

Flavio Akira Sakae

**Distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras
elásticas na camada superficial da lâmina própria da
prega vocal com edema de Reinke**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sakae, Flavio Akira

Distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas na camada superficial da lâmina própria da prega vocal com edema de Reinke / Flavio Akira Sakae. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Domingos Hiroshi Tsuji.

Descritores: 1.Edema laríngeo 2.Colágeno 3.Tecido elástico 4.Membrana mucosa
5.Cordas vocais

USP/FM/SBD-146/08

"O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar."

Albert Einstein

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Masao e Junko, por tudo que fazem por mim, pelo apoio incondicional e amor eterno. São os meus ídolos.

A minha esposa, Renata, amor da minha vida, pela alegria de viver, companheirismo e incentivo constante.

A minha irmã, Cristiane, por ter contribuído em todos os passos de minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji pela oportunidade e apoio na concretização deste sonho. Sua amizade e franqueza foram essenciais na elaboração deste trabalho. É o grande mestre.

Ao Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes pelos ensinamentos otorrinolaringológicos, pelas diversas oportunidades que ajudaram na minha formação e por tudo que faz na nossa clínica.

Ao Dr. Rui Imamura foi fundamental na minha formação médica, a quem tenho uma grande admiração e respeito. Como sempre me ajudou muito, agradeço pela co-orientação sincera e valiosa desta tese.

Aos Prof(s). Dr. Aroldo Miniti e Dr. Ricardo Ferreira Bento por desenvolverem um trabalho árduo, de muita coragem e perseverança em nossa especialidade.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan é o maior exemplo de sabedoria e humildade, agradeço a todos os seus ensinamentos e conversas amigas nos corredores do Hospital.

Ao Prof. Dr. Silvio Marone admiro pela sua bondade e liderança. Agradeço pelo total apoio, confiança e amizade desde o período em que ingressei no serviço da PUC de Campinas.

A Dra. Thais Mauad, Prof^a. Associada do Departamento de Patologia da FMUSP, pela amizade e ajuda imensa na elaboração dos artigos deste trabalho e ao Dr. Luiz Fernando Ferraz, médico patologista, que me ajudou na leitura das lâminas.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva por ter permitido a realização deste estudo no seu departamento e pela ajuda entusiástica no estudo histológico deste trabalho.

Aos Dr(s) Christian Wiikimann e Ronaldo Frizzarini, grandes amigos e companheiros de laringologia, agradeço imensamente em tudo que me ensinaram e ajudaram. Foram essenciais na concretização deste trabalho.

Aos Dr(s). Ali Mahmoud e Gustavo Passerotti, amigos fiéis e ótimos companheiros de fellowship. Agradeço na ajuda para a captação das amostras deste trabalho durante as longas quintas-feiras no centro cirúrgico.

Ao Dr. Rogério Bühler pela ajuda em várias etapas deste estudo, tornou-se um grande amigo.

Aos Prof(s). Dr. Edigar Rezende de Almeida, Dr. Richard Voegels, Dr. Ivan Dieb Mizziara e Dra Patricia Santoro que são referências em suas áreas e foram essenciais com suas opiniões verdadeiras em várias etapas da minha formação.

Aos Dr(s). Erich Cristiano Mardruga de Melo e João Aragão Ximenez que desenvolveram trabalhos brilhantes no grupo de laringe que possibilitou o surgimento deste nosso estudo. Além disso, mesmo distantes estão sempre disponíveis para uma ajuda amiga.

Ao amigo Dr. Bernardo Filho e a amiga Dra. Adriana Hachiya que vivenciaram momentos importantes na minha formação médica com muito companheirismo e amizade.

Aos amigos e amigas, Dra. Luciana Miwa, Dra. Raquel Tavares, Dra. Clarissa Komatsu, Dr. Felipe Fortes, Dr. Fernando Sasaki, Dr. Daniel Chung, Dr. Flavio Prado e Dr. Fabio Pinna que dividiram as dificuldades e alegrias durante a residência médica.

Aos médicos e fonoaudiólogas do grupo de laringe, Dra. Saramira Bohadana, Dra. Natasha Mascarenhas, Dr. Rafael Cahali, Dr. Henry Ugadin, Dr. Luiz Antônio Figueiredo, Fg. Gabriela, Fg. Maysa e Fg. Márcia que contribuem para o sucesso do grupo e sempre foram solidários e amigos.

A todos os residentes e ex-residentes do Hospital das Clínicas da FMUSP e da PUC de Campinas que me ajudaram e apoiaram na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Chao Lung Wen e a Gustavo Zagatto, da Disciplina de Telemedicina da FMUSP, pelas animações e ilustrações deste trabalho.

As secretárias do Departamento de Otorrinolaringologia Márcia, Luci, Barbara e Edzira pela ajuda, amizade e carinho durante todo o período que passei no Hospital.

Aos funcionários do Ambulatório de Otorrinolaringologia Marcos, Cidinha, Claudecy, Rita, Rosângela e Jorge por terem sido muito disponíveis e pacientes.

A todos os pacientes que participaram deste estudo pela solidariedade que tiveram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo
apoio financeiro: Processo 140957/2005-7.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

Normas para publicação: “The Laryngoscope”

Artigo aceito para publicação em revista indexada internacional

Artigo para publicação em revista indexada internacional

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos principais.....	3
1.2 Objetivos secundários.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Histologia da camada superficial da lâmina própria ou espaço de Reinke.....	4
2.2 Edema de Reinke e alterações histológicas da lâmina própria.....	11
2.3 Métodos de coloração: Picrossírus-polarização e resorcina-fucsina de Weigert.....	17
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
3.1 Casuística.....	20
3.1.1 Seleção dos pacientes com Edema de Reinke.....	20
3.1.2 Técnica cirúrgica para retirada das amostras de Edema de Reinke.....	22

3.1.3 Seleção das amostras controles e isolamento das pregas vocais	
das laringes excisadas.....	23
3.2 Preparações histológicas.....	24
3.3 Análises histológicas.....	24
3.4 Análises das imagens.....	25
3.5 Análises estatísticas.....	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Características dos pacientes com edema de Reinke	
e dos indivíduos controles.....	27
4.2 Distribuição das fibras colágenas.....	27
4.3 Distribuição do sistema de fibras elásticas.....	37
4.4 Correlações da idade, do consumo de cigarro e do tempo de disфонia com o grau	
de desestruturação das fibras	43
4.5 Diferenças entre o edema de Reinke grau II e III.....	44
5 DISCUSSÃO.....	45
5.1 Edema de Reinke, distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras	
Elásticas.....	45
5.2 Edema de Reinke, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento.....	50
5.3 Edema de Reinke e outros componentes da matriz extracelular.....	59
6 CONCLUSÕES.....	63
7 ANEXO.....	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
Bibliografia consultada	

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR	Argyrophilic Nucleolar Organizer Region
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
DVD	Digital Vídeo Disc
ed.	edição
ER	Edema de Reinke
et al.	e outros
GP	Glicoproteína
HC FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-Eosina
nm	nanômetro
p	nível de significância
PG	Proteoglicana
r	valor calculado do coeficiente de correlação de <i>Pearson</i>
SPSS	Statistical Package for Social Sciences

RESUMO

Sakae, F.A. *Distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas na camada superficial da lâmina própria da prega vocal com Edema de Reinke* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 78 p.

A fisiopatologia do edema de Reinke ainda permanece desconhecida e poucos estudos abordam sobre as alterações das proteínas fibrosas, colágeno e elastina, na matriz extracelular da prega vocal com edema de Reinke. Por isso, este estudo foi idealizado para descrever a distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas do espaço de Reinke com edema de Reinke comparando com a prega vocal normal e com a severidade do edema. Foram obtidas 20 amostras de pregas vocais de indivíduos com edema de Reinke, sendo nove casos com edema de Reinke grau II e 11 casos grau III. Dezesete indivíduos eram do sexo feminino e três do sexo masculino, com idade variando de 47 a 62 anos ($55 \pm 4,4$ anos). Quinze pacientes eram tabagistas e cinco ex-tabagistas, média e desvio padrão de $22 \pm 10,7$ maço/ano. O tempo de disfonia apresentou média e desvio padrão de $36 \pm 16,6$ meses. Dez pregas vocais normais de laringes humanas excisadas foram utilizadas como controles. Os métodos da Picrossírius-polarização e da Resorcina-fucsina de Weigert com oxidação prévia pelo oxone 10% foram empregados para visualização das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas, respectivamente. Uma avaliação semiquantitativa foi utilizada para categorizar os resultados histológicos que foram correlacionados com a idade, consumo de cigarro, tempo de disfonia e com a severidade do edema. Evidenciou-se que o arranjo entrelaçado das fibras colágenas semelhante a uma “cesta de vime” observado em pregas vocais normais estava desestruturado no edema de Reinke. A desestruturação foi caracterizada por um afastamento das fibras, fragmentação, formando áreas esparsas e tomadas por um estroma mixóide de quantidade variável. Todos os casos de edema de Reinke mostraram uma maior preservação do arranjo das fibras colágenas próximo ao epitélio da prega comparada com as fibras da camada mais profunda do espaço de Reinke. O arranjo do sistema de fibras elásticas formado por fibras finas e onduladas paralelas à membrana basal do epitélio e uma rede de fibras mais finas, logo abaixo da membrana basal do epitélio observado em pregas vocais normais estava desestruturado no edema de Reinke. Na avaliação semiquantitativa observou-se que moderada e intensa desestruturação ocorreram em 90% dos casos com relação às fibras colágenas e em todos os casos para o sistema de fibras elásticas. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a idade e o grau de desestruturação das fibras colágenas ($r=0,47$, $p=0,037$). Houve diferenças estatisticamente significantes entre os edemas grau II e III quanto à desestruturação das fibras colágenas ($p=0,007$) e quanto à idade ($p=0,036$). Observamos com este estudo que as alterações nas proteínas fibrosas presentes no edema de Reinke podem contribuir com a deformidade da prega vocal.

Descritores: edema laríngeo; colágeno; tecido elástico; membrana mucosa; cordas vocais

SUMMARY

Sakae, F.A. Distribution of collagen fibers and elastic system fibers in the superficial layer of the lamina propria of the vocal fold with Reinke's edema [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 78 p.

The physiopathological mechanisms underlying Reinke's edema are still unknown and few studies addressed alterations in the fibrillar proteins, collagen and elastin, in extracellular matrix with Reinke's edema. This study was idealized to describe the distribution of collagen fibers and elastic system fibers in Reinke's space with Reinke's edema, comparing with normal vocal fold and with the severity of Reinke's edema. Twenty surgical vocal fold specimens were obtained from patients with Reinke's edema, nine cases presented grade II severity and 11 cases grade III. Seventeen subjects were females and three were males, ranging in age from 47 to 62 years (mean±SD 55 ± 4.4 years). Fifteen patients were smokers and five ex-smokers, mean±SD of 22 ± 10.7 pack-years. The duration of dysphonia ranged from 6 to 60 months (mean of 36 ± 16.6 months). Ten vocal folds from human larynges of nonsmokers cadavers were used as normal controls. The Picrosirius polarization method and the Weigert's resorcin-fuchsin stain after oxidation with 10% aqueous oxone were used for visualization of collagen fibers and the elastic system fibers, respectively. Findings were categorized semiquantitatively and correlated with age, cigarette smoking, duration of dysphonia and Reinke's edema severity. The intertwined network of collagen fibers resembling a wicker-basket found in normal vocal folds was disarranged in Reinke's edema. Disarrangement of collagen fibers was characterized by loosely arranged and fragmented fibers intermixed with varying amounts of myxoid stroma. All cases showed a better preservation of collagen fibers arrangement closer to the epithelium compared to fibers of the deeper of the Reinke's space. The elastic system fibers arrangement formed by a delicate network of thin and undulated fibers arranged in parallel to the epithelial basement membrane and a network of thinner fibers immediately below the basement membrane was disarranged. The semiquantitatively analysis showed that moderate and large areas of disarrangement of collagen fibers were found in 90% of cases and in all cases for elastic fibers. Age was significantly correlated with collagen fiber disarrangement ($r=0.47$, $p=0.037$). There was a statistical difference in collagen disarrangement ($p = 0,007$) and age ($p=0,036$) between grade II and grade III severity. In our study, the alterations in the fibrillar proteins observed in Reinke's edema may contribute to the vocal fold deformity.

Key Words: Laryngeal edema; collagen; elastic tissue; mucous membrane; vocal cords.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO: “THE LARYNGOSCOPE”

The Laryngoscope

Online Submission and Review System

Author Resources

[Instructions for Authors \(this page\)](#)

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

[ePrints](#)

[Reprints](#)

Mission Statement and Scope

The Laryngoscope is an international peer-reviewed periodical dedicated to the advancement of patient care in otolaryngology—head and neck surgery. As such, The Laryngoscope publishes original articles relating to both the clinical and basic science aspects of otolaryngology—head and neck surgery. **The Laryngoscope** reserves the right to exclusive publication of all accepted manuscripts. We will not consider any manuscript previously published nor under review by another publication. Once accepted for review, the manuscript must not be submitted elsewhere. Unethical publishing such as plagiarism, undisclosed conflicts of interest, inappropriate authorship, and duplicate publication are forbidden. Repeat publication of a data set is considered duplicate publication. This includes publication in a non-otolaryngologic journal or in another language. In case of doubt, disclosure is essential and the editor is available for consultation. Transfer of copyright to The Laryngoscope is a prerequisite of publication. All authors must sign the copyright transfer form. (This does not preclude publication of abstracts in the transactions or proceedings of the various societies.)

Authors must disclose any financial relationship with any entity or product described in the manuscript (including grant support, employment, honoraria, gifts, fees, etc.) Manuscripts are subject to peer review and revision may be required as a condition of acceptance. These instructions apply to all submissions.

Manuscripts reporting original scientific investigation, both basic science and clinical reports, are encouraged to use the manuscript format described below. In addition to full-length original manuscripts, The Laryngoscope will consider for publication Contemporary Reviews, Scientific Reviews, Rapid Communications, Case Reports, Letters To The Editor, and "How I Do It" submissions.

Contemporary Review manuscripts should review topics of contemporary interest and importance, and ideally should address controversial issues by expressing both sides of the controversy. The review should emphasize the best evidence currently available. We especially invite collaborative efforts by authors representing different points of view.

Scientific Review manuscripts should address contemporary topics in otolaryngology—head and neck surgery that are controversial or in a state of rapid flux. The review should

be comprehensive and authoritative as reflected by a contemporary bibliography. The manuscript format should conform to the format described below (see Manuscript Preparation) for original scientific manuscripts.

Rapid Communications report information of importance to otolaryngology—head and neck surgery not suitable for presentation as a full-length manuscript. Rapid Communications should be limited to three double-spaced typewritten pages. An abstract and references are not required.

Case Reports describes encounters with one or several patients with unique or unusual clinical situations. The key to an acceptable Case Report is the identification of a clinical pearl or clinical wisdom that could benefit future patients. Case Reports should be limited to four double-spaced typewritten pages and no more than eight references. An abbreviated abstract limited to less than 100 words that captures the essential value of the Case Report should be included.

Letters to the Editor should be directed to the Editor regarding manuscripts previously published in which significant scientific controversy exists. Letters to the Editor deemed appropriate for publication will be submitted to the author(s) of the manuscript of interest for comment. Letters to the Editor should be limited to three double-spaced typewritten pages including references.

"How I Do It" submissions report innovative solutions to clinical problems. Originality and quality of illustrations (when appropriate) are essential ingredients. "How I Do It" manuscripts should have a clear practical value and be no more than four double-spaced typewritten pages. No abstract is required.

Authorship Criteria and Responsibility

The Laryngoscope insists that all authors are truly qualified to be listed as such. Others who have contributed to the work but are not qualified to be authors should be "acknowledged" at the end of the article.

Authorship credit is based only on having made a substantial contribution to the published work by virtue of meeting all the following three criteria:

1. Conception and design of project or analysis of the manuscript of the data,
2. Drafting or critically revising the content of the manuscript submitted for publication, and
3. Giving final approval of the version to be published.

All three criteria must be met for an individual to be listed as an author or co-author on a published paper.

You will note that other criteria, which do not qualify an individual for "author status," include the following:

1. Supplying funding or other resources,
2. Collecting data (only),
3. General supervision of the research group, and

4. Being departmental chair or division chief.

Special Approval

Manuscripts that include information obtained from human or animal research must include (in the text or an appropriate footnote) verification of the review and approval of the appropriate institutional research oversight committee for the work that is reported.

