

Edema de Reinke: estudo da imunoexpressão da fibronectina, da laminina e do colágeno IV em 60 casos por meio de técnicas imunoistoquímicas

Regina Helena Garcia Martins ¹, Maria Aparecida Domingues ², Alexandre Todorovic Fabro ³, Norimar Hernandez Dias ⁴, Marcela Ferreira Santana ⁵

Reinke's edema: immunoexpression study of fibronectin, laminin and collagen IV in 60 cases by immunohistochemical techniques

Palavras-chave: colágeno tipo IV, edema laríngeo, fibronectinas, imunoistoquímica, laminina.
Keywords: type iv collagen, laryngeal edema, fibronectins, immunohistochemistry, laminin.

Resumo / Summary

Edema de Reinke é doença crônica da laringe na qual a camada superficial da lâmina própria é expandida por muco espesso conferindo-lhe aspecto gelatinoso. Relaciona-se ao tabagismo e acomete, preferencialmente mulheres, as quais apresentam a voz mais grave. Suas características histológicas nem sempre conseguem diferenciá-lo das demais lesões benignas da laringe, havendo necessidade de técnicas histológicas adicionais. **Objetivos:** Estudar a imunoexpressão da fibronectina, do colágeno IV e da laminina no edema de Reinke por meio de técnicas imunoistoquímicas. Estudo prospectivo. **Material e Métodos:** Blocos histológicos de 60 casos cirúrgicos de edema de Reinke foram resgatados, submetidos a novos cortes e às reações imunoistoquímicas para fibronectina, laminina e colágeno IV pelo método da Avidina Biotina Peroxidase. Todos os pacientes eram fumantes e adultos, sendo 50 mulheres e 10 homens. **Resultados:** As análises da imunoexpressão da fibronectina, do colágeno IV e da laminina foram mais expressivas no endotélio dos vasos (68,33%, 76,66%, 73,33%, respectivamente), e menos relevantes na membrana basal (25,0%, 5,0% e 3,3%, respectivamente). **Conclusões:** No edema de Reinke, a imunoexpressão da fibronectina, da laminina e do colágeno IV na membrana basal não apresentam relevância, havendo predomínio desses anticorpos no endotélio dos vasos

Reinke's edema is chronic laryngeal disease in which the superficial layer of the lamina propria is expanded by thick mucus, giving it a gelatin aspect. The disease is directly related to smoking and more frequent in women, who end up having a lower tone of voice. Its histological characteristics cannot always distinguish it from other benign lesions of the larynx for which additional histological techniques are necessary. **Aim:** to study the immunoexpression of fibronectin, collagen IV and laminin in Reinke's edema by immunohistochemical technique. Prospective study. **Materials and methods:** histological blocks of 60 cases of surgical Reinke's edema were saved, submitted to new cross-sections and to immunohistochemical reactions for fibronectin, laminin and collagen IV by the Avidin-Biotin-Peroxidase method. Fragments of five normal vocal folds were used as control, removed during autopsy. All patients were chronic smokers and adults- 50 women and 10 men. **Results:** the immunoexpression of fibronectin, collagen IV and laminin was more important in the endothelium of blood vessels (68.33%, 76.66%, 73.33%, respectively) and less relevant in the basement membrane (25.0%, 5.0% and 3.3%, respectively). **Conclusions:** the immunoexpression of fibronectin, laminin and of collagen IV in the basal membrane of Reinke's edema was not relevant, with a predominance of these antibodies in the endothelium of blood vessels.

¹ Professora Livre-Docente da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Responsável pelo ambulatório de foniatria e voz, Docente da Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Estadual Paulista-Unesp, Campus de Botucatu.

² Professora Doutora do Departamento de Patologia, Unesp. Docente da Disciplina de Patologia, Unesp.

³ Médico Residente da Disciplina de Patologia, Unesp.

⁴ Professor Doutor da Disciplina de Otorrinolaringologia, Unesp-Botucatu. Médico Otorrinolaringologista.

⁵ Acadêmica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. Acadêmica.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 1 de novembro de 2008. cod. 6098.

Artigo aceito em 29 de janeiro de 2009.

