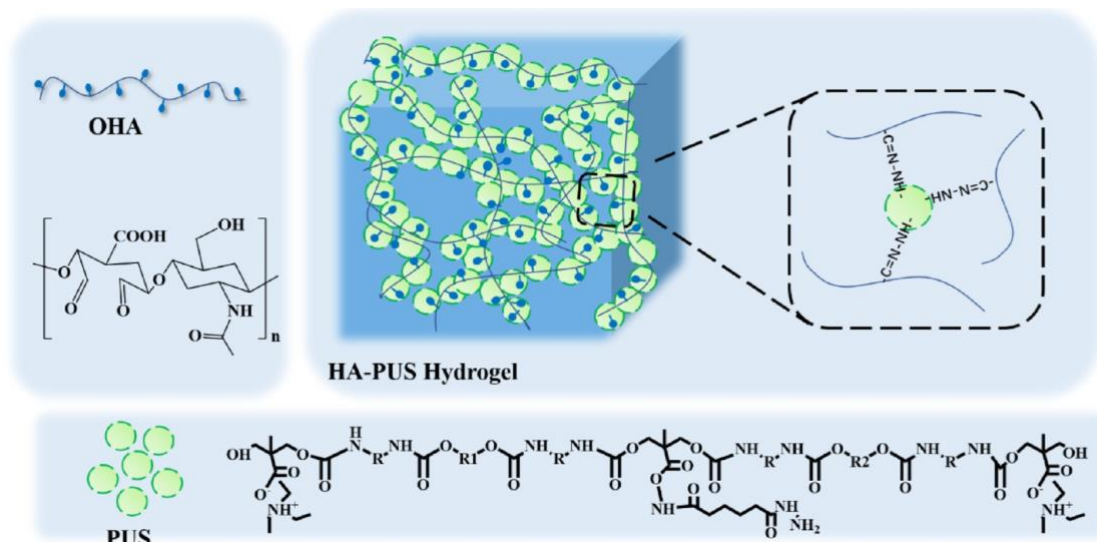


Figura 3.6: componenti chimiche dell'idrogel ibrido HA-PUS

Dopo essere stato testato sulle ferite procurate all'orecchio dei conigli, è stato testato per la prevenzione delle cicatrici cordali a seguito di lesioni artatamente causate.

### 3.3.1 Preparazione e struttura dell'HA-PUS hydrogel

Il PUS è stato creato a partire da poli  $\epsilon$ -caprolattone (PCL) e poli glicole etilenico (PEG) come soft segment e da L-lisina etilestere diisocianato (LDI) e acido 2,2-dimetilpropionico (DMPA) come hard segment. Il DMPA è stato utilizzato anche come estensore di catena durante il processo chimico che dà origine al poliuretano.

L'OHA è stato ottenuto dissolvendo l'HA in acqua e aggiungendo a gocce una soluzione acquosa di periodato di sodio. La soluzione ottenuta è stata mescolata durante la notte al buio e a temperatura ambiente per ottenere diversi livelli di ossidazione <sup>[16]</sup>.

L'HA-PUS hydrogel è stato preparando mescolando l'emulsione di PUS e la soluzione acquosa di OHA (Figura 3.7). Per ottenere un idrogel con migliori proprietà, il contenuto della soluzione acquosa di OHA è stato stabilito al 5% di massa. Sotto questa percentuale, non si ha la gelatinizzazione della soluzione, in quanto la concentrazione del polimero è troppo bassa e, di conseguenza, si riduce il numero di gruppi chimicamente attivi, prolungando così il tempo di gelatinizzazione. Basti osservare che per lo stesso gel, abbassare la concentrazione in massa del PUS dal 20% al 10% aumenta il tempo di gelatinizzazione del gel da 5 a 280 secondi. Inoltre, quando il tempo di gelatinizzazione è troppo breve, risulta difficile l'iniezione del gel; quando

è troppo lungo, la stabilità del gel è compromessa e diviene facilmente degradabile da parte dei fluidi corporei.