Preparation of Manuscript

Original scientific manuscripts and review articles that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review. PLEASE NOTE: If you are not listed in the system as the "Corresponding Author," the submission will not show up in your queue for approval.

Manuscript Submission

Electronic submission: Authors are to submit their manuscripts through the Web-based tracking system at <https://lscope.edmgr.com>.

The site contains instructions and advice on how to use the system, guidance on the creation/scanning and saving of electronic art, and supporting documentation. In addition to allowing authors to submit manuscripts on the Web, the site allows authors to follow the progression of their manuscript through the peer review process. Authors may send to the editorial office any artwork, letters, or files that cannot be submitted electronically.

Manuscript format: The manuscript for the body of the text should not exceed **15 double-spaced** typewritten pages. (Please see above additional requirements for Rapid Communication, How I Do It, etc.)

The elements of a full-length article should be in the following sequence: Title Page, Structured Abstract and Key Words, Text (Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion), Acknowledgment, References, Tables, and Figure Legends. Each of these elements should begin on a new page, and each page should have a short running title (see next section: Title Page).

Title pages:

- A. Title page must be submitted as a separate file on the first page of the online system. This should contain: article title (not to exceed 75 characters, including spaces).
- B. Title page must be submitted as part of your manuscript. This should contain: article title (not to exceed 75 characters, including spaces); names of authors, their degrees and affiliations (dept., institution, city, state, country); institution where the work was done (indicate which author is in which department); a short running title of no more than 45 letters and spaces; source of financial support or funding; and a footnote indicating the author to whom correspondence, reprint requests, and proofs will be sent, with complete address (including e-mail address and postal codes) and telephone and telefax numbers. If the paper was presented at a meeting, give society name, city, state, country, and exact date meeting was held.

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Structured abstract and key words: Abstract must be submitted as a separate file on the fifth page of the online system and also with your manuscript. Limit the abstract to 250 words. Do not cite references in the abstract. Limit the use of abbreviations and acronyms. Use the following subheads: Objectives/Hypothesis, Study Design (randomized, prospective, etc.), Methods, Results, and Conclusions.

Text: The text is to be divided into five sections with the following headings: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). The introduction should be limited to two paragraphs of pertinent information. The discussion should not be an exhaustive review of the literature; it should be succinct and limited to conclusions that can be reached based on the results.

Abbreviations: Use generic names for drugs. List supplier of manufacturer for products and instruments; include supplier's city and state (e.g., Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC). Audiograms must be plotted according to ISO standards and must be in black and white. For commonly accepted abbreviations, consult *Logan's Medical and Scientific Abbreviations*. Authors are encouraged to consult *Dorland's Illustrated Medical Dictionary* (28th Edition), *AMA Manual of Style*, and Council of Biology Editors Style Manual (available from the Council of Biology Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, U.S.A.). The full term for which an abbreviation stands should precede its first use unless it is a standard unit of measurement.

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (9th edition), *Stedman's Medical Dictionary* (27th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express the units of measure and degrees Celsius to express temperatures, and SI units rather than conventional units.

Permissions: The author is responsible for obtaining written permission to reproduce previously published material (direct quotations, unpublished data, tables, or figures) from the copyright holder. Enclose all letters granting permission at the time the manuscript is submitted for publication. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Lippincott Williams & Wilkins. Photographs of recognizable persons must be accompanied by a signed release from the patient. For a photograph of a minor, signed parental permission is required.

Internal Review: All authors are strongly encouraged to have their manuscripts thoroughly and critically reviewed within their institution before submitting to The Laryngoscope.

References: The authors are responsible for the accuracy of the references. The journal complies with the reference style given in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available from *The New England Journal of Medicine*, Bulk Reprints, 1440 Main Street, Waltham, MA 02154, U.S.A.; send self-addressed stamped envelope). References are to be cited in numerical order in text and identified by Arabic numerals set in superscript type. Authors will be charged \$3.00 for each reference over 15. The reference section should be typed double-spaced at the end of the text, following the sample formats given below. For abbreviations of journal names, refer to *List of Journals Indexed in Index Medicus* [available from the Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC 20402, U.S.A.; DHEW Publication No. (NIH) 91-267; ISSN 0093-3821].

Provide all authors' names when fewer than seven; when seven or more, list the first three and add et al. Provide article titles and inclusive pages. "Unpublished observations" and "personal communications" do not qualify as references and should be placed parenthetically in the text. Accuracy of reference data is the responsibility of the author.

Sample references are given below:

Journal article

1. Rand NS, Dawson JM, Juliao SF, et al. In vivo macrophage recruitment by murine intervertebral disc cells. *J Spinal Disord* 2001; 14: 339—342.

Book chapter

2. Todd VR. Visual information analysis: frame of reference for visual perception. In: Kramer P, Hinojosa J, eds. *Frames of Reference for Pediatric Occupational Therapy*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999: 205-256.

Entire book

3. Kellman RM, Marentette LJ. *Atlas of Craniomaxillofacial Fixation*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

Software

4. *Epi Info* [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Online journals

5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988; 71: 22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996.

World Wide Web

7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [*JAMA* HIV/AIDS Web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997.

Figures

Each figure must be identified individually and within the text of the manuscript. Six black and white illustrations will be published without charge. Authors will be charged for additional black and white illustrations and for all color illustrations. The Publisher will provide, upon request, an estimate of the cost of color artwork.

Digital art needs to be created/scanned and saved and submitted as either a TIFF (tagged image file format), an EPS (encapsulated postscript) file. PPT (Power Point) files will also be accepted. **Electronic photographs—radiographs, CT scans, and so on—and scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch).** If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. **Color images must be created/scanned and saved and submitted as CMYK files. If you do not have the capability to create CMYK files, please disregard this step. Indicate in your cover letter that you are unable to produce CMYK files.** Cite figures consecutively in the text, and number them in the order in which they are discussed.

Digital Art Checklist:

- Create and submit artwork in the actual size it will appear in the journal
- Crop out any extra white or black space surrounding the image
- Text within figures should be in an acceptable font (Helvetica is preferred) and sized consistently throughout the artwork using 8-12 point type
- Text within figures should be embedded in the file or converted to an outline or path
- For black and white images: create and save in grayscale format
- For color files: create and save in CMYK format (not RGB)
- For line art: save and submit at a resolution of at least 1200 dpi
- For images/photographs: save and submit at a resolution of at least 300 dpi
- For combination halftones: save and submit at a resolution of at least 600 dpi
- For all artwork: save and submit TIFF or EPS files. Do not select "Save as Compressed TIFF" when saving files. PowerPoint files are also acceptable
- Save each figure as a separate file and save them separate from the accompanying text file(s). For multipanel or composite figures only: send as one file with each part labeled the way it is to appear in print
- Name figures in the format: corresponding author's last name_figure1.tif, etc.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager website:
<https://lscope.edmgr.com/>

Detailed Figure Instructions: For a step by step guide for submitting Digital Art to please visit www.LWWonline.com. Click "**For Authors**" then click "**Artwork**" in the menu to the right. Visit the "**5 Steps for Creating Digital Artwork**" for specific guidelines.

Figure legends: Each figure must be accompanied by an explanatory legend, typewritten with double spacing (legends should be separate from the figures, but do not use a separate sheet for each legend). They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used. Explain all symbols used in the figure.

Tables: Each table must be identified individually and within the text of the manuscript. Do not include the same information in both tables and figures. Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Group all tables in a separate file. Tables should be typed neatly, each table on a separate sheet, with the title above and any notes below. Explain all abbreviations. Tables should be numbered consecutively beginning with Roman numeral I. A table must have at least two columns. Lists are to be incorporated into the text. Each table should appear on a separate page and should include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text. Do not use patient initials in tables. Patients should be referred to by sequential Arabic numerals, not by their initials.

Web Features:

ArticlePlus allows authors and the publisher to publish additional article-related materials on the Web site that compliment and reinforce information published in the print journal. The publisher is able to post detailed data on the Web site and reference it in the print version. Supplementary material posted online is intended to enhance print article content. The Editor will determine which figures, tables, and other supplementary materials are to be published on ArticlePlus.

Because all ArticlePlus materials submitted for addition to the Web site are posted exactly as provided to the publisher, authors are advised to review materials carefully. Data will be posted as it is submitted; it will not be professionally edited or proofread. No additional work or file processing will be performed on any submission. *The Publisher will not be responsible for errors or omissions.*

Audio and Video Files: Short audio and video clips may be submitted for posting on the Web site as a .wav, .avi, .mov, .mpg, or .dcr file format. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The total size of all clips, along with other submitted files for any given article, should not exceed 5MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the Web site and returned to the author for re-submission.

Submitting Revisions:

When you have received a request to revise your manuscript, you will need to make the

necessary revisions and (For Further Instructions on Submitting Revisions, please review "Author Tutorial"):

1. Logon to <http://lscope.edmgr.com>
2. Enter your username and password
3. Click on "Author Login"
4. Click on "Submissions Needing Revision"
5. Click on "Submit Revision"
6. On the left side of the page you will see "Frequently Asked Questions"
7. If you need to make changes to the Title, Authors, etc. just click on the appropriate item and the system will take you that page.
8. If you only need to attach your revision, click on "Attach Files"
9. When you get to the "Attach Files" step in the process, you are presented with the list of source files (paper, figures, etc.) from the previous version. You may choose whether or not to carry over files from the previous version to the new Revision.
10. When presented with the list of source files, there is a check box displayed to the right of each file. The check box must be checked to carry the file over to the new version of the submission.
11. Click "Next" to proceed to the next page where you'll be given the option to upload your revised files to attach to the Revised Submission. Again, you'll be able to reorder your files with the arrows, and upload your new files.
12. Please Note: You must submit a "Response to Reviewers" or your revised submission will not be processed. The Response to Reviewers is a letter from you (preferably typed in a Word format) responding to the reviewer(s) request(s). Click on the drop-down menu at the top of this page beside "Item." Click on "Response to Reviewers," click on "Browse," click on the "Appropriate Document," and click on "Attach."
13. Click "Next" to proceed to the next page where you'll be given the option to upload your revised files to attach to the Revised Submissions. Again, you'll be able to reorder your files with the arrows, and upload your new files. Click "Next" to "Build PDF" for your approval (This will take a few minutes).

PLEASE NOTE: If you are not listed in the system as the "Corresponding Author," the submission will not show up in your queue for approval.

After Acceptance

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Proofs must be returned within 2 days of receipt; late return may delay publication of the article. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (e.g., reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. Those authors without an e-mail address will receive traditional page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Authors should check text, tables, legends, and references carefully for accuracy and correctness. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Reprints: Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed with the corrected proofs, if possible. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street,

Baltimore, MD 21201; Fax: 410-528-4434; E-mail: reprints@lww.com with any questions.

Publisher's contact: Fax corrected page proofs and any other related materials to Production Editor, The Laryngoscope, 410-361-8040.

Manuscript Checklist (before submission) [To top of page](#)

- Title page with complete mailing address and telephone, telefax and e-mail of corresponding author.
- Abstract in structured format and keywords.
- References double-spaced in AMA style and in proper format, and numerical order in the body of the text.
- Permission to reproduce copyrighted materials or signed patient consent forms.
- Acknowledgments listed for grants and technical support.
- Manuscript conforming to criteria listed in Instructions to Authors.
- Clear indication of approval of appropriate institutional research oversight committee.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Copyright 2008, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved
Published by Lippincott Williams & Wilkins

Disarrangement of Collagen Fibers in Reinke's Edema

Flavio Akira Sakae, MD; Rui Imamura, MD, PhD; Luiz U. Sennes, MD, PhD; Thais Mauad, MD, PhD; Paulo H. Saldiva, MD, PhD; Domingos H. Tsuji, MD, PhD

Objective/Hypothesis: To describe the arrangement of collagen fibers in the superficial layer of the lamina propria of the vocal folds with Reinke's edema.

Study Design: Cross sectional analysis of the lamina propria of the vocal folds with Reinke's edema (RE).

Method: The picrosirius polarization method was used to study the arrangement of collagen fiber. Findings of collagen disarrangement were categorized semiquantitatively and correlated with RE severity, age, cigarette smoking and duration of dysphonia.

Results: Analysis of 20 specimens of vocal folds with RE showed that the intertwined network of collagen fibers resembling a wicker-basket normally observed in vocal folds was disarranged in RE. The collagen fibers were loosely arranged, fragmented and intermixed with varying amounts of myxoid stroma. Moderate and large areas of disarrangement (90% of cases) predominated. Collagen fiber arrangement in the region underneath the epithelium was better preserved when compared with fibers in the deeper region of the superficial layer of the lamina propria. There was a statistical difference in collagen disarrangement between grade II and grade III severity ($P = .007$) that appeared to be due to the large areas of disarrangement observed in 73% of patients with grade III severity and in 44% of grade II severity. Age was the only variable correlated with collagen fiber disarrangement ($r = 0.47$, $P = .037$).

Conclusion: Our findings suggest that the flexible framework which maintains the uniformity of the lamina propria was lost in RE caused by the disarrangement of the collagen fibers.

Key Words: Reinke's edema, lamina propria, collagen fiber, vocal fold.

Laryngoscope, 118:●●●–●●●, 2008

INTRODUCTION

Reinke's edema (RE) is defined as a unilateral or bilateral pale white swelling of the entire vocal fold, filled with fluid, sessile, and very mobile during phonation.¹ It was first described in 1891 by Hajek,² but its etiology remains largely controversial.³ The initial injury leading to RE is not known, but it is frequently associated with cigarette smoking and aging.^{1,4}

RE is characterized by excessive extracellular matrix production⁵ and prominent subepithelial vascularization, with many fenestrae and dilated vessels.⁴ Such pathological changes are thought to make an important contribution to the excessive propensity for deformability observed in this disorder.⁵

Collagen arrangement in the normal vocal folds was described by Melo et al.⁶ as an intertwined network in the form of a wicker basket, and it may have an important role in stabilizing the lamina propria during vibration. Collagens type I and III constitute the fibrillar collagen network in the human vocal fold lamina propria.⁷

Alterations in fibrillar proteins like collagen fibers are also likely to be present in RE and contribute significantly to vocal dysfunction. However, few studies have addressed collagen arrangement in RE.^{8,9} Such information could contribute to a better understanding of RE physiopathology and provide rationale for the development of new treatment options. Therefore, the objective of the present study was to describe the arrangement of collagen fibers in the superficial layer of the lamina propria in patients with varying severities of RE.

METHODS

The study was approved by the Institutional Review Board. All participants provided informed consent.

Twenty surgical vocal fold specimens were obtained from 20 subjects with RE diagnosed according to the criteria of Dikkers and Nikkels.¹ The included cases presented with grade II (9 cases) or grade III (11 cases) severity classified according to Yonekawa.¹⁰ These severities of the disease necessitated surgical treatment to improve voice quality by removing the excess edema.

Seventeen subjects were women and three were men, and they ranged in age from 47 to 62 years (mean \pm SD: 55 \pm 4.4 years). Nine subjects were white, eight were mulatto, and three were black. All patients were smokers or ex-smokers (mean \pm SD:

From the Departments of Otolaryngology (F.A.S., R.I., L.U.S., D.H.T.), and Pathology (T.M., P.H.N.S.), The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication March 25, 2008.

Supported by CNPQ (Brazilian National Research Council) and HC-FMUSP.

Send correspondence to Flavio Akira Sakae, MD, Rua Nanuque 432, Apto.102, 05302-031, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: sakaeflavio@yahoo.com.br

DOI: 10.1097/MLG.0b013e3181770955

22 ± 10.7 pack-years). The duration of dysphonia ranged from 6 to 60 months (mean ± SD: 36 ± 16.6 months). None of the cases presented a history of previous laryngeal microsurgery.

The specimens were removed according to principles of the suctioning technique.¹¹ A fragment of the middle third of the vocal fold with RE, comprising the epithelium and part of the superficial layer of the lamina propria with edema was removed at the beginning of surgery and oriented through one stitch at its anterior end.

The specimens were then immersed in formaldehyde for 24 hours and embedded in paraffin. Five micrometer thick sections were stained by the picrosirius.⁶ The picrosirius-polarization method permits a detailed analysis of the collagen system arrangement.

