

Diferenciação histopatológica e imunoistoquímica das alterações epiteliais no nódulo vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe

Histopathological and immunohistochemical differentiation of epithelial alterations in vocal nodule comparing to polyps and to laryngeal edema

Beatrice M. J. Neves¹, João G. Neto², Paulo Pontes³

Palavras-chave: prega vocal, membrana basal, imunoistoquímica.

Key words: vocal fold, basement membrane, immunohistochemistry.

Resumo / Summary

Objetivo: Avaliar, por meio de técnicas histológicas e imunoistoquímicas, o epitélio nos nódulos vocais em relação aos pólipos, ao edema de laringe e às pregas vocais sem lesões macroscópicas. Forma de estudo: Clínico retrospectivo. Material e Método: Por meio de levantamento de prontuário, foram identificados vinte e seis pacientes com lesões laringeas inflamatórias (nódulos, pólipos e edema de laringe), que haviam sido submetidos à cirurgia. Pregas vocais sem alterações macroscópicas foram obtidas a partir de autópsia de cadáveres. Para análise do epitélio, foram realizadas colorações pela técnica da hematoxilina-eosina e do ácido periódico de Schiff e técnicas de imunoistoquímica com anticorpos dirigidos contra laminina e colágeno IV. A leitura das lâminas foi realizada por meio de microscopia óptica. Resultados: Houve maior imunoexpressão de laminina e colágeno IV nos nódulos quando comparados aos pólipos ($p=0,034$ e $p=0,036$, respectivamente), assim como quando comparados às pregas vocais sem lesões macroscópicas ($p=0,019$ e $p=0,021$, respectivamente). Nódulos tendem a apresentar maior espessura da membrana basal, quando utilizamos coloração pela técnica do PAS, em relação aos pólipos ($p=0,102$). O edema de laringe não se diferenciou das demais nas técnicas utilizadas ($p > 0,10$). Conclusões: O Nódulo Vocal diferencia-se dos pólipos, nas três técnicas utilizadas para detecção da membrana basal (PAS, laminina, colágeno IV), e das pregas vocais sem lesões macroscópicas em duas das técnicas utilizadas (laminina e colágeno IV). Edema de laringe não se diferencia das demais lesões, nem de pregas vocais sem lesões macroscópicas, quando utilizadas as técnicas anteriormente descritas, para estudo da membrana basal.

Aim: To evaluate by histological and immunohistochemical methods the epithelial lesions in vocal nodule and correlate with polyp, laryngeal edema and vocal folds without macroscopic lesions. Study design: Chart review. Material and Method: In a retrospective analysis of medical records, twenty-six patients, who underwent microsurgical excision of laryngeal inflammatory lesions (nodules, polyps and laryngeal edema), were identified. Vocal folds without macroscopic lesions were obtained from autopsy. To evaluate epithelial lesions, specimens were stained with H&E, PAS, and with antibodies against laminin and collagen type IV. These specimens were analyzed by light microscopy. Results: Lesions diagnosed as nodules showed more collagen type IV and laminin deposition when compared to polyps ($p=0,034$ and $p=0,036$, respectively) and to vocal folds without macroscopic lesions ($p=0,019$ and $p=0,021$, respectively). Nodules showed basement membranes thicker than polyps on PAS stain ($p=0,102$). Laryngeal edema could not be differentiated from nodules, polyps or vocal folds without macroscopic lesions by PAS, laminin or collagen type IV stain ($p > 0,10$). Conclusion: By histological and immunohistochemical techniques to evaluate epithelium of laryngeal inflammatory lesions we conclude that vocal fold nodule differentiate from polyps on the three techniques used to stain basement membrane (PAS, laminin, collagen IV) and from vocal folds without macroscopic lesions on two techniques used (laminin, collagen IV). Laryngeal edema cannot be differentiated from the others laryngeal lesions, neither from vocal folds without macroscopic lesions, when the techniques before described are used.

¹ Pós-graduanda do Departamento de Otorrinolaringologia e Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de São Paulo – EPM.

² Professor Titular da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

³ Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia e Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Endereço para Correspondência: Rua Ottonis, 684 Vila Clementino 04025-001 São Paulo SP.

Telefax (0xx11) 5539-7723 – E-mail: beatricemjn@hotmail.com

Trabalho apresentado no III Congresso Triológico de Otorrinolaringologia. Rio de Janeiro, outubro de 2003.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Artigo recebido em 05 de março de 2004. Artigo aceito em 20 de maio de 2004.

INTRODUÇÃO

A prega vocal é uma estrutura vibrátil responsável pela produção do som durante a fonação. É composta, fundamentalmente, por músculo e mucosa. A mucosa, por sua vez, é composta por lâmina própria e epitélio escamoso estratificado, em sua borda livre. Uma importante estrutura do epitélio é a membrana basal que se encontra em íntimo contato com a lâmina própria. Observam-se pequenos vasos sanguíneos na mucosa da prega vocal, que correm paralelamente à sua borda livre. Não se notam glândulas na mucosa.^{1,2}