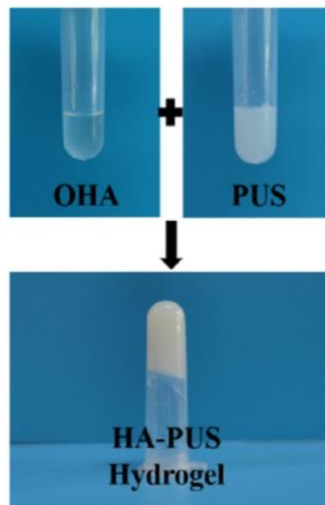


Figura 3.7: provette contenenti i precursori dell'idrogel (in alto) e l'idrogel (in basso)

La struttura microscopica dell'idrogel presenta un'organizzazione tridimensionale reticolata in cui sono presenti delle porosità (vedi Figura 3.6). Questo tipo di struttura **facilita l'infiltrazione delle cellule del tessuto con cui l'idrogel si interfaccia** e rende l'idrogel promettente nel campo della rigenerazione tissutale. Diminuendo il contenuto solido di PUS, il contenuto d'acqua aumenta gradualmente e il diametro dei pori di questa microstruttura si accresce (da 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ ), favorendo così la migrazione delle cellule, ma anche la diffusione di molecole come proteine, ossigeno e sostanze nutritive o di scarto <sup>[15]</sup>.

### 3.3.2 *Analisi di biocompatibilità e biodegradabilità in vitro e in vivo*

Lo studio sulla citocompatibilità è stato eseguito sui **fibroblasti L929**. I fibroblasti sono stati coltivati in un ambiente di controllo e in ambienti con estratti di idrogel di HA, di idrogel di PUS e di HA-PUS hydrogel (Figura 3.8) in varie prove e in diversi intervalli di tempo da 1 a 3 giorni: non sono state registrate evidenti differenze fra la coltura di controllo e la coltura con estratti di materiale, suggerendo quindi che i fibroblasti possono crescere normalmente anche in presenza del materiale. L'HA, il PUS e l'HA-PUS hydrogel risultano quindi dei materiali con un'**ottima citocompatibilità**.

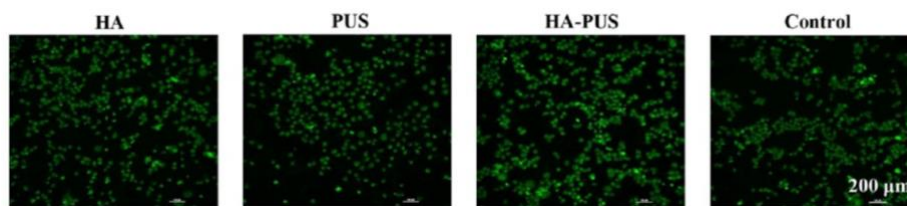


Figura 3.8: Immagini microscopiche delle diverse colture cellulari nei diversi ambienti dopo 3 giorni dal loro avvio

Per verificare la stabilità biologica dell'idrogel in vivo, sono stati iniettati uguali volumi dei tre materiali nella parte sottocutanea della schiena di un ratto. Prima dell'estrazione, è stato valutato macroscopicamente l'effetto sottocutaneo dei materiali: l'HA e il PUS si sono appiattiti sotto la cute dopo l'iniezione e si sono dimostrati poco stabili e poco biorisorbibili, dato che 7 giorni dopo potevano ancora essere osservati; l'HA-PUS hydrogel ha invece formato un piccolo bozzo dopo l'iniezione ed è stato **correttamente assorbito**.

La risposta infiammatoria si è rivelata preponderante dopo l'iniezione del PUS, più leggera, invece, in presenza di HA e HA-PUS hydrogel.

Macroscopicamente, tutti i 3 tipi di idrogel sono stati assorbiti dall'organismo dopo 14 giorni dall'iniezione e l'interazione con le cellule dell'organismo ha mostrato evidenti differenze fra i tre materiali (Figura 3.9):

- l'idrogel a base di PUS ha provocato la formazione di una capsula fibrotica sottocutanea e si è registrata scarsa neovascolarizzazione nel sito di iniezione, dimostrando quindi ridotta biocompatibilità;
- l'idrogel a base di HA si è degradato troppo velocemente e non ha stimolato una corretta angiogenesi in corrispondenza dei tessuti vicino al sito di iniezione, rendendo dubbio il suo ruolo sulla rigenerazione di tessuti;
- l'HA-PUS hydrogel si è rivelato il miglior materiale in termini di rigenerazione dei tessuti, mostrando una **risposta infiammatoria non eccessiva da parte dell'organismo**, una **graduale biodegradazione** e una **notevole vascolarizzazione dei tessuti**.