Cases were analyzed descriptively, and the degree of collagen fiber disarrangement was categorized semiquantitatively¹² using the following categories: ± indicated that the item was focally present in small quantities, but absent in adjacent areas; + indicated that the item was focally present in large quantities, but absent in adjacent areas; ++ indicated that the item was present in large quantities. The results were confirmed by two pathologists with experience in head and neck pathology.

Collagen disarrangement was correlated with RE severity via the χ^2 test and with age, cigarette smoking, and dysphonia via Spearman's rank correlation. Comparison of age, cigarette smoking, and dysphonia within grade II and grade III severities were performed using the *t*-test and Levene's test. All tests were conducted using the SPSS software 13.0 version (SPSS©, Chicago, IL) and *P* values lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Descriptive analysis showed that the intertwined network of collagen fibers resembling a wicker-basket normally observed in human vocal folds⁶ was disarranged in most regions of the superficial layer of the lamina propria of the vocal folds with RE. Disarrangement of collagen fibers was characterized by loosely arranged and fragmented fibers intermixed with varying amounts of myxoid stroma (Fig. 1). The amount of collagen in the lamina propria varied among cases; some cases showed large

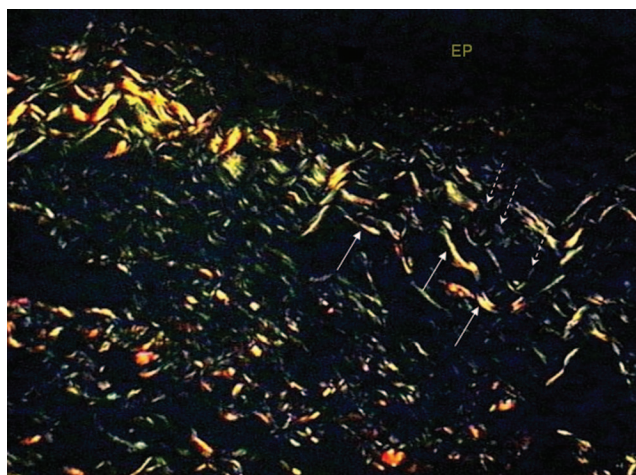


Fig. 1. Coronal histological section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 55-year-old woman, stained with picrosirius and observed under polarized light. Note the disarrangement of collagen characterized by loosely arranged and fragmented fibers of yellow- or red-stained, thick and strongly birefringent fibers (solid arrows) and the green-stained, thin and weakly birefringent fibers (dotted arrows) (magnification ×400). EP = epithelium.

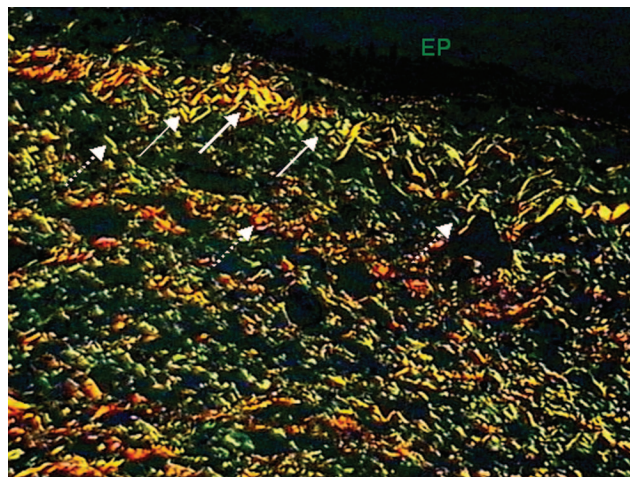


Fig. 2. Coronal histological section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 55-year-old woman, stained with picrosirius and observed under polarized light. Collagen fiber arrangement in the region underneath the epithelium (EP) (solid arrows) was better preserved when compared with fibers in the deeper (dotted arrows) region of the superficial layer of the lamina propria (magnification ×200).

amounts of disarranged collagen fibers, whereas others exhibited a collagen-poor, edema-rich stroma. Two populations of collagen fibers were observed under polarized light analysis: yellow- or red-stained, thick and strongly birefringent fibers and green-stained, thin and weakly birefringent fibers.⁶ We observed a disarrangement of these two collagen fiber populations in RE (Fig. 1). Collagen fiber arrangement in the region underneath the epithelium (subepithelial fibers) was better preserved when compared with fibers in the deeper region of the superficial layer of the lamina propria (Fig. 2).

Table I summarizes the results of the disarrangement of collagen fibers according to the severity of RE. Moderate and large areas of disarrangement predominated and were found in 90% of the cases (Figs. 3 and 4). There was a statistical difference in collagen disarrangement between grade II and grade III severity ($P = .007$) that appeared to be due to the large areas of disarrangement observed in 73% of patients with grade III severity and 44% with grade II severity. Spearman's rank correlation revealed that age was the only variable correlated with collagen fiber disarrangement ($r = 0.47$, $P = .037$)

TABLE I.
Disarrangement of the Collagen Fibers According to the Severity of the Reinke's Edema.

	Grade II (n = 9)	Grade III (n = 11)
Disarrangement ±	1	1
Disarrangement +	4	2
Disarrangement ++	4	8

$P = .007$, showing difference in collagen disarrangement between grade II and grade III severity (χ^2 nonparametric test).
± = small areas of disarrangement; + = moderate areas of disarrangement; ++ = large areas of disarrangement.

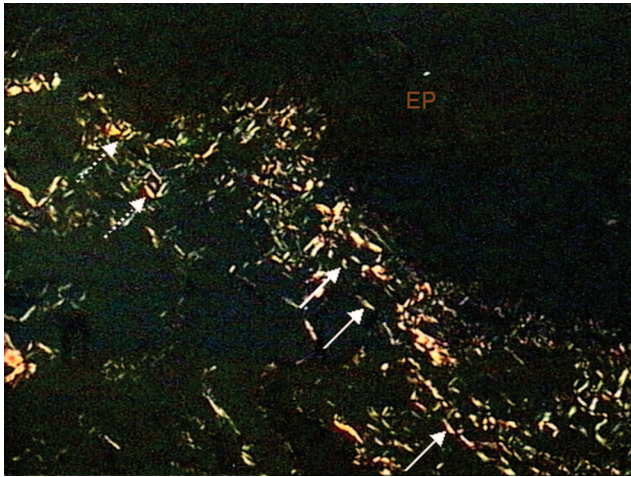


Fig. 3. Coronal histological section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 57-year-old woman, stained with picosirius and observed under polarized light. Note the disarrangement + characterized by moderate areas of collagen fibers disarrangement (solid arrows) and some areas of preserved intertwined network of collagen fibers resembling a wicker-basket (dotted arrows) (magnification $\times 400$). EP = epithelium.

(Table II). Except for age, no significant differences were observed between grade II and III severities ($P = .036$) (Table III). Figure 5 shows three-dimensional graphic illustrations of the histoarchitecture of the collagen fibers found in the lamina propria of RE.

DISCUSSION

The results of this work indicate that RE is characterized by collagen fiber disruption and impairment of collagen's spatial arrangement in a wicker-basket configuration. Our data suggests that alterations in collagen fibers may contribute to the vocal fold dysfunction observed in RE.

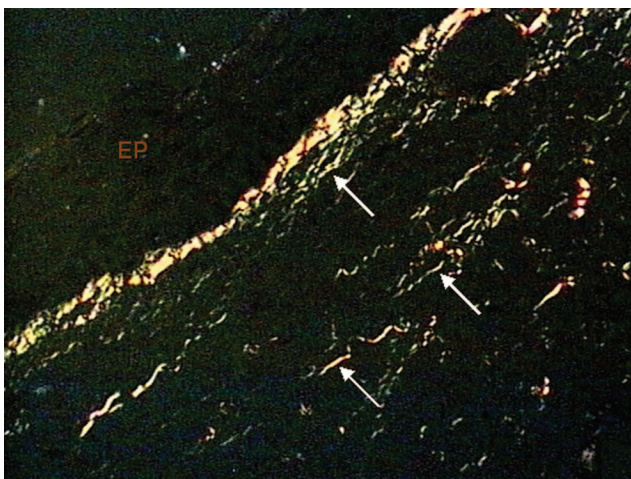


Fig. 4. Coronal histological section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 60-year-old woman, stained with picosirius and observed under polarized light. Note the disarrangement + characterized by large areas of collagen fibers disarrangement (solid arrows) (magnification $\times 400$). EP = epithelium.

TABLE II.

Correlation of the Age, Cigarette Smoking and Duration of Dysphonia as Function the Degree of Collagen Disarrangement.

	Spearman's Rank Correlation Coefficient	<i>P</i>
Age	+ .469	.037
Cigarette smoking	+ .120	.616
Dysphonia	+ .242	.304

The arrangement of collagen fibers in the vocal fold confers resistance to muscle contraction, but also allows elongation during voice modulation, especially in the superficial layer of the lamina propria, which represents the main vibratory area. In this layer, the intertwined arrangement of collagen fibers described by Melo et al.⁶ permits the fibers to slide between each other in such a way that the structure is deformed as a whole. Therefore, poorly extendable collagen fiber may constitute a flexible framework that helps to stabilize the lamina propria, maintaining the uniformity of its structure during vibration.^{6,13}

The disarrangement of collagen fibers observed in RE might cause loss of the stabilizing component, the flexible framework. The three-dimensional structure that maintains the integrity of the vocal fold cover during phonation¹⁴ is disarranged thus rendering the superficial layer more prone to deformity in RE.

The pathophysiological mechanisms underlying RE are still unknown. In our study, age was correlated with the degree of collagen fiber disarrangement. The normal histoarchitectural arrangement of the collagen system in the lamina propria of elderly patients is known to be altered in varying degrees at several histological and biochemical levels.^{6,15} We do not know if the correlation between age and the magnitude of the collagen fiber disarrangement was caused by RE pathology or was simply the product of nondiseased senescence.

We also observed greater collagen fiber disarrangement in patients with grade III severity. Aging may contribute to disease severity, but other risk factors, such as laryngopharyngeal reflux, vocal abuse, vocal hyperfunction, and hypothyroidism may also influence the severity of the edema.

TABLE III.

Comparison of Age, Cigarette Smoking, and Duration of Dysphonia Within Grade II and Grade III Severities Using the *t*-Test and Levene's Test.

	Severity of Edema	Mean	SD	<i>P</i>
Age (yrs)	II	52.67	4.77	.036
	III	57.00	3.26	
Cigarette smoking (pack-years)	II	20.22	6.44	.399
	III	24.18	13.34	
Dysphonia (mo)	II	32.67	19.92	.452
	III	38.73	13.78	

SD = standard deviation.

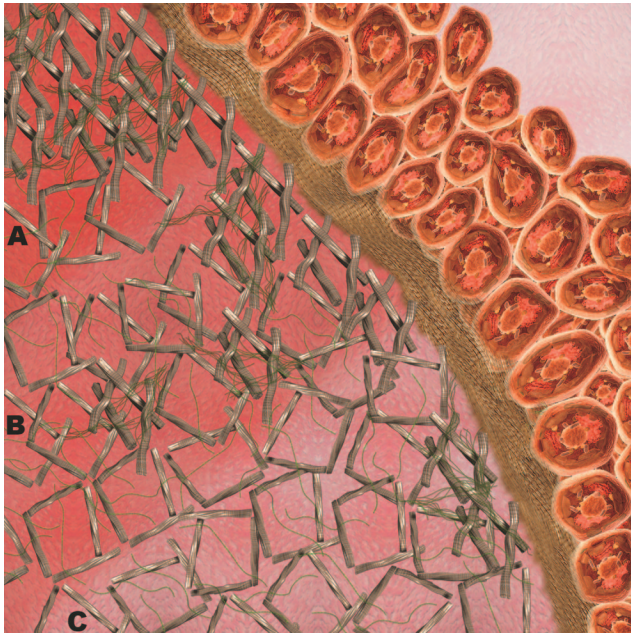


Fig. 5. Histoarchitecture of the collagen fibers in the superficial layer of the lamina propria with Reinke's edema showing the collagen disarrangement. (A) Small areas of disarrangement. (B) Moderate areas of disarrangement. (C) Large areas of disarrangement.

These risk factors lead to aberrant healing responses in RE, but the deformability of the vocal fold should also be influenced by disruption of other matrix components because of the interaction between collagen fibers, elastin, and interstitial proteins.¹⁴ Furthermore, not only RE but also other benign laryngeal lesions show a certain degree of Reinke's space involvement⁵; collagen disruptions may thus occur in a distinct or less evident manner although still influencing vocal fold vibration to some extent.

The findings of the present study permit speculations regarding the surgical treatment of RE. Because the disarrangement of collagen fibers in RE was less marked in the subepithelial region, preservation of edema close to the mucosal flap during surgery may favor a more efficient return of the vibratory capacity of the vocal fold after surgery. This fact might be particularly important with the advent of new surgical techniques for edema removal via a microflap approach.

CONCLUSION

The intertwined network of collagen fibers resembling a wicker-basket found in normal vocal folds was

disarranged in most regions of the superficial layer of the lamina propria in patients with RE.

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Chao Lung (Discipline of Telemedicine, The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil) for assistance in three-dimensional graphic representation and Dr. Luis Fernando Ferraz (Department of Pathology, The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil).

BIBLIOGRAPHY

1. Dikkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:698–703.
2. Hajek M. Beiträge zur Anatomie der Stimmlippen. *Z Hals Nasen Ohrenheilk* 1925;13:220.
3. Lim JY, Choi JN, Kim KM, Choi HS. Voice analysis of patients with diverse types of Reinke's edema and clinical use of electroglottographic measurements. *Acta Otolaryngol* 2006;126:62–69.
4. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Electron microscopic and immunohistochemical investigation of Reinke's edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1068–1072.
5. Volić SV, Klapan I, Seiwerth S, Ibrahimovic T. Extracellular matrix of Reinke's space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 2004;124:505–558.
6. Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003;113:2187–2191.
7. Tateya T, Tateya I, Bless DM. Immuno-scanning electron microscopy of collagen types I and III in human vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:156–159.
8. Remenár E, Élő J, Frint T. The morphological basis of development of Reinke's Oedema. *Acta Otolaryngol* 1984;97:169–176.
9. Volić SV, Kirincic N, Markov D. Some morphological, histological, cytological and histochemical aspects of Reinke Oedema. *Acta Otolaryngol* 1996;116:322–324.
10. Yonekawa H. A clinical study of Reinke's edema. *Auris Nasus Larynx* 1988;15:57–78.
11. Zeitels SM, Hillman RE, Bunting GW, Vaughn T. Reinke's edema: phonatory mechanisms and management strategies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:533–543.
12. Dikkers FG, Nikkels PGJ. Lamina propria of the mucosa of benign lesions of the vocal fold. *Laryngoscope* 1999;109:1684–1688.
13. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol* 1996;116:778–782.
14. Sato K. Reticular fibers in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:1023–1028.
15. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Age-related changes of collagenous fibers in the human vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:15–20.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

Distribution of the elastic system fibers in Reinke's edema

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

Distribution of the elastic system fibers in Reinke's edema

This work was supported by CNPQ (Brazilian National Research Council) and HC-FMUSP.

From the Department of Otolaryngology (Flavio Akira Sakae, MD; Rui Imamura, MD; Luiz Ubirajara Sennes, MD, PhD; Domingos Hiroshi Tsuji, MD, PhD) and Department of Pathology (Thais Mauad, MD, PhD; Paulo Hilário Nascimento Saldiva, MD, PhD), The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Send correspondence to Flavio Akira Sakae, Rua Nanuque 432, Apto.102, 05302-031, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: sakaeflavio@yahoo.com.br

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

SUMMARY

Objectives: To describe the distribution of elastic fibers system in superficial layer of the lamina propria of the vocal folds with Reinke's edema. **Study Design:** Cross sectional analysis of the lamina propria of the vocal folds with Reinke's edema and normal vocal folds from human cadavers. **Method:** The Weigert's resorcin-fuchsin stain after oxidation with 10% oxone was used to study the elastic fiber arrangement in superficial layer of lamina propria of normal vocal folds and with Reinke's edema. Findings were categorized semiquantitatively and afterward compared with the severity of Reinke's edema. **Results:** Analysis of 20 specimens of vocal fold with Reinke's edema showed that the elastic fibers in Reinke's space lost their undulated appearance and gained a tangled aspect. In addition, these fibers were no longer parallel to the epithelial basement membrane but ran in various directions. The superficial fiber network below the epithelial basement membrane observed in normal folds was also found to be fragmented, detached from the undulated fibers and also ran in various directions. No significant difference in the degree of elastic system fiber disarrangement was observed between grade II and III severities ($p = 0,382$). Large areas of disarrangement were predominant (80% of the cases). **Conclusion:** The intense disarrangement of the elastic system fibers in Reinke's edema may give insufficient resistance and resilience to the vocal fold, leading to excessive propensity for deformability.