A lâmina própria possui três camadas: superficial, intermediária e profunda. A camada superficial da lâmina própria é também conhecida como espaço de Reinke. É uma camada frouxa e flexível que vibra intensamente durante a fonação. As camadas intermediária e profunda compõem o ligamento vocal. A lâmina própria é composta, principalmente, por matriz extracelular, fibroblastos e vasos sanguíneos. A matriz extracelular é sintetizada pelos fibroblastos e é constituída por colágeno III, elastina, ácido hialurônico e fibronectina.^{1,3,4} Hirano introduziu o conceito "cobertura-corpo", segundo o qual as cinco camadas histológicas da prega vocal são agrupadas em três camadas baseadas nas propriedades mecânicas da prega vocal. Epitélio e camada superficial da lâmina própria constituem a cobertura da prega vocal. As camadas intermediária e profunda da lâmina própria formam a transição, o músculo vocal compõe o corpo. O autor considera o epitélio como uma fina cápsula vibratória capaz de conter a prega vocal durante a fonação.⁵

Membrana basal é uma fina camada de matriz extracelular especializada, sintetizada pelas células epiteliais e fibroblastos da lâmina própria. Faz parte do epitélio e representa a transição para a camada superficial da lâmina própria. Juntamente com o arcabouço fibroso da lâmina própria, forma a sustentação da mucosa da prega vocal. É uma estrutura importante para vibração da mucosa, pois, assim como a lâmina própria, promove elasticidade e, ao mesmo tempo, resistência às pregas vocais.^{4,6,7} A membrana basal normal não é observada, com detalhes, por meio de coloração pela técnica da hematoxilina-eosina, rotineiramente utilizadas na microscopia óptica. Microscopia eletrônica é o melhor meio para estudo desta estrutura. Ultraestruturalmente consiste de três camadas que são denominadas, da superfície para profundidade, lâmina lúcida (ou *pars rara*), lâmina densa (ou lâmina basal), lâmina fibro-reticular (ou sublâmina densa). Sua principal função é a adesão celular, que é realizada por meio das fibras de ancoragem.⁶⁻¹¹ Estudos demonstraram que as fibras de ancoragem partem da lâmina densa para a camada superficial da lâmina própria, onde mudam de direção para voltar à lâmina densa. As fibras de colágeno III da camada superficial da lâmina própria passam através dos "elos" formados pelas fibras de ancoragem, formando

uma "corrente" que adere firmemente o epitélio da prega vocal à lâmina própria.¹² Em relação à sua composição química, técnicas de elétron imunoistoquímica demonstraram que a membrana basal é composta, principalmente, por três tipos de macromoléculas: colágeno IV, laminina e proteoglicano heparan sulfato. Colágeno IV é o responsável pela força e elasticidade da membrana basal, enquanto que laminina e proteoglicano heparan sulfato estão implicados na adesão celular e no controle da passagem de substâncias através da membrana basal. Fibronectina e entactina são glicoproteínas também encontradas na membrana basal, porém não se sabe, ao certo, sua função. Colágeno VII também é encontrado na membrana basal como o principal componente das fibras de ancoragem.^{6,7}

A mucosa da prega vocal pode, por vezes, apresentar lesões em função do trauma mecânico da fonação, assim como de outros tipos de agressão: físicos, químicos e/ou biológicos. Gray et al., através de dois estudos semelhantes, demonstraram histologicamente, por microscopia eletrônica, a presença do trauma fonatório agudo. Utilizando-se métodos artificiais, dois grupos de cães foram submetidos à fonação contínua por duas ou quatro horas. No primeiro estudo, no grupo submetido à fonação por duas horas, demonstraram destruição dos microvilos da superfície celular e aumento da descamação celular. No grupo submetido à fonação por quatro horas, a destruição do epitélio foi mais intensa, com descamação celular quase total. No segundo estudo também demonstraram presença de descamação celular intensa, mas sem comprometimento da camada germinativa do epitélio, da membrana basal ou da lâmina própria, no grupo submetido a duas horas de fonação. Após quatro horas de fonação, observaram maior destruição epitelial, presença de fluido entre a células, destruição das organelas das células remanescentes da superfície celular. Demonstraram, também, presença de fluido entre células basais do epitélio e membrana basal e entre esta e lâmina própria, devido à lesão em nível de fibras de ancoragem, ocasionadas pelo trauma fonatório.^{13,14}

As lesões decorrentes do trauma fonatório, que podem ser caracterizadas como processos inflamatórios, apresentam-se de diversas formas. Destas, as mais comuns são: nódulo vocal, pólipos e edema da laringe. A diferenciação entre elas é muitas vezes difícil, geralmente são rotuladas de acordo com o aspecto macroscópico e dados clínicos. Não há um quadro histopatológico definido para estas lesões laríngeas inflamatórias.

No passado, vários autores já chamavam a atenção para algumas características das lesões laríngeas inflamatórias, bem como para a dificuldade de diagnóstico histológico das mesmas. Ash já relatava a presença de lesões em cordas vocais decorrentes de trauma, as quais chamou de "nodo laríngeo". O "nodo laríngeo" apresentava quatro estágios evolutivos de acordo com achados macroscópicos e histológicos: fibróide, polipóide, varicoso e hialino. Segundo

o autor, não há limite preciso entre os quatro estágios em relação ao quadro histológico, nem mesmo há alteração microscópica patognomônica de cada lesão. Ressaltava, ainda, que o diagnóstico poderia ser firmado por um laringologista experiente, através dos achados clínicos.¹⁵ Fitz-Hugh et al. estudaram, retrospectivamente, trezentas amostras de lesões laríngeas inflamatórias, entre estas lesões estavam os nódulos e os pólipos laríngeos. O nódulo laríngeo foi considerado resposta especializada ao trauma vocal, foi a lesão laríngea inflamatória mais comum. O autor ressaltou a dificuldade em diferenciar clínica e histologicamente nódulos de pólipos laríngeos. O aspecto microscópico de uma mesma lesão foi avaliado por diferentes patologistas e o que um classificou como nódulo, outro pesquisador classificou como pólipo. A mesma dificuldade também era enfrentada pelos laringologistas, já que, clinicamente, as lesões podem ser muito semelhantes, principalmente nódulos e pólipos. Finalizando, ressaltou a importância de patologistas e laringologistas trabalharem em equipe para que um diagnóstico mais preciso possa ser obtido.¹⁶