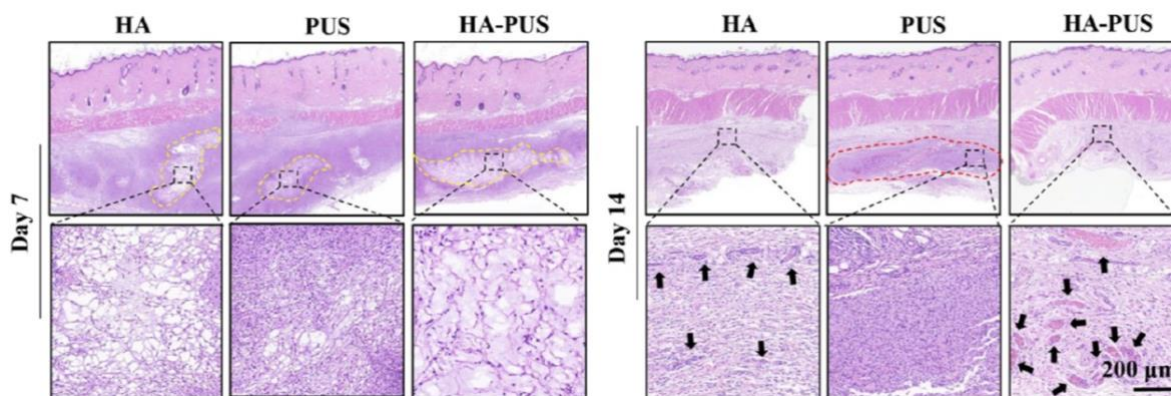


Figura 3.9: Immagini istologiche (dopo una settimana e dopo due settimane dall'iniezione) dei tessuti a contatto con i 3 tipi di idrogel

Le funzioni bioattive dell'HA-PUS hydrogel sono state verificate ulteriormente nel trattamento di cicatrici provocate sulle orecchie dei conigli. Lo studio ha rilevato la capacità dell'HA-PUS hydrogel di essere molto efficace rispetto agli altri due idrogel per quanto riguarda la rigenerazione tissutale e la riduzione dei depositi di collagene, con la conseguente minor probabilità di formazione di una cicatrice. Dopodiché, sempre sui conigli, il gel è stato applicato nello studio della rigenerazione delle corde vocali per prevenire la formazione di cicatrici cordali<sup>[15]</sup>.

### 3.3.3 Analisi macroscopica delle corde vocali trattate con HA-PUS hydrogel

Anche per questo esperimento sono stati scelti diciotto conigli White New Zealand, di cui 6 trattati come conigli di controllo per osservare il normale comportamento delle corde vocali di questa specie; gli altri 12 sono stati sottoposti alla sperimentazione.

Come già visto per il VF-ECM gel (cfr. paragrafo 3.2.2), la corda vocale sinistra è stata trattata come corda vocale di controllo, mentre la corda vocale destra è stata trattata con un'iniezione di 100  $\mu$ l di HA-PUS hydrogel, subito dopo essere stata lesionata termicamente con un elettrobisturi ad alta frequenza<sup>[15]</sup>.

Nella prima parte dell'esperimento le corde vocali sono state analizzate da un punto di vista macroscopico tramite laringoscopia. L'osservazione dell'apparato fonatorio dei conigli è stata condotta 2 e 8 settimane dopo l'iniezione dell'idrogel (Figura 3.10). Alla seconda settimana è stata osservata un'eccessiva formazione granulosa nella corda vocale sinistra, mentre nella corda vocale destra si evidenzia la **formazione di un piccolo edema: l'HA-PUS hydrogel**

**riesce quindi a diminuire le formazioni granulose** in seguito alla lesione durante la prima fase di guarigione, il che potrebbe evitare la formazione di cicatrici nella guarigione a lungo periodo. Dopo 8 settimane **la corda vocale destra si è dimostrata guarita, rimpolpata e completamente ricoperta di epitelio, di aspetto molto simile a quello della corda prima della lesione**; la corda di sinistra evidenzia dei solchi sulla sua superficie, che potrebbero rivelarsi i precursori di una cicatrice.