Key words: Reinke's edema; lamina propria; elastic fiber; vocal fold

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

INTRODUCTION

Reinke's edema (RE) is a benign lesion of the vocal folds, affecting the superficial layer of the lamina propria; the entire length of the membranous vocal fold becomes edematous and swollen¹. Spatial variation and organization of fibrous proteins appear to be critical for the morphology of the vocal folds. We previously found a disarrangement of the intertwined network of collagen fibers in the superficial layer of the lamina propria of the vocal fold with RE and suggested that alterations in collagen fibers may contribute to vocal fold deformity².

Elastin is another important structural component of the extracellular matrix in the vocal folds. Ultrastructurally, fibers of the elastic system are composed by a varying amount of an amorphous material mixed with a fibrillar component. Elastin fibers or mature elastic fibers have a larger amorphous component as a core, with microfibrils surrounding the core. Oxytalan fibers are composed of microfibrils of 10 to 12 nm in diameter; elaunin fibers have microfibrils with a small amorphous component. Elaunin and oxytalan are less stretchable and are found in tissues that experience greater stress such as tendons and cartilage. Elastin fibers are the most elastic³.

In the superficial layer of the lamina propria of the human vocal folds, elastin proteins are mostly present in the elaunin and oxytalan, but not the elastin fiber, forms^{3,4}. Mature elastic fibers are mostly observed in the intermediate layer of the lamina propria³. The elastic system fibers of the superficial layer participate in vibration by contributing to the rigidity and viscoelasticity of the vocal fold mucosa⁵. Few studies have described elastic fiber distribution in RE⁶. Therefore, in this study,

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

our aim was to describe the distribution of elastic system fibers in the superficial layer of the lamina propria in patients with varying severities of Reinke's edema as compared to those with normal vocal folds.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

METHODS

The study was approved by the institutional review board. All participants provided informed consent. Twenty surgical vocal fold specimens were obtained from 20 subjects with RE. The selected cases were the same sample used in our previous study².

Seventeen subjects were female, three were male, and they ranged in age from 47 to 62 years (mean±SD: 55±4.4 years). Nine subjects were white, eight were mulatto, and three were black. All patients were smokers or ex-smokers (mean±SD: 22±10.7 pack-years). The duration of dysphonia ranged from 6 to 60 months (mean±SD: 36±16.6 months). None of the cases presented a history of previous laryngeal microsurgery. Edema was scored as grade II in 9 cases and grade III in 11 cases⁷.

Ten additional vocal folds were obtained from human larynges of nonsmoker cadavers from the São Paulo Autopsy Service at the University of São Paulo School of Medicine and were used as normal controls. These subjects included five males and five females ranging in age from 50 to 60 years (mean of 55 years), four of them white, three were mulatto and three were black.

Specimens were immersed in formaldehyde for 24 hours, dehydrated in an increasing alcohol gradient, cleared, arranged and embedded in paraffin. The blocks were cut into 5 µm coronal sections that were stained by Weigert's resorcin-fuchsin stain after oxidation with 10% aqueous oxone. This method stains all fibers of the elastic system including elastic fibers as well as oxytalan and elaunin fibers⁸. The

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

same preparation was used for a 5 mm thick coronal fragment of the mid-region of the membranous vocal folds of the control group.

Cases were analyzed descriptively, and the degree of elastic system fiber disarrangement observed in RE was categorized semiquantitatively using the following categories: \pm indicated that item was focally present in small quantities, but absent in adjacent areas; + indicated that item was focally present in large quantities, but absent in adjacent areas; ++ indicated that item was present in large quantities². The results were confirmed by two pathologists with experience in head and neck pathology.

Elastic fiber distribution was correlated with Reinke's edema severity as determined by chi-square test; it was also correlated with age, cigarette smoking, and dysphonia as determined by Spearman's rank correlation. All tests were conducted using SPSS software version 13.0 (SPSS Inc. [©], Chicago, Illinois, USA) and p-values lower than 0.05 were considered significant.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

RESULTS

Elastic fibers treated with the Weigert resorcin-fuchsin method were stained dark purple. Analysis of the superficial layer of normal vocal folds showed a delicate network of thin and undulated fibers branched and formed connections with each other; this network was arranged in parallel to the epithelial basement membrane. In addition, a more superficial network of thinner fibers was observed immediately below the basement membrane between the deeper fiber network and the epithelium, which was arranged in the direction of the first network (Fig. 1, a and b).

In contrast, the normal distribution of elastic fibers was found to be disrupted in the superficial layer of the lamina propria of the vocal fold with RE; the fibers lost their undulated appearance and gained a tangled aspect. The fibers became fragmented and were no longer parallel to the epithelial basement membrane; they presented a chaotic distribution and ran in various directions scattered throughout Reinke's space. The superficial fiber network below the epithelial basement membrane was also found to be fragmented; it was detached from the undulated fibers and ran in various directions (Figure 2, a and b).

Table I summarizes the disarrangement of elastic system fibers according to the severity of the Reinke's edema (Figures 3 and 4). Large areas of disarrangement were predominant (80% of cases). No significant difference in the degree of elastic system fiber disarrangement was observed between grade II and III severities ($p = 0,382$). Analysis with Spearman's rank correlation revealed that none of the variables was correlated with the degree of elastic system fiber disarrangement (Table II).

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

DISCUSSION

In the present study, we describe an intense disarrangement of elastic system fibers in the superficial layer of the lamina propria of patients with RE. This disarrangement probably mostly affected the oxytalan and elaunin fibers present in this layer^{3,4}. Oxytalan fibers are located closer to the epithelial basement membrane⁹, and probably correspond to the thinner fiber network observed in the control group. Elaunin fibers probably form the delicate network of thin and undulated fibers arranged in parallel to the epithelial basement membrane in normal vocal folds.

The disruption of the spatial arrangement of oxytalan and elaunin fibers might deregulate the vibratory mechanism of the superficial layer, an area with higher dynamic stress^{3,4,10}. The disarrangement of these fibers may result in insufficient resistance and resilience of the tissue, leading to an excessive propensity for deformity in RE.

In this study, there was no significant difference in elastic system fiber disarrangement between grade II and III severities, perhaps because large areas of disarrangement presented in the majority of cases (80%). There appeared to be great disruption of elastic fibers in the region beneath the epithelial basement membrane; this is in contrast to collagen, whose configuration is reasonably preserved in this region².

The impairment of the elastic fiber network of the subepithelial region could result in a loss of attachment between the submucosa and epithelium, possibly contributing to vocal fold deformability. Interestingly, a similar fragmentation of the fibers of the elastic system is presented in asthmatic airways. It was hypothesized

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

that these alterations could contribute to airway hyperconstriction by impairing intrinsic airway recoil, since elastic fibers return organs to their original conformation after release of a deforming force¹¹.

Our findings may be useful for histopathological diagnosis of benign lesions of the vocal folds since it has low value in making a discrimination¹². It is possible that elastic and collagen fiber staining, in association with quantitative methodology, could be used to link histologic diagnoses with macroscopic findings of benign lesions of the vocal folds.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

CONCLUSION

We describe an intense disarrangement of elastic system fibers in the superficial layer of the lamina propria of patients with RE. In conjunction with the collagen disruption observed in a previous work, our findings suggest that vocal folds with Reinke's edema show increased deformability because of a loss of structural components.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

REFERENCES

1. Sato K, Nakashima T, Hirano M. Electron microscopic and immunohistochemical investigation of Reinke's edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1068-1072.
2. Sakae FA, Imamura R, Sennes LU, Mauad T, Saldiva PH, Tsuji DH. Disarrangement of collagen fibers in Reinke's edema. *Laryngoscope* 2008; Publish ahead of print
3. Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:77-85.
4. Hammond TH, Zhou R, Hammond E, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *Journal of Voice* 1997;11(1):59-66.
5. Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:44-48.
6. Remenár E, Élő J, Frint T. The morphological basis of development of Reinke's Oedema. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984;97:169-76.
7. Yonekawa H. A clinical study of Reinke's edema. *Auris Nasus Larynx* 1988;15:57-78.
8. Montes GS. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibres in tissue. *Ci Cult J Braz Assoc Adv Sci* 1992; 44: 224-233.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

9. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996, 116: 778-82.
10. Hahn MS, Kobler JB, Starcher BC, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix I: elastic fibers and hyaluronic acid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(2):156-64.
11. Mauad T, Xavier ACG, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 968-75.
12. Dikkers FG, Nikkels PGJ. Lamina propria of the mucosa of benign lesions of the vocal fold. *Laryngoscope* 1999; 109:1684-1688.

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

TABLES

TABLE I
Disarrangement of the elastic system fibers
according to the severity of the Reinke's edema

	Grade II (n = 9)	Grade III (n = 11)
Disarrangement ±	0	0
Disarrangement +	3	1
Disarrangement ++	6	10

NOTE: ± = small areas of disarrangement + = moderate areas of disarrangement; ++ = large areas of disarrangement

p = 0,382, showing no significant difference in elastic fibers disarrangement between grade II and grade III severity (chi-square non-parametric test)

TABLE II
Correlation of the age, cigarette smoking and duration of dysphonia as function
of degree of elastic system fibers disarrangement

	Spearman's rank correlation coefficient	p
Age	-0,076	0,749
Cigarette Smoking	+0,329	0,157
Dysphonia	+0,197	0,406

Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

FIGURES LEGENDS

Fig 1. Coronal histologic section of the vocal fold of a 54-years-old woman at the midregion of the membranous portion, stained with Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation. **(A)** Note in the Reinke space (RE), elastic fibers arranged in parallel to the epithelium (magnification X 200). **(B)** A delicate network of thin and undulated fibers arranged in parallel to the epithelial basement membrane, which branched and formed connection with each other (solid arrows) and a network of thinner fibers below the basement membrane (dotted arrows) (magnification X 400).

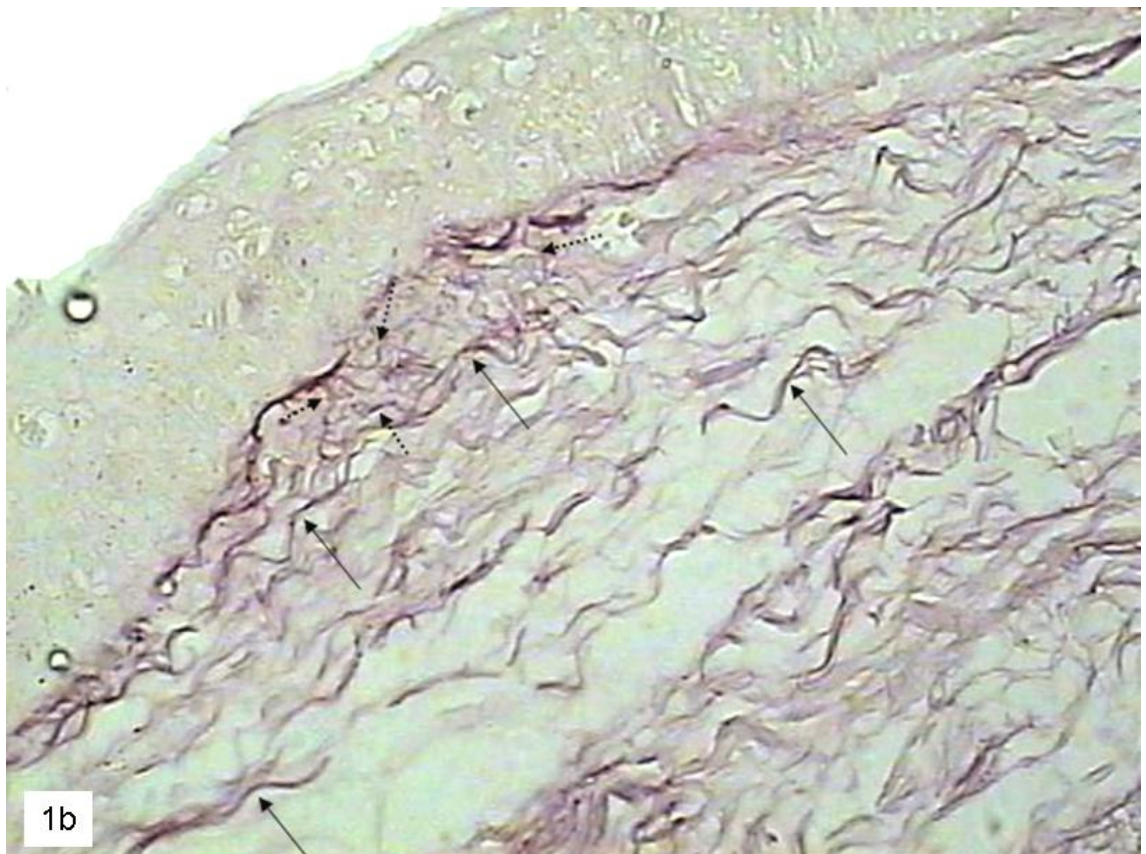
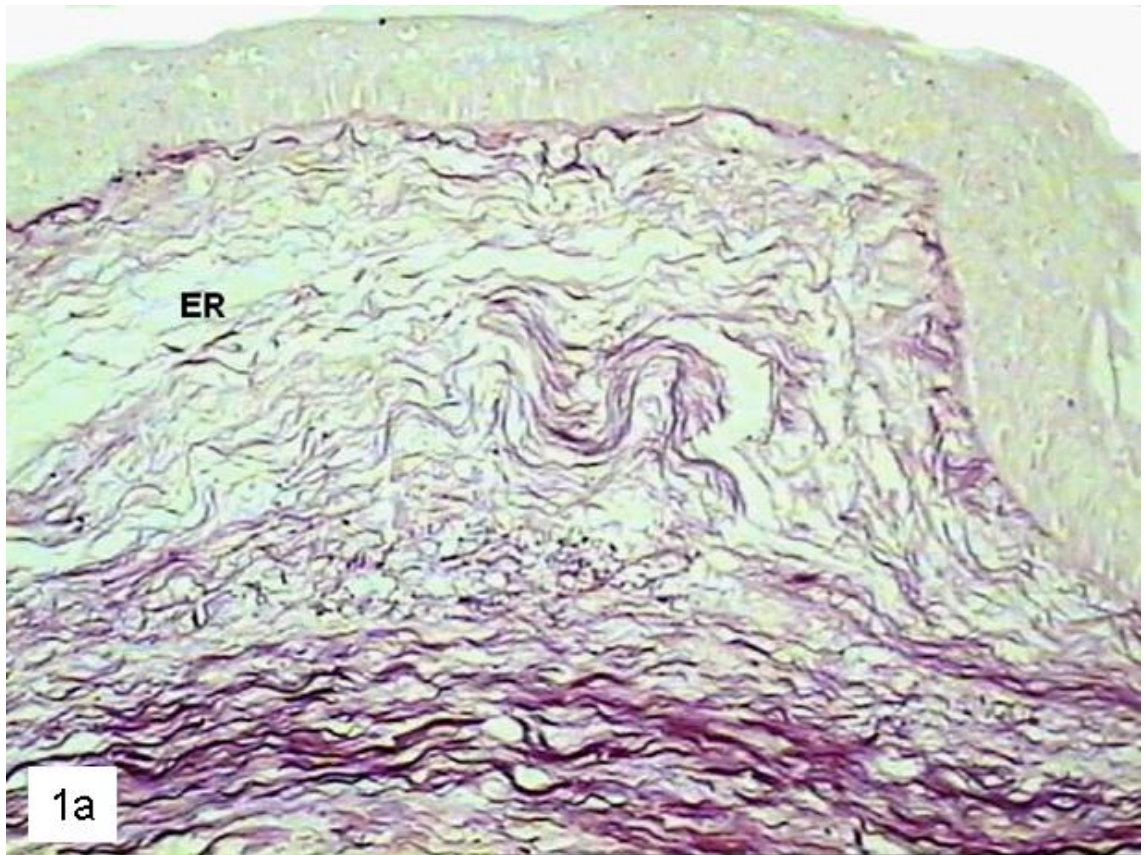
Fig. 2. Coronal histologic section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 58-years-old woman, stained with Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation. The undulated fibers became fragmented and were no longer arranged parallel to the epithelial basement membrane (solid arrows). The fiber network below the epithelial basement membrane was fragmented, detached from the undulated fibers (dotted arrows) (magnification X 400).