O trauma fonatório tem sido apontado como o principal fator causal de lesões laríngeas inflamatórias. Nagata et al. analisaram, retrospectivamente, mais de mil pacientes com diagnóstico de nódulo ou pólipo vocal. Concluíram que o principal fator etiológico para pólipos e nódulos vocais é o fonotrauma, não encontrando associação positiva entre tabagismo e as referidas lesões.¹⁷ Lancer et al., em sua revisão sobre nódulos vocais, referiu-se ao trauma fonatório como a principal etiologia para referida lesão. Ressaltou, também, a dificuldade na diferenciação entre pólipos e nódulos vocais e também que nódulos vocais poderiam ser considerados uma subcategoria dos pólipos vocais.¹⁸

Recentemente, alguns autores caracterizaram clínica e histologicamente lesões laríngeas inflamatórias. Hirano caracterizou os nódulos de prega vocal como lesões pequenas esbranquiçadas, sésseis, bilaterais, simétricas, localizadas no ponto médio da prega vocal membranosa, no sentido ântero-posterior, em sua borda livre. Em relação à histologia, refere edema e aumento de fibras colágenas na camada superficial da lâmina própria. Os pólipos vocais apresentam maior diversidade em relação à coloração, tamanho e formato. Podendo ser uni ou bilaterais, freqüentemente localizam-se na porção mediana da prega vocal membranosa, em sua borda livre. Microscopicamente, as alterações localizam-se na camada superficial da lâmina própria e caracterizam-se por sangramento intratecidual, degeneração hialina, trombose, edema, proliferação de fibras colágenas, infiltração de células inflamatórias. No edema da laringe ou Edema de Reinke a prega vocal membranosa encontra-se edemaciada em toda sua extensão, com comprometimento bilateral, mas assimétrico. A principal alteração encontrada à microscopia é edema na camada superficial de lâmina própria.^{2,5}

De acordo com Pontes et al., nódulos, pólipos e edemas são alterações inflamatórias da mucosa das pregas

vocais decorrentes de agentes agressivos, dentre os quais o mais importante é o trauma fonatório. Nódulo Vocal é uma entidade caracterizada pela associação de três fatores: configuração laríngea, tensão muscular e abuso vocal. A associação do padrão feminino ou infantil de laringe com a síndrome de tensão muscular leva a uma fenda triangular médio posterior. O vértice desta fenda triangular localiza-se na transição do terço anterior para médio da borda livre das pregas vocais, onde se concentra a maior parte da energia vibratória durante a fonação. Nesta localização, o fonotrauma causa lesão de aspecto nodular em ambas as pregas vocais; por isso, a entidade clínica é denominada Nódulo Vocal. Macroscopicamente, os nódulos caracterizam-se por serem lesões arredondadas, sésseis, esbranquiçadas, cuja aparência pode variar desde aspecto de edema até fibrose. As alterações microscópicas no Nódulo Vocal localizam-se nas camadas mais superficiais da lâmina própria, e epitélio, onde se observa grau variado de edema e fibrose, mas sem vascularização exuberante.^{19,20}

Os pólipos, diferentemente dos nódulos, apresentam formas e consistências bastante diversas, com grau variado de vascularização, geralmente únicos, localização diversa, porém, restritos a uma pequena área da superfície cordal, podendo ser sésseis ou pediculados. Sabe-se que os pólipos são lesões mais vascularizadas que os nódulos. O trauma fonatório é uma das etiologias do pólipo vocal, mas diferentemente dos nódulos, nesta lesão o fonotrauma não é a etiologia mais comum. Agentes irritantes, alergias, infecções agudas podem contribuir para o aparecimento dos pólipos. Quanto aos aspectos microscópicos, observa-se que as alterações localizam-se mais profundamente na camada superficial da lâmina própria quando comparadas aos nódulos vocais. As alterações epiteliais são pouco freqüentes.^{1,3}

Edema da laringe, também conhecida como Edema de Reinke, corresponde a um edema extenso das pregas vocais, bilateral na maior parte das vezes, fazendo grande saliência na glote. O aspecto extenso da lesão é a característica primordial para distingui-la dos pólipos. O abuso vocal também é responsável pelo aparecimento desta lesão, mas não é uma etiologia tão importante como o é para o Nódulo Vocal, que é considerado típico do trauma vocal. O quadro histopatológico mostra acometimento preferencialmente da camada superficial da lâmina própria (espaço de Reinke). Observa-se aumento da vascularização no local, aumento do fluido extravascular e presença de células inflamatórias no local.^{1-3,21}

Apesar destas diferenças morfológicas e etiológicas, freqüentemente o diagnóstico clínico de nódulo, pólipo e edema da laringe é difícil ou mesmo impossível, necessitando-se, para tanto, de informações quanto aos aspectos microscópicos. Contudo, mesmo do ponto de vista histológico, muitas vezes a diferenciação entre as referidas lesões, como anteriormente descrito, é difícil, ficando todas rotuladas como um processo inflamatório inespecífico. Considerando as di-

versas etiologias, temos na clínica condutas diferentes para cada situação. Assim, é necessário encontrarmos mais elementos que nos permitam o diagnóstico correto.