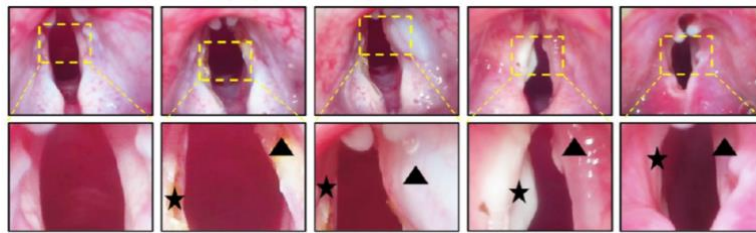


Figura 3.10: nelle colonne sono riportate le laringoscopie che hanno registrato le varie fasi della guarigione delle corde vocali (corda vocale destra trattata con HA-PUS hydrogel segnata dal triangolo; corda vocale sinistra di controllo segnata dalla stella). Nella prima colonna è riportata la laringoscopia delle corde vocali prima della lesione; nella seconda colonna si vedono le corde vocali lesionate; nella terza colonna si vedono le corde vocali subito dopo l'iniezione; nella quarta e nella quinta colonna è riportato l'aspetto delle corde vocali rispettivamente dopo 2 e 8 settimane dall'iniezione dell'idrogel.

Per l'analisi meccanica, fra i 12 conigli su cui è stata fatta la sperimentazione sono state estratte 8 laringi, mentre dei 6 conigli di controllo ne sono state estratte 3. La meccanica cordale è stata analizzata tramite imaging ad alta velocità grazie all'apparato da banco già descritto nel paragrafo 3.2.2. I risultati sono riportati nei grafici di Figura 3.11. Nonostante l'ampiezza della corda vocale trattata con HA-PUS hydrogel sia risultata inferiore rispetto ad una corda vocale normale, la **forma dell'onda mucosa** risulta molto **simile a quella fisiologica**, mentre nella corda vocale di controllo viene perso il periodo vibratorio per via della rigidità che ora presenta.

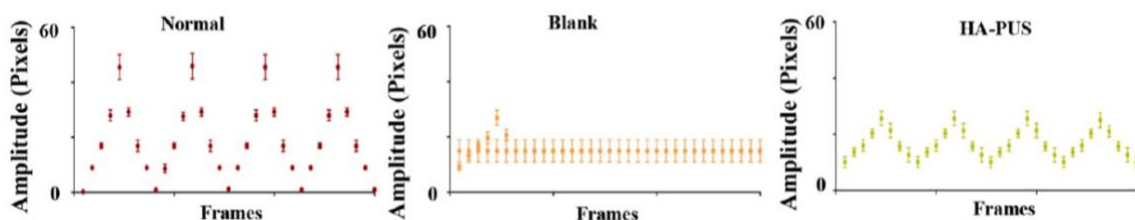


Figura 3.11: Grafici indicativi delle onde mucose delle diverse corde vocali analizzate nell'esperimento: a sinistra il grafico di una corda vocale sana, al centro quello di una corda vocale lesionata e a destra quello di una corda vocale in cui è stato iniettato l'idrogel.



### 3.3.4 Analisi immuno-istologica delle corde vocali

La colorazione dei tessuti prelevati con ematossilina-eosina è stata utile per osservare lo stato di epitelizzazione dopo 2 settimane dall'iniezione e lo spessore della lamina propria dopo 8 settimane. Come già notato dopo le osservazioni macroscopiche, le corde vocali di controllo dimostrano un'eccessiva formazione granulosa e un epitelio incompleto, mentre le corde vocali in cui è stato iniettato l'HA-PUS hydrogel evidenziano una **completa rigenerazione dell'epitelio** (Figura 3.12). L'analisi istologica ha mostrato una **lamina propria meno spessa nelle corde vocali trattate con HA-PUS hydrogel** (Figura 3.13). L'analisi tramite colorazione tricomatica di Masson (colorazione che mette in risalto con un colore blu le fibre di collagene<sup>[3]</sup>) ha messo in evidenza che il minore spessore è dato da un **minore addensamento delle fibre di collagene** nella lamina propria. Di conseguenza, si evidenzia la capacità dell'idrogel di ridurre la deposizione di fibre di collagene nel sito dell'iniezione.