Fig. 3. Coronal histologic section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 57-years-old woman, stained with Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation. Note the disarrangement + characterized by moderate areas of elastic fibers disarrangement (dotted arrows) and some areas of preserved network of the elastic system fibers (solid arrows) (magnification X 400).

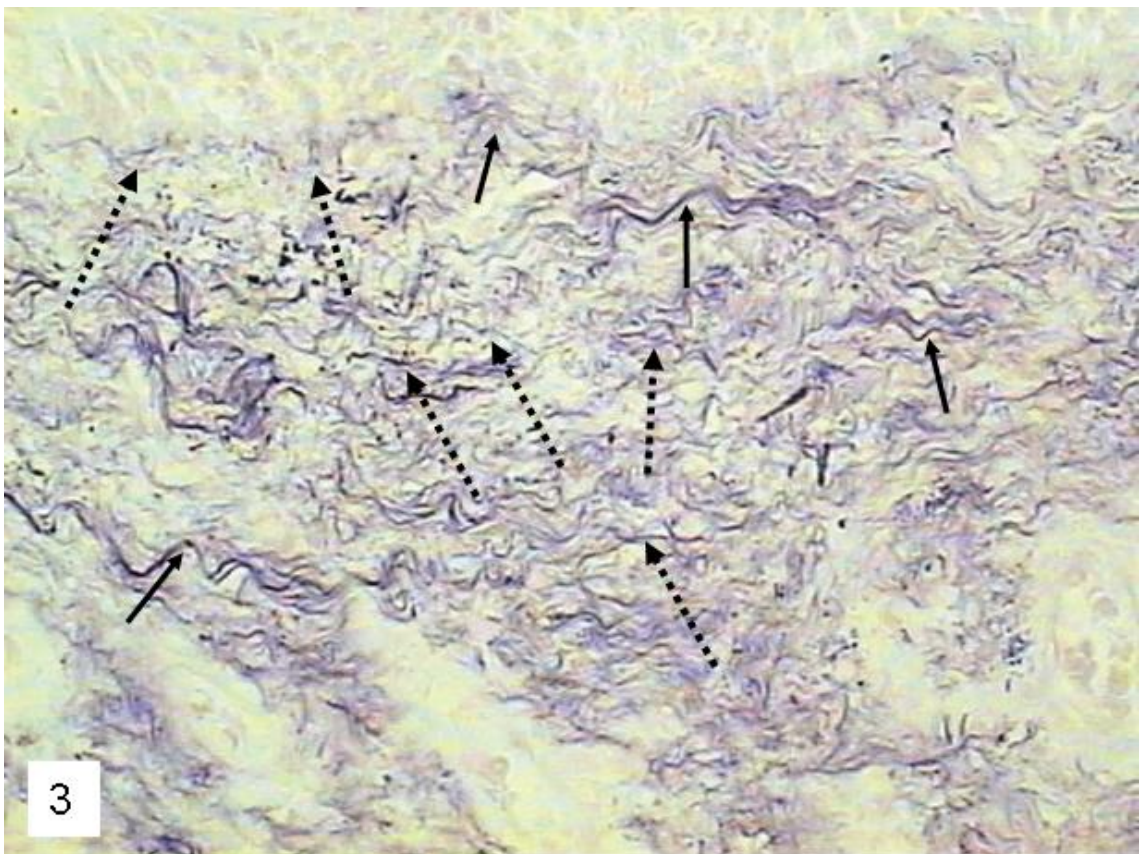
Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema

Fig. 4. Coronal histologic section of the vocal fold specimen with Reinke's edema of a 58-years-old woman, stained with Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation. Note the disarrangement ++ characterized by large areas of elastic fibers disarrangement (dotted arrows) (magnification X 400).

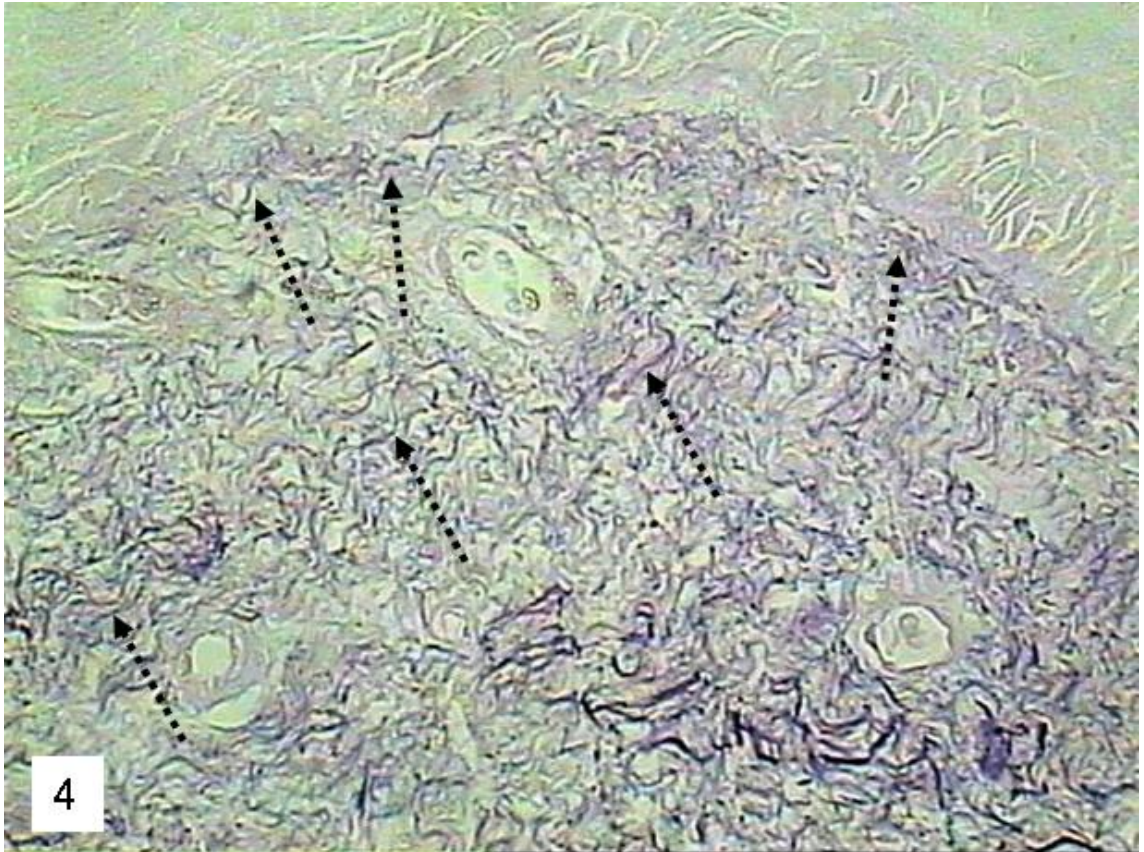
Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema



Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema



Distribution of elastic system fibers in Reinke's edema



1 INTRODUÇÃO

Hirano e Kakita (1985) introduziram a teoria de corpo e cobertura, dividindo a prega vocal em três estruturas. A cobertura está situada superficialmente e consiste no epitélio e na camada superficial da lâmina própria. A região de transição inclui a camada intermediária e profunda da lâmina própria, formando o ligamento vocal. O músculo vocal é o corpo da prega vocal. Dentro do conceito fisiológico desta teoria, os tecidos da região mais superficial, cobertura, deslizam-se sobre uma estrutura mais rígida, o corpo da prega vocal.

A camada superficial da lâmina própria ou espaço de Reinke apresenta componentes celulares e extracelulares, sendo a grande maioria extracelular. O tecido extracelular contém proteínas, lipídios e carboidratos. As proteínas fibrosas são os colágenos e as elastinas e as intersticiais são as proteoglicanas (PG) e as glicoproteínas (GP) (Gray et al, 1993).

O espaço de Reinke é a região que mais vibra durante a fonação, necessitando de um arcabouço fibroso para manter a sua integridade estrutural. As proteínas fibrosas são estruturas importantes na formação deste arcabouço conferindo a manutenção da morfologia e participando nas propriedades biomecânicas da prega vocal (Gray et al, 2000).

Melo et al (2003) utilizaram o método da Picrossírius-polarização para descrever as fibras colágenas da lâmina própria da prega vocal normal, evidenciando uma fina faixa de fibras colagenosas, logo abaixo da membrana basal do epitélio que apresenta um arranjo de fibras entrelaçadas em uma delicada trama semelhante a

uma “cesta de vime”. As fibras colágenas permitem o alongamento da prega vocal, enquanto que as fibras elásticas estocam a energia necessária para o sistema voltar ao repouso. Este estudo abriu novas perspectivas para a caracterização do espaço de Reinke em doenças que afetam a prega vocal.

Doenças mucosas benignas das pregas vocais como os nódulos, pólipos e edema de Reinke (ER) são lesões que apresentam algum grau de alteração na camada superficial da lâmina própria. O edema de Reinke é definido com um edema uni ou bilateral de toda a prega vocal, séssil e muito móvel durante a fonação (Dijkers e Nikkels, 1995), podendo provocar grandes deformidades na prega vocal. A sua fisiopatologia ainda permanece desconhecida, porém é frequentemente associado ao tabagismo e envelhecimento (Sato et al, 1999).

Alterações nas proteínas fibrosas, colágeno e elastina, estão presentes no edema de Reinke, porém existem poucos trabalhos sobre este assunto na literatura (Remenár et al, 1984; Volić et al, 1996). O estudo destas alterações histológicas pode permitir melhor compreensão de sua fisiopatologia, favorecendo também o desenvolvimento de novas opções de tratamento.

Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a matriz extracelular com edema de Reinke, este estudo foi idealizado para descrever a distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas do espaço de Reinke com edema de Reinke e comparar com a prega vocal normal. Além disso, iremos procurar fatores que podem estar relacionados com a severidade do edema.

1.1 Objetivos principais

1. Descrever a distribuição das fibras colágenas na camada superficial da lâmina própria da prega vocal com Edema de Reinke através do Método da Picrossírius-polarização, e comparar com a distribuição na prega vocal normal.
2. Descrever a distribuição do sistema de fibras elásticas da camada superficial da lâmina própria da prega vocal com Edema de Reinke através da técnica da Resorcina-fucsina de Weigert, e comparar com distribuição na prega vocal normal.

1.2 Objetivos secundários

1. Correlacionar os achados histológicos na prega vocal com edema de Reinke com a idade, consumo de cigarro e tempo de disfonia.
2. Avaliar possíveis diferenças entre o edema de Reinke grau II e III quanto à distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas, idade, sexo, raça, consumo de cigarro e tempo de disfonia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histologia da camada superficial da lâmina própria ou espaço de Reinke

O anatomista alemão Reinke (1895) descreve que ar ou líquido injetado na superfície mucosa da prega vocal difunde-se livremente em um espaço fechado subepitelial que fica confinado por tecido conectivo denso. Os limites deste espaço são: crânio-caudalmente a linha arcuata superior e inferior, onde o epitélio escamoso da prega vocal torna-se cilíndrico; a borda anterior deste espaço consiste numa membrana elástica localizada na comissura anterior; a borda posterior corresponde onde o perímio da prega vocal adere ao processo vocal da aritenóide.

Hajek (1925) que também fazia experimentos de infusão na laringe credita a Reinke à identificação deste compartimento subepitelial. Este espaço é chamado de espaço de Reinke.

Hirano (1974) descreve a prega vocal como uma estrutura vibrátil contendo a cobertura, representada pela mucosa e o corpo correspondendo ao músculo e ao ligamento vocal. É o primeiro autor a correlacionar a histologia com a fisiologia da prega vocal.

Hirano (1975) descreve histologicamente a prega vocal em cinco camadas com o epitélio, a camada superficial contendo poucas estruturas protéicas, a camada intermediária rica em fibras elásticas, a camada profunda rica em fibras colágenas e a camada muscular. As camadas intermediária e profunda são chamadas de ligamento

vocal. O epitélio e a camada superficial são chamados de cobertura, a camada intermediária e profunda de zona de transição e a camada muscular de corpo.

Hirano (1981) aprofunda os seus conhecimentos histológicos da prega vocal e descreve que a camada superficial da lâmina própria é formada por células, principalmente fibroblastos e uma matriz extracelular contendo glicosaminoglicanas, proteoglicanas e poucas proteínas fibrosas. Observa fibras colágenas finas entrelaçadas frouxamente e poucas fibras elásticas.

Hirano e Kakita (1985) propõem a Teoria de Corpo e Cobertura da vibração das pregas vocais. A cobertura constituída do epitélio e da camada superficial da lâmina própria move-se sobre o corpo formado pelo músculo vocal que permanece fixo, porém com propriedades contráteis.

Bonnaure-Mallet e Lescoat (1989) estudam o sistema elástico das pregas vocais humanas, verificando que as fibras oxitalânicas e elaunínicas estão presentes da idade fetal até a adulta na camada superficial da lâmina própria, porém que diminuem com o aumento das fibras elásticas principalmente nas camadas profundas e musculares da prega vocal.

Gray et al (1993) revisam a estrutura molecular e celular da prega vocal humana e evidenciam que o colágeno tipo III predomina na lâmina própria da prega vocal.

Ishii et al (1996) descrevem por técnicas de microscopia eletrônica as fibras colágenas e elásticas da lâmina própria. Na camada superficial são observadas fibras elásticas finas dispostas longitudinalmente misturadas com fibras elásticas em espiral. Fibras colágenas finas são observadas bem perto de epitélio compondo a membrana basal e na camada superficial há fibras colágenas em agrupamentos.

Fibras oxitalânicas estão presentes difusamente em todas as camadas. Em pacientes idosos e com tumores há um desarranjo das fibras elásticas. As fibras colágenas são consideradas importantes para a manutenção e plasticidade da estrutura da prega vocal e as fibras elásticas envolvidas no rápido retorno da morfologia da prega vocal após distorções com a vibração.

Sato e Hirano (1997) verificam que as fibras elásticas de indivíduos idosos mudam de morfologia comparada com as fibras elásticas dos adultos jovens, ocorre um aumento da substância amorfa e uma diminuição das microfibrilas. Há também alteração no metabolismo das fibras elásticas. Os resultados sugerem que as fibras elásticas aparentemente perdem a sua função de elasticidade e contribuem parcialmente com as alterações na voz observadas no envelhecimento.

Hammond et al (1997) estudam a morfologia da prega vocal humana através de dois constituintes da matriz extracelular: elastina e ácido hialurônico. A elastina é observada pela coloração de Verhoeff, distribuindo-se em menor quantidade na camada superficial da lâmina própria, porém com elastina nas formas oxitatânicas e elaunínicas. Estas últimas coram-se pouco pela coloração de Verhoeff.

Catten et al (1998) analisam a localização e a concentração de três tipos de células na lâmina própria. Os fibroblastos são as células mais abundantes, principalmente na região 20% mais profunda da lâmina própria. Os miofibroblastos são mais abundantes nos 60% mais superficiais e os macrófagos quando presentes (36% dos casos) são mais abundantes nos 20% mais superficiais da lâmina própria. Os resultados sugerem que a camada superficial da lâmina própria é uma região em constante reparo e que apresenta maior estresse vibratório durante a fonação.

Hammond et al (1998) utilizam a coloração de Verhoeff para descrever um aumento na quantidade de fibras elásticas da lâmina própria de pregas vocais humanas com a progressão da idade, não sendo observado diferenças em relação ao sexo. Na camada superficial existem fibras elásticas esparsas. A maior concentração de fibras elásticas encontra-se na camada intermediária que em idosos torna-se mais superficial.

Milutinović et al (1998) observam que na camada superficial da lâmina própria, as fibras do tecido conectivo apresentam uma distribuição paralela à borda livre da prega vocal que facilita aparentemente os movimentos médio-laterais da prega vocal durante a vibração.

Sato (1998) descreve fibras reticulares finas distribuídas em um arranjo tridimensional na camada superficial da lâmina própria com espaços entre as fibras reticulares cobertos por glicoproteínas, proteoglicanas e fibras elásticas. Consideram este complexo de estruturas importante para as propriedades viscoelásticas da lâmina própria e conseqüentemente para o comportamento vibratório da prega vocal.