OBJETIVO

Nosso objetivo, no presente trabalho, é estudar, por meio de técnicas histológicas e imunoistoquímicas, o aspecto do epitélio no Nódulo Vocal em relação a outras duas lesões inflamatórias laríngeas – pólipos e edema da laringe – bem como em relação à prega vocal sem lesões macroscópicas.

MÉTODO

As lesões por nós estudadas neste trabalho – pólipos, nódulos e edema de laringe – foram obtidas a partir de levantamento de prontuário de pacientes atendidos no Instituto da Laringe no período de 1995 a 2001. O diagnóstico da lesão foi confirmado através de revisão do exame videoestroboscópico, cujas imagens estavam arquivadas em fitas de vídeo.

Neste estudo foram considerados somente os nódulos encontrados na entidade clínica definida como Nódulo Vocal. Não foram incluídos nódulos de outras etiologias. Nódulos Vocais caracterizam-se como lesões arredondadas, sésseis, esbranquiçadas, associadas à fenda triangular médio-posterior, localizadas na transição de terço anterior para médio de pregas vocais, no vértice da fenda triangular, bilaterais, simétricas ou não, e móveis com a onda mucosa durante a fonação. (Figuras 1 e 2)

Caracterizamos pólipos como lesões unilaterais, sésseis ou pediculadas, móveis à fonação, mas sem sincronia com a onda mucosa, com aparência gelatinosa, que clinicamente apresentavam grau de vascularização variado. (Figuras 3 e 4).

Edema da laringe ou Edema de Reinke corresponde a um edema difuso que ocupa toda prega vocal e faz saliência para a glote, muito móvel à fonação, bilateral, simétrico ou não. (Figura 5).

O nosso material foi composto por vinte e seis lesões laríngeas inflamatórias provenientes de vinte e seis pacientes. A idade média dos pacientes foi 36,5 anos, variando de 4 a 66 anos. Em relação ao sexo, 12 (46%) eram homens e 14 (54%) mulheres. Das vinte e seis lesões laríngeas, nove eram nódulos vocais, oito eram pólipos e nove edemas de laringe. No Nódulo Vocal foi analisado aleatoriamente apenas um dos nódulos. Como parte do material foram incluídas quatro pregas vocais obtidas a partir de autópsia de quatro cadáveres, sem antecedentes de doença laríngea ou intubação orotraqueal prolongada, e que, macroscopicamente, não apresentavam lesões. Este grupo, considerado controle, foi composto por dois homens e duas mulheres, com idade entre quinze e sessenta anos.

Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia pelo mesmo médico otorrinolaringologista, no período de 1995 a 2001. No Nódulo Vocal, indicou-se cirurgia nos casos que não melhoraram após três meses de fonoterapia.

Após a exérese cirúrgica, as lesões foram fixadas em formalina líquida tamponada (10%) e, após 24 horas, emblocadas em parafina líquida. Os blocos de parafina foram obtidos a partir de arquivo de laboratório de anatomia patológica. No grupo controle, as laringes excisadas foram fixadas em formalina líquida tamponada (10%) e a porção média das pregas vocais foi dissecada e emblocada em parafina líquida. Posteriormente, efetuaram-se cortes de cinco micrômetros de espessura, que foram estendidos em lâmina de vidro. Nestes cortes procedeu-se à coloração pelas técnicas da hematoxilina e eosina (H&E) e do ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação microscópica. A reação de imunoistoquímica foi realizada pela técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase.²² Cortes de três micrômetros de espessura, estendidos em lâminas de vidro, foram submetidos aos seguintes anticorpos: antilaminina, anticolágeno tipo IV. (Dako Corp. USA).

A leitura das lâminas foi realizada pelo mesmo patologista por meio de microscopia óptica. Entraram para o estudo somente espécimes que apresentavam epitélio (porção celular e membrana basal) íntegro. Para análise das variáveis morfológicas do epitélio, utilizou-se as lâminas coradas pela técnica da hematoxilina-eosina e do PAS. Os aspectos morfológicos analisados foram: hiperplasia epitelial, queratose, acantose, paraqueratose, disqueratose, discariose. Definiu-se hiperplasia epitelial como aumento difuso de toda espessura do epitélio; queratose como aumento de espessura do estrato superficial, com queratinização; acantose como aumento de espessura do estrato malpighiano; paraqueratose como aumento de espessura do estrato superficial, com queratinização incompleta; disqueratose como queratinização isolada de células epiteliais, independente do estrato onde esteja localizada; discariose como atipia nuclear, com variação de diâmetro, irregularidade da distribuição da cromatina e alteração de colorabilidade. Utilizou-se metodologia semiquantitativa, avaliando-se cada item quanto à sua intensidade e classificando-se a alteração subjetivamente, como:

- Grau 0 ou ausente: alteração ausente
- Grau 1: alteração presente em pequena intensidade
- Grau 2: alteração presente em moderada intensidade
- Grau 3: alteração presente em grande intensidade.