INTRODUÇÃO

Edema de Reinke é uma doença crônica da laringe na qual a camada superficial da lâmina própria, também denominada de espaço de Reinke, é ocupada por muco espesso, conferindo às pregas vocais aspecto gelatinoso e mixomatoso. Desenvolve-se, em indivíduos fumantes crônicos, havendo predileção pelo sexo feminino, fato este não totalmente esclarecido, até o momento. Para alguns autores tal fato deve-se à grande preocupação da mulher com as transformações progressivas que ocorrem com sua voz, a qual se torna mais grave, sendo confundida, muitas vezes, à voz masculina¹⁻³.

O edema de Reinke tem sido incluído entre as lesões benignas exsudativas da laringe, juntamente com os nódulos e os pólipos vocais, devido às semelhanças histopatológicas entre essas lesões, nas quais há predomínio de edema submucoso, justificando a homogeneidade dos laudos patológicos^{4,5}. Entretanto, essas três lesões apresentam aspectos endoscópicos e mecanismos fisiopatológicos distintos.

Diversos fatores etiológicos estão envolvidos no desenvolvimento das lesões benignas da laringe, sendo possível identificar o predomínio de alguns deles como o hábito de fumar no desenvolvimento do edema de Reinke e o fonotraumatismo nos nódulos vocais. Já nos pólipos vocais, a identificação de um fator etiológico mais predominante é mais difícil.

Estudos histológicos têm procurado, exaustivamente, diferenciar cada uma das lesões benignas da laringe, entretanto as alterações encontradas são comuns às três lesões, sem haver especificidade, sendo constatados graus variados de hiperplasia epitelial, espessamento de membrana basal, edema no corion, infiltrado inflamatório e aumento de vasos⁶⁻⁸. Remacle et al.⁵ estudaram as características histológicas (pela coloração hematoxilina & eosina) do epitélio, da membrana basal e da lâmina própria de 163 lesões benignas das pregas vocais, e observaram que nos nódulos, havia evidente espessamento da membrana basal, edema e fibrose do córion e frequente paraceratose do epitélio; nos pólipos predominava edema no córion, fibrose, dilatação e neoproliferação vascular e nenhum ou discreto espessamento da membrana basal; no edema de Reinke, constataram espessamento da membrana basal, edema do córion, congestão dos vasos e fibrose. Dijkers, Nikkels⁷ estudaram as alterações histológicas nas três lesões laríngeas, por meio de diferentes colorações (H&E, Verhoeff-van Gienson, Tricromo de Masson e alcian blue após tratamento do tecido com hialuronidase), resumindo os principais achados como se segue: nos pólipos vocais há predomínio de depósito de fibrina na lâmina própria, sinais de hemorragia, aumento do número de vasos, depósito de ferro e trombose vascular; no edema de Reinke, espessamento da membrana basal, presença de lagos edematosos

e de eritrócitos extravasculares, além de espessamento das paredes dos vasos; já nos nódulos, as alterações mais prevalentes foram espessamento da membrana basal, ausência de hemorragia e de lagos edematosos.

Volic et al.⁸, em revisão de 10 lâminas histológicas de edema de Reinke coradas pela hematoxilina e eosina e pelo Mallory-Azan, constataram epitélio normal ou hiperplásico, desorganização da lâmina própria, espessamento da membrana basal, dilatação vascular e edema.

A falta de especificação histológica entre as diversas lesões laríngeas tem incentivado estudos ultraestruturais, objetivando apontar detalhes estruturais capazes de diferenciá-las. Neste sentido, um achado marcante e constante nos nódulos vocais é o depósito de material heterogêneo subepitelial, raramente observado nas demais lesões. Outros achados ultraestruturais de destaque, porém sem determinar especificidade entre as lesões, são áreas focais de destacamento e de interrupções da membrana basal e o alargamento das junções celulares, levando a alterações estruturais dos desmossomos. Todos esses achados são interpretados pelos autores como resposta do epitélio ao fonotraumatismo, sendo mais evidentes nas lesões relacionadas à elevada demanda vocal, como ocorre nos nódulos vocais⁹⁻¹¹.

Gray⁶ e Courey¹⁰, em estudo imunoistoquímico, constataram importante aumento de fibronectina e de colágeno IV nos nódulos vocais. Já nos pólipos e edema de Reinke havia falta de fibronectina na lâmina própria, ausência de alterações na membrana basal e diminuição do colágeno tipo IV. A grande quantidade de fibronectina foi relacionada ao trauma fonatório, uma vez que esta é uma glicoproteína que participa no processo de reparação tecidual.