Hammond et al (2000) quantificam a distribuição das fibras colágenas de laringes masculinas e femininas de crianças, adultos e idosos. Observam um aumento de colágeno com a idade e uma diferença em relação ao sexo, com maior concentração de colágeno em homens adultos e idosos. Discutem a necessidade de correlacionar estes achados histológicos com as propriedades biomecânicas da voz.

Hirano et al (2000) estudam por microscopia eletrônica os fibroblastos da mácula flava e do espaço de Reinke. Verificam que com o envelhecimento, os fibroblastos da mácula flava tornam-se menos ativos, já os fibroblastos do espaço de

Reinke apresentam maior atividade, o que pode estar correlacionado com o aumento da espessura encontrado neste espaço na população geriátrica.

Ishii et al (2000) analisam as alterações morfológicas na lâmina própria das fibras colágenas e elásticas que ocorrem durante a idade. Em neonatos observam estruturas imaturas com áreas densas e esparsas, sem o arranjo longitudinal das fibras. Com um ano de idade existe a produção de fibras longitudinais com diferenciação da mácula flava. Entre três e cinco anos de idade as fibras longitudinais aumentam em número, a camada intermediária começa a adquirir forma de ligamento, porém não se diferencia camada superficial. Com 12 anos de idade ocorre à diferenciação entre as camadas superficial e intermediária, surgem fibras elásticas finas em espiral na camada superficial e as fibras da camada intermediária tornam-se maduras. Entre 15 e 17 anos em homens ocorre a diferenciação final das fibras colágenas.

Gray et al (2000) relacionam as fibras colágenas e elásticas com as propriedades biomecânicas da prega vocal. As fibras colágenas são consideradas estruturas importantes para suportar tensão e estiramento da prega vocal e as fibras elásticas permitem a deformidade e o retorno para a forma original.

Sato et al (2001) observam que o espaço de Reinke em recém-nascidos apresenta estruturas esparsas compostas de fibras colágenas, reticulares e elásticas imaturas e proteínas intersticiais como a fibronectina. Em crianças aumentam-se os componentes fibrosos, ainda não se forma ligamento vocal e existe um aumento de fibronectina. Concluem que durante a infância ocorre a síntese da matriz extracelular pela mácula flava até a formação da estrutura tridimensional que tem propriedades viscoelásticas para a vibração da prega vocal.

Sato et al (2002) avaliam as alterações das fibras colágenas na lâmina própria com o envelhecimento. Em idosos, na camada superficial, as fibras colágenas aumentam e as fibras reticulares diminuem especialmente em homens. As fibras colágenas têm a sua morfologia alterada formando feixes e os espaços entre elas diminuem. Altera-se a estrutura tridimensional das fibras colágenas e reticulares com a idade.

Melo et al (2003) realizam um estudo com o método da Picrosírius-polarização em que mostram a distribuição espacial do colágeno na lâmina própria e no músculo da prega vocal humana e descrevem o arranjo entrelaçado das fibras como semelhante a “cesta de vime”. Identificam dois tipos de fibras colágenas na prega vocal humana: fibras colágenas tipo I, coradas em amarelo ou vermelho, grossas e fortemente birrefringentes e as fibras colágenas tipo III coradas em verde, finas e fracamente birrefringentes. Este estudo ressalta a importância da organização das fibras colágenas na biomecânica da produção do som e na formação de um arcabouço fibroso.

Hartnick et al (2005) realizam estudos com laringes de cadáveres entre zero e 18 anos de idade para verificar as mudanças estruturais na lamina própria. Com dois meses de idade observam a formação de uma estrutura bilaminar e com 7 anos a formação da estrutura trilaminar da lâmina própria, porém com formação completa apenas na adolescência.

Thibeault (2005) realiza um artigo de revisão sobre o espaço de Reinke, incluindo publicações sobre a biomecânica, histologia, biologia molecular e engenharia tecidual desta região. O artigo de Melo et al (2003) é revisado e reforça a

necessidade de estudar com o método da Picrossírius-polarização a lâmina própria de doenças laríngeas.

Hahn et al (2006a) observam que histologicamente a distribuição do sistema de fibras elásticas na lâmina própria de pregas vocais humanas apresenta mais similaridade com a dos porcos comparado com a dos outros animais estudados (cão e furão). As fibrilinas-1 marcadas que são microfibrilas primárias associadas com todas as formas de fibras elásticas estão mais localizadas em humanos na camada superficial da lâmina própria, o que indica uma maior quantidade de fibras oxitalânicas nesta região. Além disso, o estudo mostra uma maior taxa de renovação das fibras elásticas na camada superficial da lâmina própria através da tropoelastina. Os resultados suportam a idéia de que esta região apresenta maior estresse mecânico, por isso a necessidade de constante renovação e maior quantidade de fibras oxitalânicas.

Hahn et al (2006b) realizam um estudo quantitativo e com marcadores de imunistoquímica para colágeno tipo I, II, III e IV e dois marcadores de renovação de colágeno em pregas vocais de humanos, cães, porcos e furões. A distribuição das fibras colágenas de pregas vocais humanas apresenta maior semelhança com a lâmina própria de porcos. Os colágenos tipo I e III são predominantes na lâmina própria e há uma distribuição espacial dos marcadores de renovação de colágeno que pode estar implicado com a vibração da prega vocal.

Tateya et al (2006) examinam em 5 pregas vocais humanas pela técnica de imunistoquímica, a presença de colágenos tipos I, III, IV, V e elastina. O colágeno tipo III está distribuído em toda lâmina própria e forma fibras grossas e finas, o colágeno tipo I apresenta fibras finas e está distribuído na camada superficial da

lâmina própria próxima à membrana basal, na camada profunda e na mácula flava. O colágeno tipo IV e V estão presentes na membrana basal. A elastina está distribuída na camada superficial próxima à membrana basal, na camada intermediária e profunda da lâmina própria e na mácula flava. A região da camada superficial da lâmina própria apresenta características diferentes da sua camada mais profunda, com a organização de uma estrutura fibrosa formada de colágeno tipo I, tipo III e elastina.

Tateya et al (2007) realizam um estudo com microscopia eletrônica para identificar os tipos de fibras colágenas na lâmina própria. Os resultados sugerem que tanto as fibras colágenas como as reticulares são formadas pelo colágeno tipo I e tipo III.

Buhler et al (2008) descrevem na lamina própria de laringes fetais com a técnica da Picrossírius-polarização o mesmo arranjo entrelaçado das fibras colágenas observado em pregas vocais de adultos.

2.2 Edema de Reinke e alterações histológicas da lâmina própria

Hajek (1925) induz experimentalmente com injeções subepiteliais de azul de metileno um edema localizado na prega vocal, como no edema de Reinke que já havia relatado na sua prática clínica, sendo atribuído a ele a primeira descrição de ER. Apesar disso, Reinke (1895) que apresenta a justificativa anatômica para este

acúmulo de líquidos, por isso o edema crônico desta região é chamado de Edema de Reinke.

Jackson C e Jackson CL (1937) descrevem tumores de origem inflamatória chamando-os de cordite polipóide, pois freqüentemente estão associados com laringite crônica.

Putney e Clerf (1940) chamam as alterações de pregas vocais com edema e fibrose de laringite crônica hipertrófica e concluem que estão relacionadas com abuso vocal ou infecção.

Waldapfel (1940) descreve que entre o epitélio e a camada muscular da prega vocal existe uma camada fina com tecido conectivo frouxo. Relata dois casos com edema difuso nesta camada com grandes dilatações que afasta a camada muscular. Corresponde a uma expansão da camada subepitelial, semelhante aos experimentos de infiltração realizados por Reinke (1895), porém em condições patológicas. O edema é atribuído a alterações no sistema venoso e linfático.

Myerson (1950) estuda 143 pacientes fumantes e descreve alterações polipóides difusas em estágios variados de apresentações, desde pequenos edemas até grandes massas bilaterais polipóides e sésseis. Histologicamente apresentam um tecido fibroso dentro de um estroma edematoso, sendo o processo resultado do tabagismo.

Holinger e Johnson (1951) chamam o edema difuso como degeneração polipóide, pois histologicamente é semelhante aos pólipos pedunculados.

Wallner (1954) reforça os achados de Myerson (1950) atribuindo o tabaco como o causador da degeneração polipóide.

Kosoković (1974) observa que o edema está dentro de um tecido fibrótico denso na prega vocal que o mantém bem localizado. Clinicamente, o edema está mais localizado nos dois terços anteriores da prega vocal, que é uma região de maior trauma durante a fonação, por isso o fator mecânico é considerado importante para a gênese do edema.

Koutsibelas et al (1978) através de microscopia eletrônica observam no ER um intenso alargamento dos espaços intercelulares, com a presença de uma substância densa principalmente na camada epitelial.

Remenár et al (1984) realizam um estudo com microscopia óptica e eletrônica e descrevem lamelas formadas de fibras colágenas e fibras elásticas jovens que no ER estão mais separadas pela substância amorfa composta pelo edema.

Loire et al (1988) revisam a histologia de algumas doenças benignas da laringe. No ER encontram uma lâmina própria marcada por edema e vasos sanguíneos dilatados, e aumentados em número. Não há aumento da deposição de colágeno e a membrana basal está em alguns casos espessada.

Dikkers et al (1993) descrevem a membrana basal através da microscopia eletrônica de 13 pregas vocais com lesões benignas da laringe incluindo quatro com ER. Observam um espessamento da membrana basal e perda da arquitetura normal dos hemidesmossomas. As observações são sugestivas de uma hiperatividade das células da camada basal do epitélio em resposta a um estresse vibratório.

Dikkers e Nikkels (1995) caracterizam o edema de Reinke como uma lesão com membrana basal espessa, lagos de edema e aumento da espessura dos vasos sanguíneos. Sugerem o tabagismo e o envelhecimento como fatores importantes para a iniciação e manutenção da lesão.

Gray et al (1995) examinam a deposição de fibronectina, uma glicoproteína produzida por fibroblastos em resposta à lesão tecidual e do colágeno tipo IV, que é um bom marcador de espessamento de membrana basal, em espécimes de pólipos, nódulos e edema de Reinke. Dois padrões de alterações são caracterizados: o primeiro que é mais freqüente em nódulos vocais mostra intensa deposição de fibronectina na camada superficial da lâmina própria e lesão da membrana basal; o segundo padrão mostra raras alterações de membrana basal e pouca deposição de fibronectina que é característico no edema de Reinke e em alguns pólipos. Sugerem que a ausência de glicoproteínas pode levar a prega vocal a ser mais propensa a deformidades.

Remacle et al (1996) estudam microscopicamente 163 amostras de 119 pacientes com pólipos, nódulos e edema de Reinke. Em todos os casos é descrito um fenômeno exsudativo no espaço de Reinke com estágios de edema, fibrose, depósitos de fibrina e desenvolvimento de ectasia vascular, sendo que em um grande número de lesões os fenômenos histológicos são inespecíficos prevalecendo o edema como o denominador comum. Sugere-se que no ER, o tabaco e o álcool causam efeitos irritativos em toda a prega vocal e por isso a lesão é difusa e não localizada como em nódulos e pólipos.

Volić et al (1996) dividem o ER utilizando critérios morfológicos em uma forma translúcida e outra pálida, com dez amostras de cada. Realizam análise citológica, histológica e histoquímica com Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) que mede a taxa de proliferação celular. Os achados mostram padrões histológicos variados no ER com relação ao edema na lâmina própria e a fibrose encontrada. O tecido conectivo apresenta-se totalmente desorganizado. Na forma

pálida há múltiplos, dilatados e irregulares elementos vasculares. Especula-se que a forma translúcida está mais associada ao tabagismo, pois o AgNor mostra maior atividade das células estromais da lâmina própria cujo tabaco é o agente estimulador que leva ao edema.

Courey et al (1996) descrevem por técnicas de imunistoquímica a distribuição de colágeno tipo IV e fibronectina em lesões benignas da laringe incluindo pólipos, nódulos, cordite polipóide e cistos. Nas três primeiras lesões, a fibronectina está presente com padrões de densidade alterados associado com espessamento da membrana basal.

Zeitels et al (1997) apontam o abuso vocal associado com o tabagismo e/ou refluxo gastroesofágico como fatores importantes para o desenvolvimento do ER, porém os autores ressaltam a necessidade de estudos da ultraestrutura da matriz extracelular de pacientes com ER para elucidar as variações na oscilação glótica encontradas na estroboscopia.

Dijkers e Nikkels (1999) analisam a lâmina própria de nódulos, pólipos e edema de Reinke. São observadas fibras elásticas em distribuição perpendicular a membrana basal mais freqüentemente em nódulos. A distribuição e a quantidade de colágeno não são específicas para nenhum tipo de lesão estudada e o acúmulo de ácido hialurônico em vasos sanguíneos ocorre somente em pólipos. Concluem que não há alterações histológicas específicas com análise de fibras colágenas, elásticas e ácido hialurônico que permitam diferenciar as três lesões benignas estudadas.

Sato et al (1999) realizam um estudo com 10 amostras de pregas vocais com ER com especial atenção para os vasos sanguíneos no espaço de Reinke. Os principais achados revelam que os vasos apresentam um fino endotélio com muitas

fenestras e espessamento da membrana basal. A parede dos vasos apresenta-se mais fina e com poucos pericitos. Portanto, há uma fragilidade vascular com aumento da permeabilidade que pode levar a um extravasamento tecidual e conseqüentemente ao edema. Os fatores mais envolvidos nestas alterações são o tabagismo e o envelhecimento.

Macotullio et al (2002) realizam a análise histológica de 125 pacientes com ER seguindo a classificação de Hellquist et al (1982) e avaliam a associação de ER com tabaco, abuso vocal e refluxo gastroesofágico. O estudo mostra que o principal fator de risco para o ER e sua recorrência é o tabagismo.

Thibeault et al (2002) realizam um estudo preliminar com cinco amostras de pólipos de pregas vocais e quatro de edema de Reinke correlacionando os perfis genotípicos com a rigidez da prega vocal visto pela videoestroboscopia. Os perfis genotípicos da matriz extracelular destas lesões são analisados através do RNA mensageiro do procolágeno I, da colagenase, elastase, fibronectina, fibromodulina, decorina, do ácido hialurônico sintestase 2 e da hialuronidase. O estudo suporta a hipótese de que existe uma relação entre a expressão genotípica encontrada em pólipos e edema de Reinke com o fenótipo definido por uma perda ou diminuição da onda mucosa. Estes achados indicam também que pólipos e edemas de Reinke apresentam origens biológicas diferentes e não representam um continuum.

Pastuszek et al (2003) analisam por técnicas de microscopia eletrônica amostras de ER. Concluem que no ER os vasos sanguíneos estão dilatados e aumentados no espaço subepitelial marcado por edema, principalmente no sexo feminino, apontando algum fator hormonal pelo achado. As junções intercelulares

estão frouxas com os espaços intercelulares aumentados, especialmente nas camadas basal e espinhosa.

Volić et al (2004) mostram por técnicas de AgNor e imunistoquímica que o ER é caracterizado por um excesso de produção de matriz extracelular causado por uma maior atividade das células estromais e epiteliais. Sugerem que essas alterações são resultados de um processo de reparação contra fatores agressores como o tabaco e o fonotrauma.

Jovanovic et al (2007) utilizam a endoscopia de contato para estimar as alterações vasculares na lâmina própria do ER. Observam vasos sanguíneos com diferentes direções e diâmetros que apresentam anastomoses e ramificações. O fluxo sanguíneo apresenta-se descontínuo ou turbulento. As alterações correlacionam-se aos achados histológicos.

2.3 Métodos de coloração: Picrossírius-polarização e Resorcina-fucsina de Weigert

O estudo histoquímico do colágeno permitiu um melhor entendimento da biologia da família das macromoléculas de colágeno nas últimas duas décadas. Dois métodos o imunistoquímico e da Picrossírius-polarização contribuem significativamente para o estudo do colágeno (Montes, 1996).

As moléculas de colágeno são ricas em aminoácidos básicos, por isso reagem fortemente com as substâncias ácidas. Sirius Red é uma molécula ácida que interage com o colágeno e promove um aumento de sua birrefringência normal pela

disposição paralela ao longo do eixo de cada molécula de colágeno. O método da Picrossírius-polarização é específico para as estruturas de colágeno composto por moléculas agregadas e orientadas, que é uma característica do colágeno dos mamíferos (Montes, 1996).