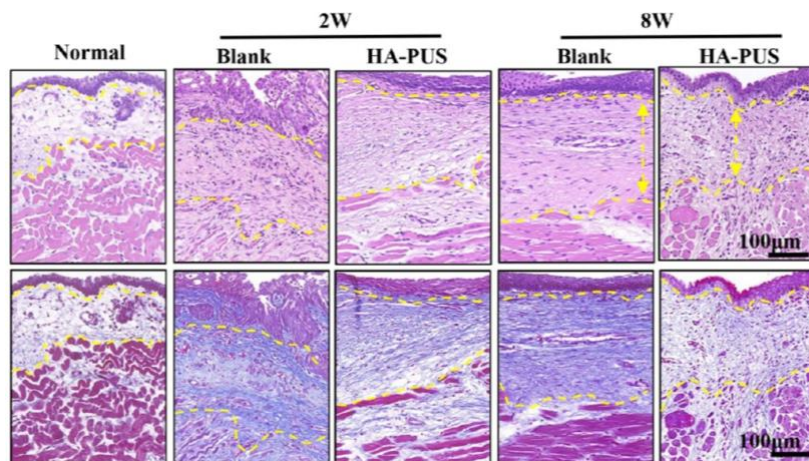


Figura 3.12: immagini delle analisi istologiche delle corde vocali prelevate. Nella prima riga sono presenti le immagini colorate tramite ematossilina-eosina (evidenziano le cellule della lamina propria) e nella seconda riga le immagini colorate tramite colorazione tricomatica di Masson (evidenziano le fibre di collagene).

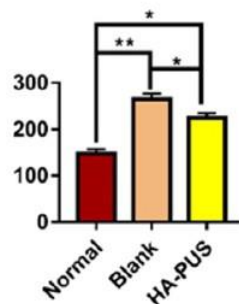


Figura 3.13: confronto dello spessore della lamina propria in µm tra i diversi campioni

Per quanto riguarda la risposta immunologica, l'HA-PUS hydrogel ha dimostrato un'ottima capacità nella diminuzione della risposta infiammatoria: si osserva, infatti, una **minore concentrazione di macrofagi** (leucociti mediatori della risposta infiammatoria) nelle corde vocali iniettate con l'idrogel rispetto alle corde vocali di controllo <sup>[15]</sup>.

### *3.3.5 Conclusioni della ricerca sull'HA-PUS hydrogel*

L'iniezione a livello della corda vocale dell'HA-PUS hydrogel ha dimostrato un effetto benefico nella guarigione della lesione provocata sulla corda vocale senza la formazione di cicatrici cordali. L'idrogel è infatti in grado di prevenire la formazione di eccessive strutture collageniche che stanno alla base delle cicatrici cordali. La veloce ricellularizzazione dell'epitelio cordale e della membrana basale e la ridotta reazione immunitaria da parte dell'ospite, testimoniano la buona biocompatibilità anche di questo idrogel.



## Conclusioni

Il problema delle cicatrici cordali iatrogene ha portato la ricerca a muoversi verso lo studio, prima in vitro e poi in vivo, di nuovi idrogel per la prevenzione della formazione di queste strutture cicatriziali. Gli studi condotti in vivo circa l'applicazione dell'idrogel ottenuto dalla matrice extracellulare di epitelio cordale e di lamina propria di corde vocali bovine (VF-ECM hydrogel) e dell'idrogel sintetizzato a partire da acido ialuronico e poliuretano sintetico (HA-PUS hydrogel) hanno mostrato risultati promettenti dal punto di vista istologico e immunologico.

Al momento, la terapia logopedica e l'iniezione di grasso autologo o di collagene bovino sono gli unici metodi per trattare le cicatrici cordali iatrogene nell'uomo. Entrambi gli idrogel summenzionati, però, sembrano essere dei buoni candidati per il futuro uso clinico: dopo essere stati testati in vivo su conigli White New Zealand, hanno mostrato buoni risultati per quanto riguarda la **riduzione in spessore del deposito di collagene** in seguito alle ferite provocate chirurgicamente.

L'obiettivo dei due idrogel è stato quindi raggiunto, favorendo un migliore rimodellamento dei connettivi e degli epitelii cordali. Inoltre, entrambi i materiali non hanno scatenato reazioni avverse nel modello animale, attivando una debole risposta immunitaria. Questo dimostra quindi la buona **biocompatibilità** dei due gel.

Se questi recenti studi in vivo dovessero avere il successo desiderato, si potrebbero iniziare i trial clinici. Se anche questi dovessero andare a buon fine, si potrà disporre in futuro di biomateriali alternativi al collagene bovino o al grasso autologo, che purtroppo vengono troppo rapidamente riassorbiti dall'organismo, non raggiungendo quindi una ottimale percentuale di successo.