Como vimos, os resultados das análises morfológicas demonstram que os nódulos vocais apresentam características peculiares que os diferenciam das demais lesões, sendo importante a realização de estudos adicionais envolvendo as outras lesões laríngeas para que suas características morfológicas possam ser mais bem desvendadas.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto recebeu parecer do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da instituição onde foi realizado sob o protocolo de número 190/06. A partir de sua aprovação, foi realizada análise retrospectiva dos prontuários médicos de todos os pacientes com diagnóstico clínico e endoscópico de edema de Reinke, atendidos, previamente, nos ambulatórios de Distúrbios da Voz da mesma instituição, no período de 2001 a 2007, sendo excluídos os prontuários que continham dados incompletos. Desta forma, foram selecionados 72 casos de edema de Reinke, dos quais 60 haviam sido submetidos à cirurgia. A revisão dos dados dos prontuários destes 60 pacientes revelou que 50 deles pertenciam ao sexo feminino e 10 ao

masculino, sendo que nove pacientes possuíam entre 20 e 40 anos, 44 entre 41 e 60 anos e sete acima de 61 anos. Todos os pacientes eram fumantes crônicos e apenas 12 ingeriam bebida alcoólica com relativa frequência. Abuso vocal foi constatado em 20 casos, sintomas nasossinusais em 16 e sintomas gastresofágicos em 21 casos.

Os diagnósticos histológicos foram revisados, os blocos das peças em parafina foram resgatados e submetidos à novos cortes e às colorações imunoistoquímicas para os anticorpos contra fibronectina, laminina e colágeno IV. Laringes normais de cinco cadáveres adultos (três do sexo feminino e duas do sexo masculino) sem lesões macroscópicas foram usadas como controle do estudo imunoistoquímico, após a certificação de que esses pacientes não eram fumantes e não haviam sido submetidos a intubação traqueal.

Estudo imunoistoquímico

Os blocos em parafina dos 60 pacientes submetidos a cortes de três micra de espessura. As peças foram montadas em lâminas silanizadas e submetidas às reações imunoistoquímicas pelo método Avidina Biotina Peroxidase 11, utilizando-se anticorpo policlonal antifibronectina (código A0245, Dako), anticorpo monoclonal antilaminina (clone LAM 89, Novocastra) e anticorpo monoclonal anticolágeno IV (clone CIV 22, Dako). Após a preparação do material, as lâminas histológicas foram examinadas em microscópio de luz (marca Zeis - Carl Zeiss do Brasil Ltda; modelo Axiostar plus), por patologista experiente, com diferentes aumentos e captura de imagens em câmera digital. Os resultados foram interpretados, dependendo do grau de intensidade da coloração em leve, moderado ou intenso. Os locais de registros de imunoexpressão foram: membrana basal, córion e endotélio dos vasos. As laringes normais usadas como controle foram submetidas às mesmas reações imunoistoquímicas.

Método estatístico

Na análise histológica, o método estatístico utilizado foi o teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A análise imunoistoquímica das laringes utilizadas como controle do estudo foi muito semelhante nos cinco fragmentos de pregas vocais avaliados, ou seja, identificou-se pigmentação suave da fibronectina, especialmente na membrana basal (Figura 1a), embora no córion e no endotélio dos vasos fosse também identificada a presença do pigmento, porém de forma menos marcante. A imunoexpressão do colágeno IV e da laminina foi mais evidente ao redor dos vasos (Figuras 1b e 1c).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos escores semiquantitativos das análises imunoistoquímicas

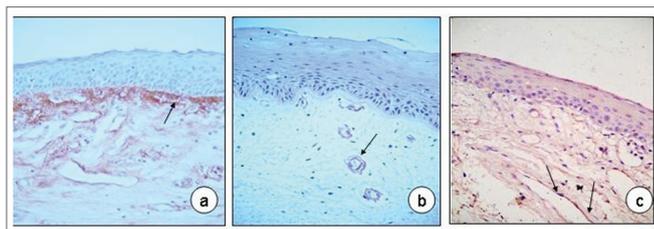


Figura 1. prega vocal normal. Imunoexpressão da fibronectina na membrana basal e camada superficial da lâmina própria (a, 40X; setas), do colágeno IV e da laminina na membrana basal do endotélio dos vasos (b e c, 40X; setas).