O uso associado da microscopia de polarização proposta por Junqueira et al (1979) contribui significativamente para o estudo da distribuição do colágeno em diversos tecidos normais (Montes et al, 1980; Junqueira et al, 1983; Lemos et al, 1997) e patológicos (Andrade et al, 1997; Mauad et al, 1996; Negri et al, 2000). O colágeno tipo I aparece como fibras grossas de cor amarela ou vermelha, fortemente birrefringente, enquanto o colágeno tipo III como fibras finas, esverdeadas e fracamente birrefringentes (Montes, 1996).

Melo et al (2003) utilizam o método da Picrossírius-polarização na prega vocal humana normal, descrevendo a distribuição do colágeno tipo I e III na lâmina própria que formam um arranjo entrelaçado de fibras em uma delicada trama semelhante a uma cesta de vime. Buhler et al (2008) utilizam esta mesma técnica em laringes humanas fetais.

As fibras do sistema elástico (fibras elásticas maduras, oxitalânicas e elaunínicas) coram-se por métodos específicos como Verhoeff, resorcina-fucsina de Weigert, aldeído-fucsina e orceína Unna-Tanzer (Montes, 1996).

Com o método de Verhoeff somente as fibras elásticas maduras, que contém grande quantidade de elastina são visualizadas. Por outro lado, o método da resorcina-fucsina de Weigert é mais sensível e cora também as fibras elaunínicas, que possuem menos elastina. A oxidação prévia com oxone aquoso a 10%

(monopersulfato) permite a coloração das fibras oxitalânicas, que possuem apenas microfibrilas (Cotta-Pereira et al, 1976; Montes, 1996).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Após a aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 332/05) iniciou-se a captação das amostras de pregas vocais de pacientes com Edema de Reinke e de pregas vocais normais de laringes humanas excisadas.

3.1.1 Seleção dos pacientes com Edema de Reinke

Foi realizado um estudo prospectivo e selecionados 20 indivíduos do Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) que apresentavam Edema de Reinke.

O diagnóstico foi realizado segundo critérios macroscópicos de Dikkers e Nikkels (1995), sendo utilizado a videoendoscopia laríngea com um endoscópio rígido de 70º marca Karl-Storz acoplado a uma câmera (CCD) de marca Toshiba, modelo IK-M41A e num aparelho de estroboscopia marca KAY, modelo RLS 9100.

As imagens foram gravadas em Digital Vídeo Disc (DVD) com aparelho de DVD marca Panasonic, modelo DVD-S1LB-S.

O edema foi graduado de acordo com a sua severidade segundo critérios de Yonekawa (1988). A graduação é determinada na inspiração com as aritenóides abduzidas: no grau I, o contato das pregas vocais está confinado ao terço anterior da prega vocal musculomembranosa; no grau II, o contato das pregas vocais está confinado aos dois terços anteriores; no grau III, o contato se estende até o terço posterior da prega vocal musculomembranosa.

Os critérios de inclusão do estudo foram: pacientes com edema de Reinke grau II ou III; pacientes com queixas vocais importantes com desejo de operar para melhora da voz e autorização mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nos edemas de Reinke grau II ou III era possível a retirada de uma amostra para o estudo sem que se prejudicasse a realização da técnica cirúrgica para a sua remoção. Foram excluídos os edemas de Reinke com lesões polipóides associadas e pacientes com microcirurgia de laringe prévia, pois poderiam influenciar nos resultados histológicos.

Os pacientes selecionados foram avaliados quanto à idade, sexo, raça, ao consumo de cigarro e tempo de disfonia. O consumo de cigarro foi medido pela unidade maço/ano que é utilizada para definir a quantidade de maços fumados por determinado tempo.

3.1.2 Técnica Cirúrgica para retirada das amostras de Edema de Reinke

Todas as cirurgias ocorreram no Centro Cirúrgico do HC-FMUSP. Na microcirurgia de laringe foi utilizado um laringoscópio de suspensão marca Micro-France, modelo MCL-77, com clip de iluminação marca Karl Storz, modelo Benjamin-Havas, conectado a fonte de luz Welch Allyn, modelo LCI-200 com o paciente sob anestesia geral e intubação orotraqueal. Operou-se com um microscópio cirúrgico marca DF-Vasconcelos, modelo M900 com lente de 400 mm. A cirurgia foi realizada pelos médicos residentes do serviço, porém a retirada das amostras de ER foi realizada pelo pesquisador do estudo, em todos os casos no início da cirurgia. A avaliação intra-operatória determinava de qual prega vocal seria retirada a amostra do estudo, optando-se pela prega vocal com maior edema. Em 12 casos foi retirada da prega vocal direita e em oito casos da prega vocal esquerda.

A técnica utilizada para retirada do edema seguiu os princípios fonomicrocirúrgicos da técnica de sucção (Hirano et al,1976; Zeitels,1995), em que se eleva um retalho epitelial através de uma incisão na face vestibular da prega vocal e remove-se o edema, geralmente por aspiração ou quando muito viscoso com uma pinça tipo saca-bocado. Após a remoção do edema, o retalho epitelial é tracionado superiormente até cobrir a prega vocal, sendo o excesso ressecado com tesoura. Como os pacientes selecionados tinham edema grau II ou III, foi retirado através de uma incisão inicial longitudinal à prega vocal, entre os terços anteriores e posteriores, na sua face vestibular, um fragmento contendo epitélio e parte da camada superficial da lâmina própria com edema que tinha aproximadamente 5 mm

de comprimento. A incisão era aprofundada em direção ao ligamento vocal para retirada de maior quantidade de espaço de Reinke, porém deixando sempre um edema residual próximo ao ligamento vocal. Este fragmento constituiu a amostra do estudo.

3.1.3 Seleção das amostras controles e isolamento das pregas vocais das laringes excisadas

Dez pregas vocais foram obtidas de laringes de indivíduos não fumantes do Serviço de Verificação de Óbitos do HC-FMUSP como controles de pregas vocais normais pareados com média das idades dos pacientes com edema de Reinke.

As laringes foram retiradas através de uma incisão arciforme na região torácica dos cadáveres desde a língua até o quinto ou sexto arco traqueal, incluindo glândula tireóide e os músculos extrínsecos da laringe. As peças foram dissecadas removendo-se as partes moles, preservando apenas a laringe. Através de uma incisão longitudinal posterior, entre as cartilagens aritenóides, a laringe foi aberta. Ressecou-se uma hemilaringe que inclui cartilagem tireóide, prega vocal e aritenóide. Finalmente, isolou-se a prega vocal entre a comissura anterior e o processo vocal da cartilagem aritenóide. Foi realizado um corte coronal de cada prega vocal e obtido um fragmento de cinco milímetros de espessura da porção média da parte intermembranácea compreendendo epitélio, lâmina própria e músculo vocal, que foi submetido a preparações histológicas.

3.2 Preparações histológicas

As amostras de edema de Reinke e as pregas vocais controles foram fixadas em paraformaldeído por 24 horas, desidratadas em gradientes de concentração crescentes de álcool, diafanizadas, orientadas e impregnadas em parafina. Foram realizados três cortes coronais com cinco micrômetros de espessura e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), pela técnica da Picrossírius e pela técnica de Resorcina-fucsina de Weigert com oxidação prévia pelo oxone 10%.

3.3 Análises histológicas

Os cortes corados com HE foram analisados sob microscópio óptico para observar os aspectos histológicos dos tecidos das pregas vocais controles, a fim de avaliar possíveis alterações patológicas que excluirmos as amostras.

Os cortes corados pelo método da Picrossírius-polarização permitem a visualização das fibras colágenas. Este método baseia-se na coloração pelo Sírius Red, dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado para visualização de fibras colágenas sob microscopia de luz com polarização óptica (Melo et al, 2003).

Os cortes corados com resorcina-fucsina de Weigert com oxidação pelo oxone 10% coram os três tipos de fibras do sistema elástico: as fibras elásticas, as fibras oxitalânicas e elaunínicas (Montes, 1996).

3.4 Análises das imagens

As análises das imagens foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Utilizamos o software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), instalado em um microcomputador ligado a uma câmera digital (JVC, TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha) que pode ser utilizado com sistema de polarização.

Os métodos da Picrossírius-polarização e da resorcina-fucsina de Weigert permitiram a análise do arranjo das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas na camada superficial da lâmina própria com edema de Reinke. Os achados histológicos foram categorizados semiquantitativamente e utilizamos as seguintes categorias: \pm : item focalmente presente em pequena quantidade e ausente em áreas adjacentes; +: item focalmente presente em moderada quantidade e ausente em áreas adjacentes; ++: item presente em grande quantidade.

Os resultados foram confirmados por dois médicos patologistas com experiências nas técnicas utilizadas que não tinham conhecimento prévio do grau de edema das amostras analisadas.

3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram utilizadas para avaliar uma possível diferença entre o edema de Reinke grau II e III quanto à idade, consumo de cigarro, tempo de disfonia, sexo, raça e distribuição das fibras colágenas e elásticas. Consistiu no teste *t* de Student controlado pelo teste de Levene para igualdade de variâncias, para comparar as médias da idade, do consumo de cigarro e do tempo de disfonia. O teste de Qui-quadrado ajustado pela estatística de Fisher para variáveis não paramétricas foi utilizado para comparar o sexo, a raça e a distribuição das fibras colágenas e elásticas. Utilizamos também o teste de correlação de Spearman para avaliar a correlação dos resultados histológicos com a idade, consumo de cigarro e tempo de disfonia. Adotou-se o nível de significância de 5% (0,05) para a aplicação dos testes estatísticos, e utilizou-se o software SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences; Chicago, IL) para proceder às análises.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes com edema de Reinke e dos indivíduos controles

Foram incluídos nove casos de pacientes com edema de Reinke grau II e 11 casos com edema de Reinke grau III. Foram 17 indivíduos do sexo feminino e três do sexo masculino, com idade variando de 47 a 62 anos, média e desvio padrão de $55 \pm 4,4$ anos. Nove pacientes eram da raça branca, oito da raça parda e três da raça negra. Quinze pacientes eram tabagistas e cinco ex-tabagistas, sendo a média e desvio padrão de $22 \pm 10,7$ anos/maço. O tempo de disfonia variou de 6 meses a 60 meses com média e desvio padrão de $36 \pm 16,6$ meses.

Os indivíduos controles foram cinco do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com idade variando de 50 a 60 anos, média e desvio padrão de $55 \pm 4,1$ anos. Quatro indivíduos eram da raça branca, três da raça parda e três da raça negra.

4.2 Distribuição das fibras colágenas

A análise das lâminas pelo método de Picrossírius-polarização evidenciou um arranjo entrelaçado das fibras colágenas como semelhante a uma “cesta de vime” na camada superficial da lâmina própria das pregas vocais normais (Figura 1).

Já na camada superficial da lâmina própria das pregas vocais com edema de Reinke observou-se uma desestruturação do arranjo entrelaçado das fibras na maior parte das regiões desta camada. A desestruturação foi caracterizada por um afastamento das fibras, fragmentação, formando áreas esparsas e tomadas por um estroma mixóide de quantidade variável (Figura 2).

Duas populações de fibras colágenas foram observadas: fibras coradas em amarelo ou vermelho, grossas e fortemente birrefringentes e fibras coradas em verde, finas e fracamente birrefringentes. Observou-se que no ER há uma desestruturação das duas populações de fibras colágenas que compromete o arranjo entrelaçado das fibras (Figura 2).

Todos os casos mostraram uma maior preservação do arranjo das fibras colágenas próximo ao epitélio da prega vocal com edema de Reinke comparado com as fibras da camada mais profunda do espaço de Reinke (Figura 3).

Os achados histológicos foram categorizados semiquantitativamente e utilizamos as seguintes categorias: \pm : desestruturação focalmente presente em pequena quantidade e ausente em áreas adjacentes, chamada também de desestruturação de grau leve; +: desestruturação focalmente presente em moderada quantidade e ausente em áreas adjacentes, desestruturação de grau moderado; ++: desestruturação presente em grande quantidade ou desestruturação de grau intenso.

A Tabela 1 mostra as desestruturações das fibras colágenas categorizadas semiquantitativamente e separadas de acordo com a severidade do edema (Figuras 4a-b, Figuras 5a-b e Figuras 6a-b). Moderada e intensa desestruturações foram predominantes, presentes em 90% dos casos. Houve diferença estatisticamente significativa entre o edema de Reinke grau II e III quanto à desestruturação das fibras

colágenas ($p=0,007$), possivelmente pela intensa desestruturação presente em 73% dos casos de edema de Reinke grau III e em 44% dos casos de edema de Reinke grau II.

Tabela 1 – Avaliação semiquantitativa da desestruturação das fibras colágenas segundo a severidade do edema de Reinke

	Edema de Reinke grau II (n = 9)	Edema de Reinke grau III (n = 11)	TOTAL (n=20)
Desestruturação ±	1 (11,1%)	1 (9%)	2 (10%)
Desestruturação +	4 (44,4%)	2 (18,2%)	6 (30%)
Desestruturação ++	4 (44,4%)	8 (72,8%)	12 (60%)

$p= 0,007$ para comparação entre o edema de Reinke grau II e III quanto à desestruturação das fibras colágenas utilizando o teste de Qui-quadrado ajustado pela estatística de Fisher

A arquitetura tecidual das fibras de colágeno na camada superficial da lâmina própria de pregas vocais normais e com edema de Reinke foi representada em esquemas tridimensionais (Figuras 7a-b).

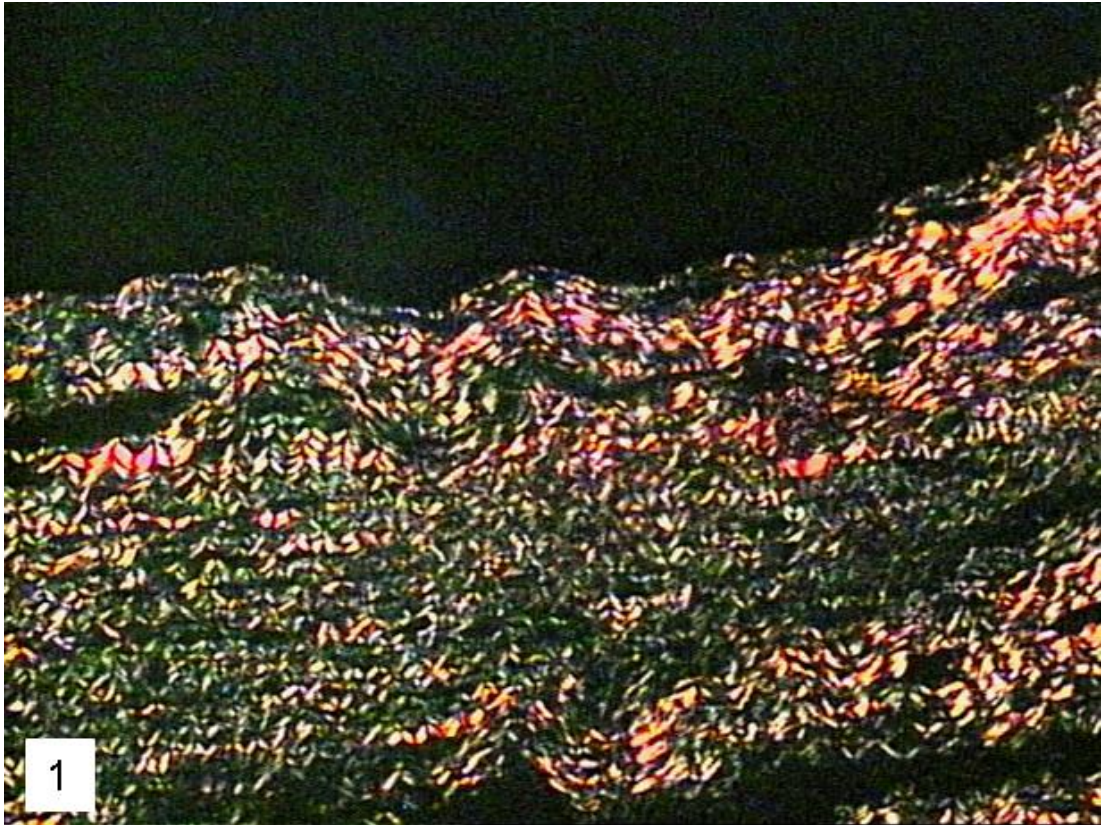


Figura 1 - Corte histológico coronal da porção média da glote intermembranácea de uma prega vocal normal, de uma mulher com 55 anos, corado pelo Picrosirius e observado sob luz polarizada. Observe o arranjo entrelaçado das fibras colágenas. X 200.