As lesões classificadas como grau três foram as que apresentaram maior intensidade da alteração quando comparadas às outras lesões da nossa amostra.

Tanto nos cortes corados pelas técnicas do PAS quanto nos submetidos à metodologia imunoistoquímica, a membrana basal foi medida utilizando-se microscopia óptica com ocular de 10x e objetiva de 40x. Foi efetuada a medida



Figura 1. Nódulo vocal. Pregas vocais em adução.



Figura 2. Nódulo vocal. Pregas vocais em abdução.



Figura 3. Pólipo angiomaso. Pregas vocais em adução.



Figura 4. Pólipo angiomaso. Pregas vocais em abdução.



Figura 5. Cordite edematosa. Pregas vocais em abdução.

colocando-se, sobre o preparado, régua microscópica calibrada e com divisões em centésimos de milímetros (0,01mm). Houve amostras em que a membrana basal não pôde ser identificada em todas as três técnicas utilizadas (PAS, laminina, colágeno IV), devido à ausência de material suficiente para análise, bastando ter sido identificada em pelo menos uma delas para ser elegível para o estudo.

Foi calculada a média das espessuras das membranas basais para cada diagnóstico, a partir das medidas obtidas em cada uma das três técnicas utilizadas.

Para verificar a associação entre as variáveis morfológicas do epitélio com pólipo, nódulo e edema de laringe, empregou-se uma extensão de teste exato de Fisher.²³ Consideramos níveis descritivamente estatisticamente significantes valores menores ou iguais a 0,10 ("p" menor ou igual a 0,10). Valores significantes serão marcados com negrito nos resultados.

Para verificar a associação entre as lesões laríngeas inflamatórias e pregas vocais sem lesões macroscópicas com a espessura da membrana basal na coloração pela técnica do PAS e da imunistoquímica, utilizou-se análise de variância com um fator fixo seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey.²⁴ Consideramos níveis descritivos estatisticamente significantes valores menores ou iguais a 0,10 ("p" menor ou igual a 0,10). Valores significantes serão marcados com negrito nos resultados.

Tabela 1. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de hiperplasia epitelial de 1 a 3

Diagnóstico	Hiperplasia epitelial				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	2	6	1	0	9
Nódulo	2	5	2	0	9
Pólipo	2	6	0	0	8
Sem lesões	0	4	0	0	4
Total	6	21	3	0	30

Tabela 3. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de acantose de 1 a 3

Diagnóstico	Acantose				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	1	6	1	1	9
Nódulo	2	6	1	0	9
Pólipo	1	7	0	0	8
Sem lesões	0	4	0	0	4
Total	4	23	2	1	30

Tabela 5. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de disqueratose de 1 a 3

Diagnóstico	Disqueratose				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	2	5	2	0	9
Nódulo	3	5	1	0	9
Pólipo	1	6	1	0	8
Sem lesões	0	4	0	0	4
Total	6	20	4	0	30

RESULTADOS

Nas Tabelas de 1 a 6 encontramos a análise descritiva dos resultados em relação às variáveis morfológicas do epitélio. A Tabela 7 mostra análise descritiva dos dados, relacionando a medida da espessura da membrana basal na coloração pela técnica do PAS, e na imunistoquímica para detecção de laminina e colágeno IV, com os diversos diagnósticos.

Tabela 2. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de queratose de 1 a 3

Diagnóstico	Queratose				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	2	5	2	0	9
Nódulo	2	5	2	0	9
Pólipo	1	4	3	0	8
Sem lesões	0	0	4	0	4
Total	5	14	11	0	30

Tabela 4. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de paraqueratose de 1 a 3

Diagnóstico	Paraqueratose				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	5	3	1	0	9
Nódulo	5	4	0	0	9
Pólipo	4	1	3	0	8
Sem lesões	0	4	0	0	4
Total	14	12	4	0	30

Tabela 6. Número de pacientes segundo diagnóstico e grau de discariose de 1 a 3

Diagnóstico	Discariose				Total
	ausente	1	2	3	
Edema de laringe	4	5	0	0	9
Nódulo	4	5	0	0	9
Pólipo	4	3	1	0	8
Sem lesões	4	0	0	0	4
Total	16	13	1	0	30

Tabela 7. Número de pacientes com membrana basal identificável pelo PAS e por métodos imunoistoquímicos nos diversos diagnósticos e dados relativos à sua espessura obtida em milímetros

Diagnóstico		PAS	Laminina	Colágeno IV
Edema de laringe	N	8	8	9
	Média	0,003	0,003	0,003
	Desvio-padrão	0,001	0,002	0,002
	Mínimo	0,001	0,001	0,001
	Máximo	0,005	0,005	0,005
Nódulo	N	8	8	8
	Média	0,003	0,003	0,003
	Desvio-padrão	0,002	0,001	0,001
	Mínimo	0,001	0,001	0,001
	Máximo	0,005	0,005	0,005
Pólipo	N	8	8	8
	Média	0,002	0,002	0,002
	Desvio-padrão	0,001	0,001	0,001
	Mínimo	0,001	0,001	0,001
	Máximo	0,003	0,003	0,003
Sem lesões	N	4	4	4
	Média	0,002	0,001	0,001
	Desvio-padrão	0	0	0
	Mínimo	0,002	0,001	0,001
	Máximo	0,002	0,001	0,001

Como mostrou a Tabela 8, não houve associação entre as variáveis morfológicas do epitélio e as lesões laringeas inflamatórias avaliadas, ou seja, não se pode diferenciar nódulo, pólipo e edema de laringe baseando-se nas alterações morfológicas do epitélio ($p > 0,10$).