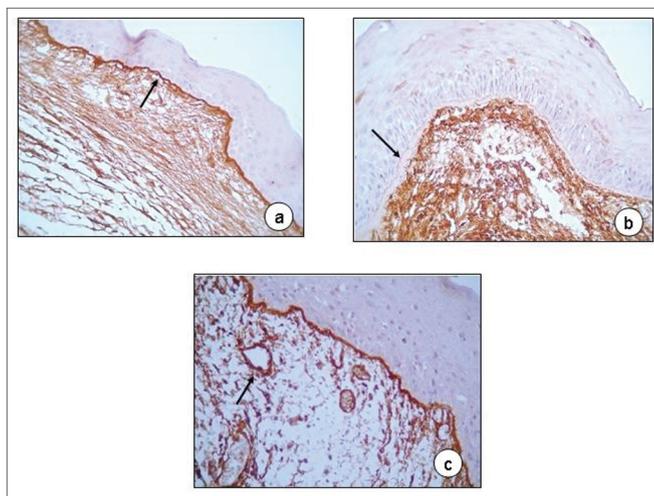


Figura 2. Edema de Reinke. Imunoexpressão da fibronectina na membrana basal (a, 40X; seta) e na membrana basal do endotélio dos vasos (c, 60X; seta). Ausência do pigmento na membrana basal em b (60X, seta).

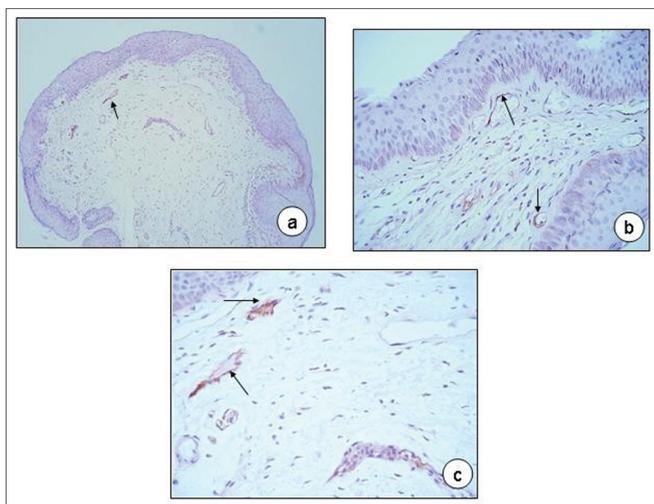


Figura 3. Edema de Reinke. Imunoexpressão da laminina na membrana basal do endotélio dos vasos (a, 20X; b, 40X; c, 80X; setas).

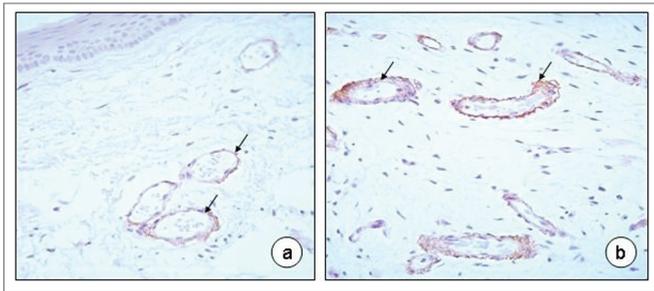


Figura 4. Edema de Reinke. Imunoexpressão do colágeno IV na membrana basal do endotélio dos vasos (a-40X; b-80X; setas).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises da imunoexpressão da laminina no edema de Reinke nas 60 lâminas analisadas e, novamente, observa-se maior depósito do pigmento no endotélio dos vasos (73,33%; Figuras 3a, 3b e 3c); Anticorpos antilaminina estavam praticamente ausentes na membrana basal, sendo registrados em apenas 5% das lâminas analisadas.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das análises imunoistoquímicas do colágeno IV, havendo predomínio da coloração acastanhada ao redor dos vasos (76,66%) e em apenas 3,33% na membrana basal das lâminas estudadas (Figuras 4a e 4b).

Tabela 1. Escore semiquantitativo da imunoexpressão da fibronectina no edema de Reinke.