## Fonti bibliografiche

- [1] U.G. Goldstein: *An articulatory model for the vocal tracts of growing children*. Ph.D. dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.
- [2] G. Rickheit, T. Hermann, Werner Deutsch: *Psycholinguistik. Ein internationales Handbuch (= Handbücher zur Sprach und Kommunikationswissenschaft. 24)*. W. de Gruyter, Berlin u.a. 2003.
- [3] I. Dalle Donne *Istologia con elementi di anatomia microscopica* EdiSES Università, EdiSES S.r.l. – Napoli (2019): 10;193;268
- [4] Titze, Ingo R. (1994): *Principles of Voice Production*. Prentice Hall.
- [5] Antunes MB, Cohen NA. *Mucociliary clearance--a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;7(1):5-10. doi: 10.1097/ACI.0b013e3280114eef. PMID: 17218804.
- [6] Gray S.D. (Agosto 2000): *Cellular physiology of the vocal folds*. *Otolaryngol. Clin. North America*.
- [7] E. Cunsolo, D. Casolino, G. Cenacchi: *La fisiologia delle corde vocali*. In: *Le disfonie: fisiopatologia clinica ed aspetti medico-legali*. Società Italiana di Otorinolaringoiatria e Chirurgia Cervico-Facciale, LXXXIX Congresso Nazionale, San Benedetto del Tronto, 22-25 maggio 2002: 69;315;316;319-321.
- [8] Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, Sataloff RT, Spiegel JR, Woo P. *Vocal fold scarring: current concepts and management*. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Nov;115(5):474-82.
- [9] D. Casolino, A. R. Maccarini: *Fonochirurgia endolaringea*. Associazione Otorinolaringologi Ospedalieri Italiani (Presidente: Enrico de Campora), Pacini Editore Medicina, 1997: 32
- [10] Ford CN Bless DM, Loftus JM. *Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1992 Mar;101(3):237-47.
- [11] G. Bergamini: *Laringoplastiche iniettive*. Associazione Otorinolaringologi Ospedalieri Italiani (Presidente: Giorgio Tore), Quaderni Monografici di Aggiornamento A.O.O.I. (2011): 102
- [12] Xu CC, Mau T. *A tissue-specific, injectable acellular gel for the treatment of chronic vocal fold scarring*. *Acta Biomater*. 2019 Nov;99:141-153.

- [13] T. Mau, J. Muhlestein, S. Callahan, K.T. Weinheimer, R.W. Chan: *Phonation threshold pressure and flow in excised human larynges*. *The Laryngoscope* (2011): 1744
- [14] C. Di Bello, A. Bagno: *Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. Collana di ingegneria biomedica diretta da Emanuele Biondi e Claudio Cobelli, Pàtron Editore (2016);5: 119;194
- [15] Hu JJ, Wang M, Lei XX, Jiang YL, Yuan L, Pan ZJ, Lu D, Luo F, Li JH, Tan H. *Scarless Healing of Injured Vocal Folds Using an Injectable Hyaluronic Acid-Waterborne Polyurethane Hybrid Hydrogel to Tune Inflammation and Collagen Deposition*. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022 Sep 28;14(38):42827-42840.
- [16] Wang H, Zhu D, Paul A, Cai L, Enejder A, Yang F, Heilshorn SC. *Covalently adaptable elastin-like protein - hyaluronic acid (ELP - HA) hybrid hydrogels with secondary thermoresponsive crosslinking for injectable stem cell delivery*. *Adv Funct Mater*. 2017 Jul 26;27(28):1605609.

## Fonti sitografiche

- [1] <https://m.my-personaltrainer.it/salute-benessere/laringe.html>
- [2] <https://www.carlogovoni.it/argomenti/gola-laringe-collo/167-lesioni-cordali-acquisite>
- [3] <https://www.claudiolambertoni.it/post/malattie-della-laringe-lesioni-congenite>
- [4] <https://www.zenadent.it/glossario/leucoplachia>
- [5] <https://www.chiaralicordarilogopedista.com/disfonia>
- [6] <https://it.m.wikipedia.org/wiki/idrogel>
- [7] [https://www.mednews.care/medicina\\_integrata/la-matrice-extracellulare-il-mezzo-attraverso-cui-si-muovono-le-bioinformazioni](https://www.mednews.care/medicina_integrata/la-matrice-extracellulare-il-mezzo-attraverso-cui-si-muovono-le-bioinformazioni)