Houve maior imunoexpressão de laminina e de colágeno IV na membrana basal dos nódulos quando comparadas a dos pólipos ($p=0,034$ e $p=0,036$, respectivamente), assim como quando comparadas a das pregas vocais sem lesões macroscópicas ($p=0,019$ e $p=0,021$, respectivamente). Nódulos tendem a apresentar maior espessura da membrana basal, quando utilizamos a coloração PAS, em relação aos pólipos ($p=0,102$). A membrana basal na edema de laringe não se diferenciou das demais quanto à coloração PAS, ou quanto à imunoexpressão de laminina e colágeno IV (Tabela 9).

Tabela 8. Resultados do estudo da associação entre diagnóstico e variável morfológica epitelial

Variável morfológica epitelial	Nível descritivo (p)
Hiperplasia epitelial	0,688
Queratose	0,999
Acantose	0,999
Paraqueratose	0,321
Disqueratose	0,919
Discariose	0,913

Teste exato de Fisher: $p < 0,10$

DISCUSSÃO

Uma das principais funções da membrana basal é a adesão celular, uma estrutura importante para integridade do epitélio da prega vocal. Dos seus componentes, os que mais estão relacionados com adesividade celular são colágeno IV e laminina. As lesões laringeas inflamatórias são decorrentes de diferentes tipos de trauma, assim esperávamos encontrar alterações na membrana basal que diferenciasses as referidas lesões. Decidiu-se por estudar colágeno IV e laminina porque são estes os componentes mais importantes na adesão entre epitélio e lâmina própria.^{6,7}

A membrana basal é uma estrutura muito pequena que tem pouca definição na microscopia óptica. No nosso estudo optamos por este método porque a finalidade foi pesquisar alterações microscópicas que caracterizassem o quadro histopatológico das lesões laringeas inflamatórias, utilizando métodos e colorações acessíveis na clínica diária.

Segundo Hirano, um dos princípios da fonocirurgia em lesões inflamatórias laringeas é a menor manipulação possível das pregas vocais, que deve resultar em mínima superfície cruenta. A finalidade é preservar a lâmina própria, principalmente a camada superficial, para evitar-se aderência epitelial entre as pregas vocais. Como nosso material foi proveniente de microfococirurgia, não obtivemos lâmina própria passível de ser estudada, o que nos fez restringir nosso estudo ao epitélio.⁵

Tabela 9. Análise da associação entre diagnóstico e espessura da membrana basal na coloração PAS e na imunistoquímica para laminina e colágeno IV

Variável	Grupos comparados	Nível descritivo (p)
PAS	EL x Nódulo	0,980
	EL x Pólipo	0,147
	Nódulo x Pólipo	0,102
	EL x Sem lesões	0,450
	Nódulo x Sem lesões	0,359
	Pólipo x Sem lesões	0,999
LAMININA	EL x Nódulo	0,610
	EL x Pólipo	0,224
	Nódulo x Pólipo	0,034
	EL x Sem lesões	0,116
	Nódulo x Sem lesões	0,019
	Pólipo x Sem lesões	0,801
COLÁGENO IV	EL x Nódulo	0,422
	EL x Pólipo	0,344
	Nódulo x Pólipo	0,036
	EL x Sem lesões	0,185
	Nódulo x Sem lesões	0,021
	Pólipo x Sem lesões	0,808

Legenda: EL= edema de laringe
Análise de variância: $p < 0,10$

Feita esta análise, não poderíamos deixar de correlacionar nossos achados com alguns aspectos da literatura. Na nossa amostra, os pacientes com diagnóstico de Nódulo Vocal eram todos mulheres e crianças. Pelo próprio conceito de Nódulo Vocal, sabemos que estes são excepcionalmente encontrados em homens.^{19,20} A literatura aponta uma incidência maior de pólipos em homens do que em mulheres, o que também foi por nós observado neste estudo.^{17,25}

Vários tipos de alterações morfológicas epiteliais foram observados nas lesões laringeas inflamatórias neste estudo: hiperplasia, queratose, acantose, paraqueratose, disqueratose e discariose. Não pudemos, porém, diferenciar nódulo, pólipo e cordite edematosa, baseados nestas alterações. Kambic et al. estudaram retrospectivamente amostras de pólipo de corda vocal. Vários tipos de alterações epiteliais foram observadas, desde atrofia severa, até vários graus de hiperplasia, com ou sem queratose. Não houve alteração epitelial patognomônica no pólipo vocal. Segundo os autores, a distinção entre nódulo e pólipo dependeria da experiência pessoal do patologista, já que as duas lesões apresentam alterações histológicas muito semelhantes entre si.²⁶ Loire et al. estudaram lesões laringeas inflamatórias, através de microscopia óptica, e encontraram nos nódulos vocais vários tipos de alterações morfológicas epiteliais, entre as quais as mais comuns foram: disqueratose (82%) e paraqueratose (66%). Nos pólipos vocais e cordite edematosa observaram alterações epiteliais menos características e em uma frequência menor do que as encontradas nos nódulos vocais: atrofia ou acantose do epitélio nos casos de pólipos