Locais	Escore da imunoexpressão da fibronectina				Total N %	p
	0 ausente	1 leve	2 moderada	3 Intensa		
Membrana basal	45	13	2	0	15 (25,00)	<0,0001
Corion	46	13	1	0	14 (23,33)	<0,0001
Endotélio dos vasos	19	34	7	0	41 (68,33)	0,0001

Tabela 2. Escore semiquantitativo da imunoexpressão da laminina no edema de Reinke.

Locais	Escore da imunoexpressão da laminina				Total N %	p
	0 Ausente	1 leve	2 moderada	3 Intensa		
Membrana basal	57	3	0	0	3 (5,00)	<0,0001
Corion	60	0	0	0	0 (0,00)	<0,0001
Endotélio dos vasos	16	39	5	0	44 (73,33)	<0,0001

Tabela 3. Escore semiquantitativo da imunoexpressão do colágeno IV no edema de Reinke.

Locais	Escore da imunoexpressão do colágeno IV				Total N %	p
	0 ausente	1 leve	2 moderada	3 Intensa		
Membrana basal	58	2	0	0	2 (3,33)	<0,0001
Corion	59	1	0	0	1 (1,66)	<0,0001
Endotélio dos vasos	16	28	14	2	46 (76,66)	<0,0001

da fibronectina nas 60 lâminas analisadas, na qual pode-se constatar que o depósito do pigmento na membrana basal e no córion não foi expressivo (25,0% e 23,33%, respectivamente), à semelhança das peças utilizadas no controle, destacando-se o delicado contorno acastanhado em toda a extensão da membrana basal (Figura 2 a). Em alguns casos a membrana basal estava totalmente isenta da impregnação do pigmento mesmo quando esta se encontrava espessada (Figura 2b). No endotélio dos vasos da lâmina própria a impregnação foi mais marcante, presente em 68,33% dos casos (Figura 2c).

DISCUSSÃO

O edema de Reinke é considerado benigno para a maioria dos autores, sendo enquadrado entre as lesões exsudativas do espaço de Reinke, juntamente com os nódulos e pólipos vocais^{4,5}. Pastuszek et al.¹², analisando 261 lâminas de edema de Reinke previamente coradas pela hematoxilina e eosina, salientaram a elevada frequência do edema subepitelial e de vasos dilatados na lâmina própria, além de displasia epitelial, em menor grau. Nas análises ultraestruturais os autores destacaram a perda das junções intercelulares. Entre outros achados histológicos, tem sido

destacado o infiltrado inflamatório e o espessamento da membrana basal.

Devido à direta relação entre o desenvolvimento do edema de Reinke e o tabagismo crônico, considera-se importante avaliar com cautela seus aspectos morfológicos. Em recente pesquisa, apresentamos os achados histológicos e de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão do edema de Reinke, constatando-se diferentes graus de displasia epitelial e um caso de carcinoma *in situ*¹³. A preocupação com possíveis alterações pré-neoplásicas no edema de Reinke já havia sido apresentada anteriormente por alguns autores¹⁴⁻¹⁵. Marcotullio et al.¹⁵ avaliaram 125 casos de edema de Reinke e encontraram 52 casos com classificação das alterações epiteliais grau 0, 64 com grau I, 6 com grau II e 3 com grau III, entre os quais incluíram um caso de carcinoma microinvasivo.

Por meio das colorações imunoistoquímicas utilizando anticorpos antifibronectina, antilaminina e anti-colágeno IV, os vasos da lâmina própria podem se bem destacados, uma vez que estes se encontram em número aumentado. Neste estudo constatou-se que o depósito de anticorpos antifibronectina na membrana basal não foi achado frequente no edema de Reinke. Segundo Gray et al.⁶ e Volic et al.⁸, o depósito da fibronectina na membrana basal é uma característica marcante dos nódulos vocais. A fibronectina é uma glicoproteína produzida pelos fibroblastos que desempenha importante papel na adesão e reparação tecidual, justificando seu aumento nas lesões fonotraumáticas. No caso do edema de Reinke, a sobrecarga fonatória não parece ser o fator determinante para o desenvolvimento da lesão e, sim, a ação irritativa crônica dos componentes do cigarro, sendo responsável por filtrado inflamatório e aumento no número dos vasos. O exsudato resultante desse processo é produzido e represado na lâmina própria, uma vez que a drenagem linfática local é precária.