ou espessamento irregular nos casos de edema de laringe.²⁷ Kotby et al. observaram, através de microscopia eletrônica, presença de espessamento epitelial em nódulos e pólipos vocais, sendo mais freqüente nos primeiros.²⁵ Dikkers, Nikkels estudaram lesões laringeas inflamatórias, através de microscopia óptica e eletrônica, e observaram hiperqueratose e paraqueratose em intensidade variada. Concluíram que as alterações epiteliais não têm valor, como alteração histológica isolada, para caracterizar uma lesão laringea inflamatória.²⁸

Como citado anteriormente, Hirano introduziu o conceito "cobertura-corpo", onde considera o epitélio como uma fina cápsula vibratória capaz de conter a prega vocal durante a fonação. Um espessamento na membrana basal levaria a uma alteração nesta capacidade vibratória do epitélio, acarretando disfonia.⁵

Neste estudo, a membrana basal nos Nódulos Vocais encontrou-se espessada em relação aos pólipos e em relação à membrana basal do epitélio de pregas vocais normais, quando utilizada a coloração PAS. Houve, também, maior imunoexpressão de colágeno IV e laminina na membrana basal nos nódulos vocais quando comparadas aos pólipos e ao epitélio de pregas vocais normais. Tal achado demonstra uma desorganização da membrana basal nesta lesão, que é considerada uma resposta típica ao fonotrauma, evidenciada pela maior deposição de colágeno IV e laminina, moléculas responsáveis pela adesão celular. O nosso trabalho contribuiu para demonstrar a participação da laminina no espessamento da membrana basal de nódulos, o que, até então, não havia sido descrito na literatura.

Muitos autores já relataram alterações da membrana basal em lesões laringeas inflamatórias. Loire et al., utilizando microscopia óptica, detectaram espessamento da membrana basal nos nódulos, já nos pólipos ocorreu adelgaçamento da membrana basal.²⁷ Kotby et al. analisaram, através de microscopia eletrônica, amostras de pólipos e nódulos vocais. Relataram desorganização da membrana basal tanto em nódulos como em pólipos, sendo maior nos primeiros.²⁵ Gray et al. estudaram ultraestruturalmente a membrana basal em nódulos vocais e demonstraram um total desarranjo da arquitetura da membrana basal.⁸ Posteriormente, Gray et al. ressaltaram a presença de aberrações na membrana basal de nódulos vocais: duplicação da membrana basal, desorganização de sua arquitetura, maior imunexpressão de colágeno IV.⁴ Já nos pólipos vocais as maiores alterações parecem estar restritas à lâmina própria. Dikkers, Nikkels caracterizaram microscopicamente o nódulo vocal como uma combinação de espessamento de membrana basal com ausência de hemorragia ou edema; já os pólipos correspondem a uma combinação de sinais de sangramento, recente sem muitas alterações na membrana basal.²⁸ Gray et al. e Courey et al. estudaram lesões laringeas inflamatórias, através de microscopia óptica, e relataram espessamento da membrana basal nos nódulos vocais, devido a maior deposição de colágeno IV, por outro lado, a membrana basal nos pólipos vocais apresentou espessura mais próxima do normal.^{29,30}

No presente trabalho, o edema de laringe não se diferenciou das outras lesões inflamatórias, nem mesmo das pregas vocais sem lesões macroscópicas, em relação às alterações de membrana basal. Gray et al. concluíram que edema de laringe e pólipo apresentam membrana basal normal, estando as alterações microscópicas localizadas, principalmente, na lâmina própria.²⁹ Dikkers, Nikkels caracterizaram edema de laringe, por meio de microscopia óptica e eletrônica, como uma combinação de espessamento de membrana basal com presença de edema, sinais de sangramento e espessamento de vasos na submucosa.²⁸ Courey et al. encontraram no edema de laringe membrana basal com poucas alterações.³⁰

O diagnóstico clínico de nódulo e pólipo, baseado em alterações do exame endoscópico, torna-se muitas vezes difícil, pois nem sempre estas lesões apresentam com clareza as diferenças conceituais, como anteriormente exposto. De acordo com nossos resultados, a diferenciação entre estas duas lesões, pela microscopia óptica, é clara. Assim, considerando nosso objetivo, podemos afirmar que, se na microscopia óptica forem utilizadas coloração pelo PAS e imunoistoquímica para laminina e colágeno IV para detecção de membrana basal, será possível ter informações relevantes para o diagnóstico final das lesões.

CONCLUSÕES

Do estudo da diferenciação histológica do Nódulo Vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe, base-

ada em alterações da membrana basal, evidenciadas por meio da coloração pela técnica do PAS e por técnicas de imunoistoquímica para detecção de laminina e colágeno IV, podemos concluir que o Nódulo Vocal diferencia-se dos pólipos nas três técnicas utilizadas e do epitélio das pregas vocais sem lesões macroscópicas quanto à imunexpressão de laminina e colágeno IV. Edema de laringe não se diferencia das demais lesões, nem de pregas vocais normais, quando utilizadas as técnicas acima descritas para estudo da membrana basal. Na porção celular do epitélio, não foram encontradas diferenças entre os vários diagnósticos clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirano M. Structure of Vocal Fold in Normal and Disease States. *Anatomical and Physical Studies*. ASHA Rep 1981; 11: 11-30.
2. Hirano M. Surgical Anatomy and Physiology of the Vocal Folds. In: Gould WM, Sataloff RT, Spiegel JR, editors. *Voice Surgery*. St Louis: Mosby; 1993. p. 135-58.
3. Colton RH, Casper JK, Hirano M. Laryngeal Histopathology. In: Colton RH, Casper JK, Hirano M. *Understanding Voice Problems. A Physiological Perspective for Diagnosis and Treatment*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 51-72.
4. Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and Cellular Structure of Vocal Fold Tissue. In: Titze JR, editor. *Vocal Fold Physiology: Frontiers in Basic Science*. San Diego: Singular Publishing Group; 1993. p. 1-35.
5. Hirano M. Phonosurgical Anatomy of the Larynx. In: Ford CN, Bless DM, editors. *Phonosurgery: Assessment and Surgical Management of Voice Disorders*. New York: Raven Press; 1991. p. 25-41.
6. Abrahamson DR. Recent Studies on the Structure and Pathology of Basement Membranes. *J Pathol* 1986; 149: 275-8.
7. Leblond CP, Inoue S. Structure, Composition, and Assembly of Basement Membrane. *Am J Anat* 1989; 185: 367-90.
8. Gray SD. Basement Membrane Zone Injury in Vocal Nodules. In: Gauffin J, Hammarberg B, editors. *Vocal Fold Physiology*. San Diego: Singular Publishing Group, Inc.; 1991. p. 21-7.
9. Dikkers FG, Hulstaert CE, Oosterbaan JA, Cervera-Paz FJ. Ultrastructural Changes of the Basement Membrane Zone in Benign Lesions of Vocal Folds. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1993; 113: 98-101.
10. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Cell Junctions, Cell Adhesion, and Extracellular Matrix. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J, editors. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York: Garland; 1997. p. 949 - 1009.
11. Seung-Ho C, Hyung-Tae K, Min-Sik K, In-Ja L, Han-Jong P. Influence of Phonation on Basement Membrane Zone Recovery After Phonomicrosurgery: A Canine Model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 658-66.
12. Gray SD, Pignatari SSN, Harding P. Morphologic Ultrastructure of Anchoring Fibers in Normal Vocal Fold Basement Membrane Zone. *J Voice* 1994; 8: 48-52.
13. Gray DS, Titze I, Lusk RP. Electron Microscopy of Hyperphonated Canine Vocal Cords. *J Voice* 1987; 1: 109-15.
14. Gray DS, Titze I. Histologic Investigation of Hyperphonated Canine Vocal Cords. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97: 381-8.
15. Ash JE, Schwartz L. The Laryngeal (vocal cord) node. *Trans Amer Acad Ophthal Otolaryngol* 1944; 48: 323-32.
16. Fitz-Hugh GS, Smith DE, Chiong AT. Pathology of Three Hundred Clinically Benign Lesions of the Vocal Cords. *Laryngoscope* 1958; 68: 855-75.

-
17. Nagata K, Shigejiro K, Yasumoto S, Maeda T, Kawasaki H, Hirano M. Vocal Fold Polyps and Nodules. A 10-year review of 1.156 patients. *Auris Nasus Larynx* 1983; 10 (suppl.): 27-35.
 18. Lancer JM, Syder D, Jones AS, LE Boutillier A. Vocal Cord Nodules: a review. *Clin Otolaryngol* 1988; 13: 43-51.
 19. Pontes P, Behlau M. Exame Laringológico. In: Pontes P, Behlau M, editores. *Avaliação e Tratamento das disfonias*. São Paulo: Lovise; 1995. p. 143-67.
 20. Pontes P, Kyrillos L, Behlau M, De Biase N, Pontes A. Vocal Nodules and Laryngeal Morphology. *J Voice* 2002; 16: 408-14.
 21. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Electron Microscopic and Immunohistochemical Investigation of Reinke's Edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108: 1068-72.
 22. Taylor CR, Cooper LR, Kurman RJ. Immunoperoxidase technique. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-21.
 23. Agresti, A. *Categorical data analysis*. New York: Wiley Interscience; 1990.
 24. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Boston: Irwin; 1996.
 25. Kotby MN, Nassar AM, Seif EI, Helal EH, Saleh MM. Ultrastructural Features of Vocal Fold Nodules and Polyps. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1988; 105: 477-82.
 26. Kambic V, Radšiel Z, Žargi M, Ačko M. Vocal Cord Polyps: Incidence, Histology and Pathogenesis. *J Laryngol Otol* 1981; 95: 609-18.
 27. Loire R, Bouchayer M, Cornut G, Bastian RW. Pathology of Benign Vocal Fold Lesions. *Ear Nose Throat J* 1988; 67: 357-62.
 28. Dikkers FG, Nikkels PGJ. Benign Lesions of the Vocal Folds: Histopathology and Phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 698-703.
 29. Gray SD, Hammond E, Hanson DF. Benign Pathologic Responses of the Larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 13-8.
 30. Courey MS, Scott MA, Shohet JA, Ossoff RH. Immunohistochemical characterization of Benign Laryngeal Lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 525-31.