Neves et al.¹⁶ realizaram estudo histopatológico e imunoistoquímico utilizando anticorpos contra laminina e colágeno IV, em lesões laríngeas (9 nódulos, 8 pólipos e 9 edema de Reinke) e constataram maior imunoexpressão da laminina e do colágeno IV nos nódulos vocais, bem como maior espessamento da membrana basal, quando comparados aos pólipos. O edema de Reinke não se diferenciou das demais lesões estudadas. Os autores chamam a atenção para a importância dessas substâncias nas lesões fonotraumáticas, porém não estudaram a fibronectina, cuja resposta parece ser maior que da laminina e do colágeno IV.

Estudos adicionais têm demonstrado que, além das alterações morfológicas apontadas acima, a distribuição das fibras colágenas parece também estar alterada no edema de Reinke. Sakae et al.¹⁷ analisaram 20 casos de edema de Reinke utilizando a técnica do picrossírius e observaram que as fibras colágenas da lâmina própria perdem

o padrão característico de entrelaçamento, havendo desarranjo e ruptura das mesmas, em meio ao infiltrado de mixomatoso, principalmente nas camadas mais profundas da lâmina própria. Essas alterações poderiam contribuir para a disfunção vocal desses pacientes.

Como vimos, os diversos estudos morfológicos que abordam o edema de Reinke agregam informações que auxiliam a desvendar a fisiopatologia da lesão e a explicar as alterações nas qualidades da voz desses pacientes. Pelos estudos imunoistoquímicos a imunoexpressão da fibronectina, da laminina e do colágeno IV na membrana basal não apresentam relevância, havendo prevalência desses anticorpos no endotélio dos vasos da lâmina própria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia Alvarez CD, Campos Banales ME, Lopes Campos D, Rivero J, Perez Pinero B, Lopes Aguado D. Polyps, nodules and Reinke edema. An epidemiological and histopathological study. *Acta Otolaryngol Esp.* 1999;50:443-7.
2. Chau HN, Desai K, Georgalas C, Harries M. Variability in nomenclature of benign laryngeal pathology based on video laryngoscopy with and without stroboscopy. *Clin Otolaryngol.* 2005;30:424-7.
3. Roy N, Merrill RM, Gray SD, Smith EM. Voice disorders in the general population. Prevalence, risk factors and occupational impact. *Laryngoscope.* 2005;115:1988-95.
4. Remacle M, Lagneau E, Doyle A, Marbaix E. Exudative laryngeal diseases of Reinke's space. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1995;109:33-8.
5. Remacle M, Degols JC, Delos M. Exudative lesions of Reinke's space. An anatomopathological correlation. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1996;50:253-64.
6. Gray SD, Hammond E, Hanson DF. Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:13-8.
7. Dikkers FG, Nikkels PGJ. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:698-703.
8. Volic SV, Kaplan I, Seiwert S, Ibrahim T. Extracellular matrix of Reinke's space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol.* 2004;124:505-8.
9. Dikkers FG, Hulstaert CE, Oosterbaan JA, Cervera-Paz FJ. Ultrastructural changes of the basement membrane zone in benign lesions of the vocal folds. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 1993;113:98-101.
10. Courey M, Scott MA, Shohet JA, Ossoff RH. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996;105:525-31.
11. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577-80.
12. Pastuszek P, Krecicki T, Zaleska-Krecicka M, Jelen M, Rak J, Krajewska B. Histological and electron microscopic investigation of Reinke's edema. *Pol J Pathol.* 2003;54:61-4.
13. Martins RHG, Fabro AT, Domingues MAC, Chi AP, Gregório EA. Is Reinke's edema a precancerous lesion? Histological and electron microscopic aspects. *J Voice.* 2008 in press.
14. Nielsen VM, Hojslet PE, Palvio D. Reinke's oedema: a premalignant condition? *J Laryngol Otol.* 1986;100:1159-62.
15. Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T. Reinke's and risk factors: clinical and histopathologic aspects. *Am J Otolaryngol.* 2002;23:81-4.
16. Neves BMJ, Neto JG, Pontes P. Diferenciação histopatológica e imunoistoquímica das alterações epiteliais no nódulo vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70:439-48.
17. Sakae FA, Imamura R, Sennes LU, Mauad T, Saldiva P, Tsuji DH. Disarrangement of collagen fibers in Reinke's edema. *Laryngoscope.* 2008;118:1500-3.