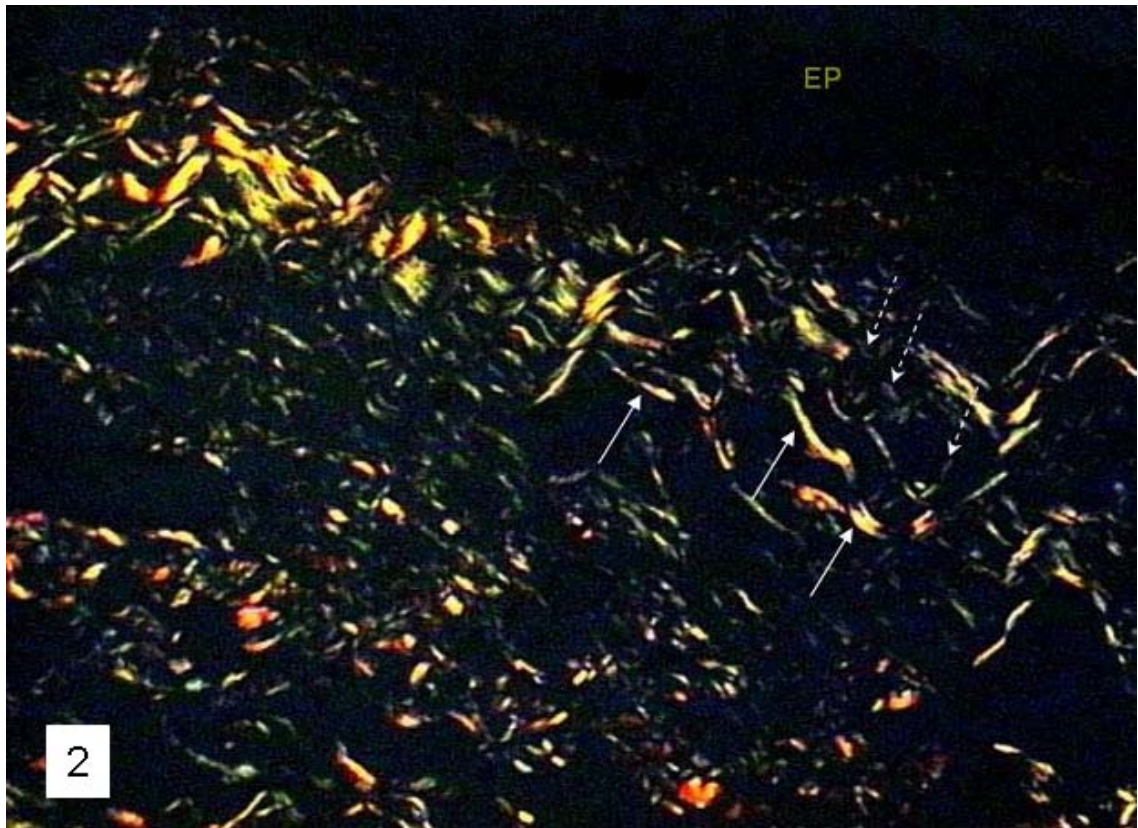


Figura 2 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 55 anos, corado pelo Picrossírius e observado sob luz polarizada. Observe a desestruturação do entrelaçado das fibras colágenas, tanto das fibras coradas em amarelo ou vermelho, grossas e fortemente birrefringentes (setas contínuas) como das fibras coradas em verde, finas e fracamente birrefringentes (setas em pontilhado). X 400, EP = epitélio.

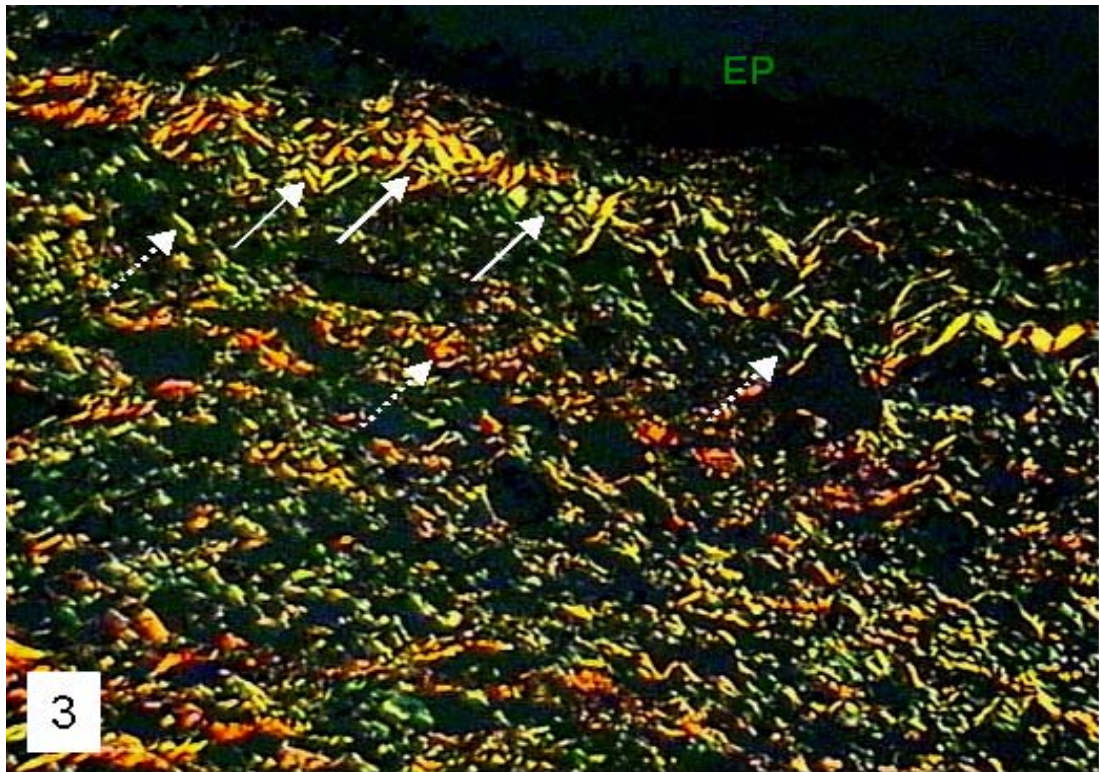


Figura 3 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 55 anos, corado pelo Picrosirius e observado sob luz polarizada. Observe uma maior preservação do arranjo das fibras colágenas próximo ao epitélio (setas contínuas) comparado com as fibras da camada mais profunda do espaço de Reinke (setas em pontilhado). X 200, EP = epitélio.

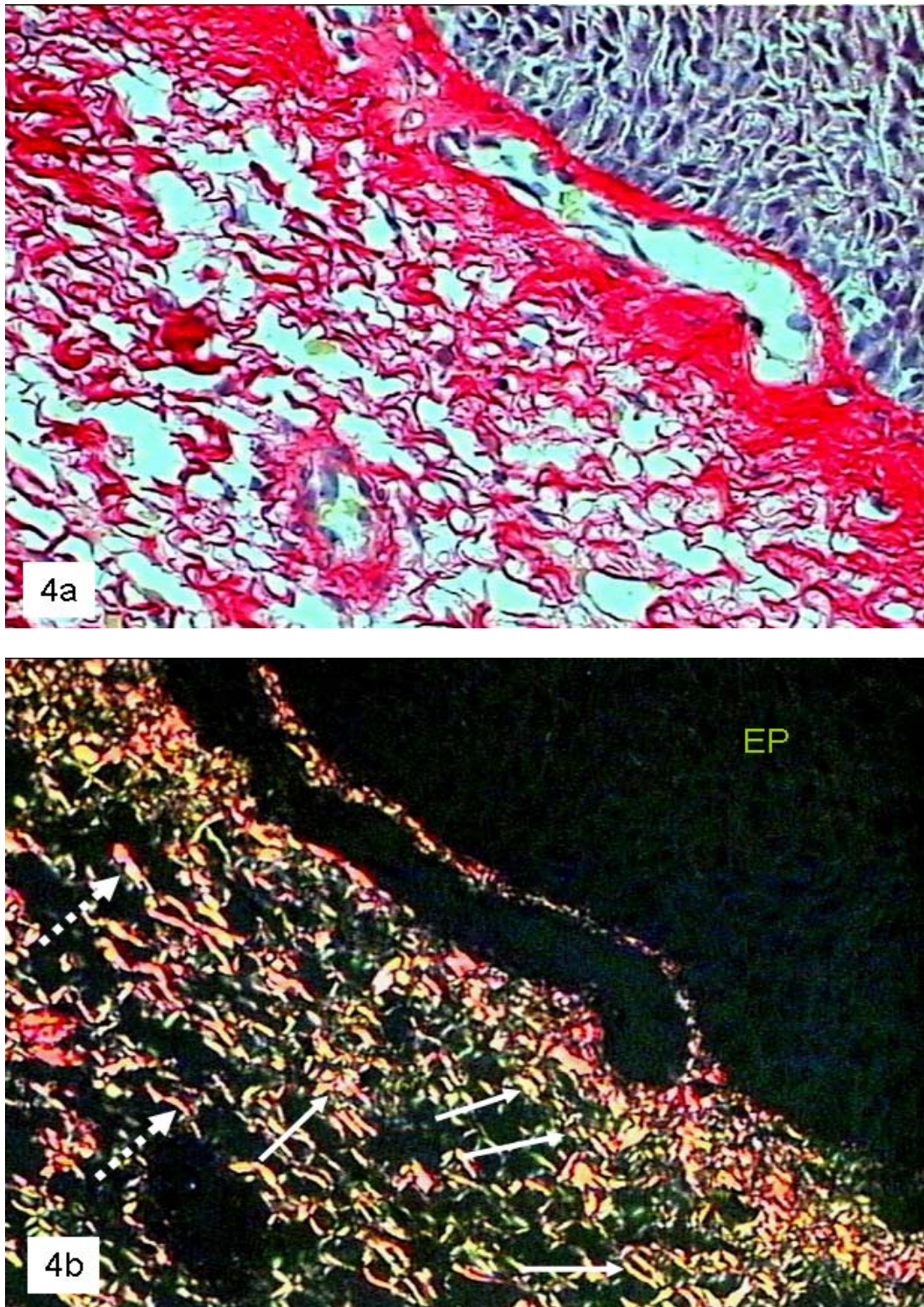


Figura 4 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 58 anos, corado pelo Picrosíruius e observado sob luz convencional (a) e polarizada (b). Nota-se a desestruturação de grau leve do entrelaçado das fibras colágenas, caracterizada por pequena quantidade de áreas de desestruturação (setas em pontilhado) e grande quantidade de áreas com preservação do arranjo entrelaçado das fibras colágenas (setas contínuas). X 400, EP = epitélio

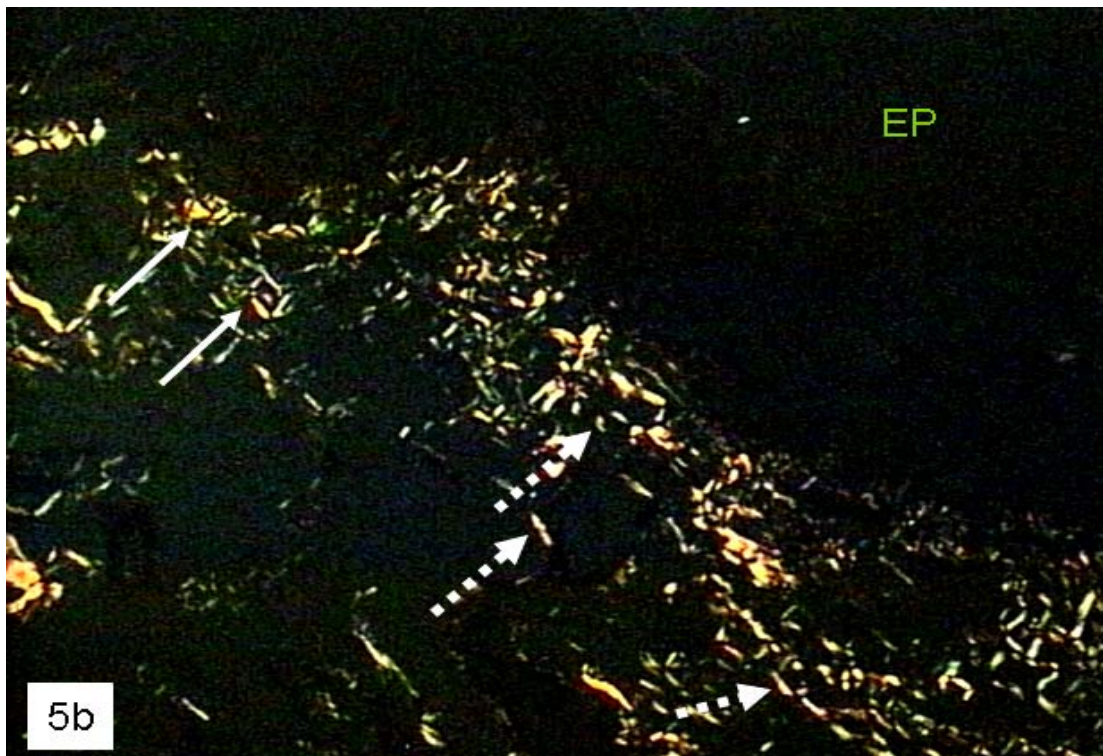
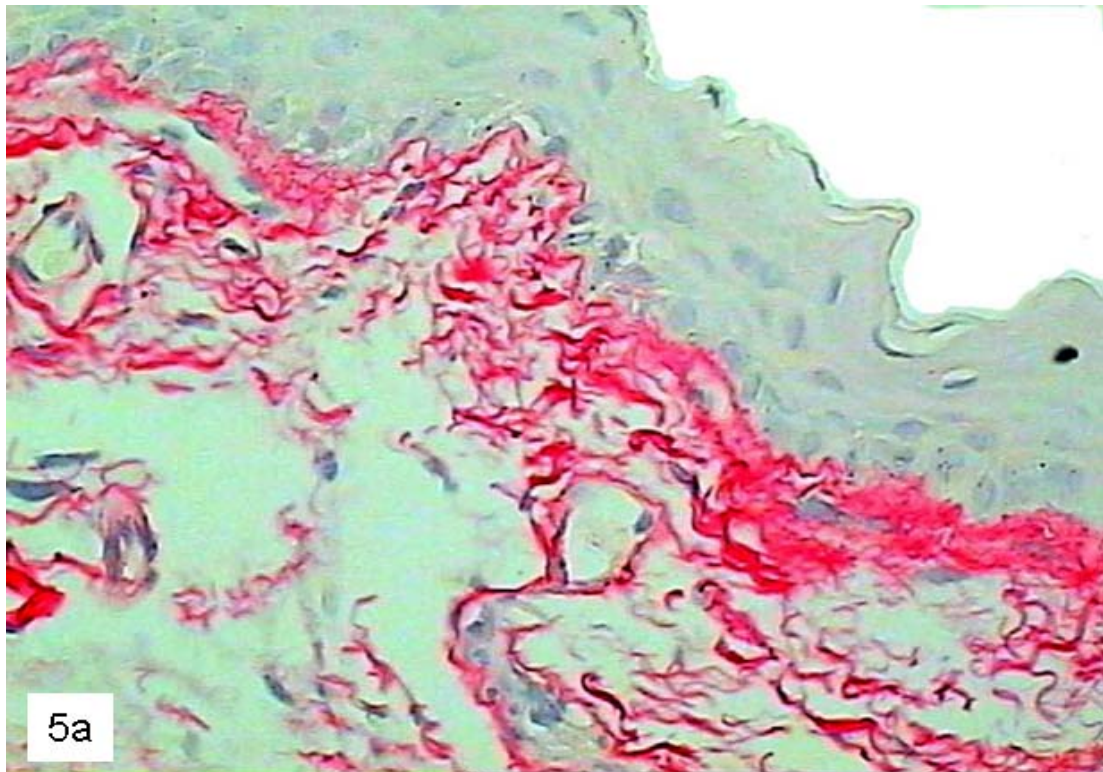


Figura 5 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 57 anos, corado pelo Picrosirius e observado sob luz convencional (a) e polarizada (b). Nota-se a desestruturação de grau moderado do entrelaçado das fibras colágenas, caracterizada por moderada quantidade de áreas de desestruturação (setas em pontilhado) e algumas áreas com preservação do arranjo entrelaçado das fibras colágenas (setas contínuas). X 400, EP = epitélio

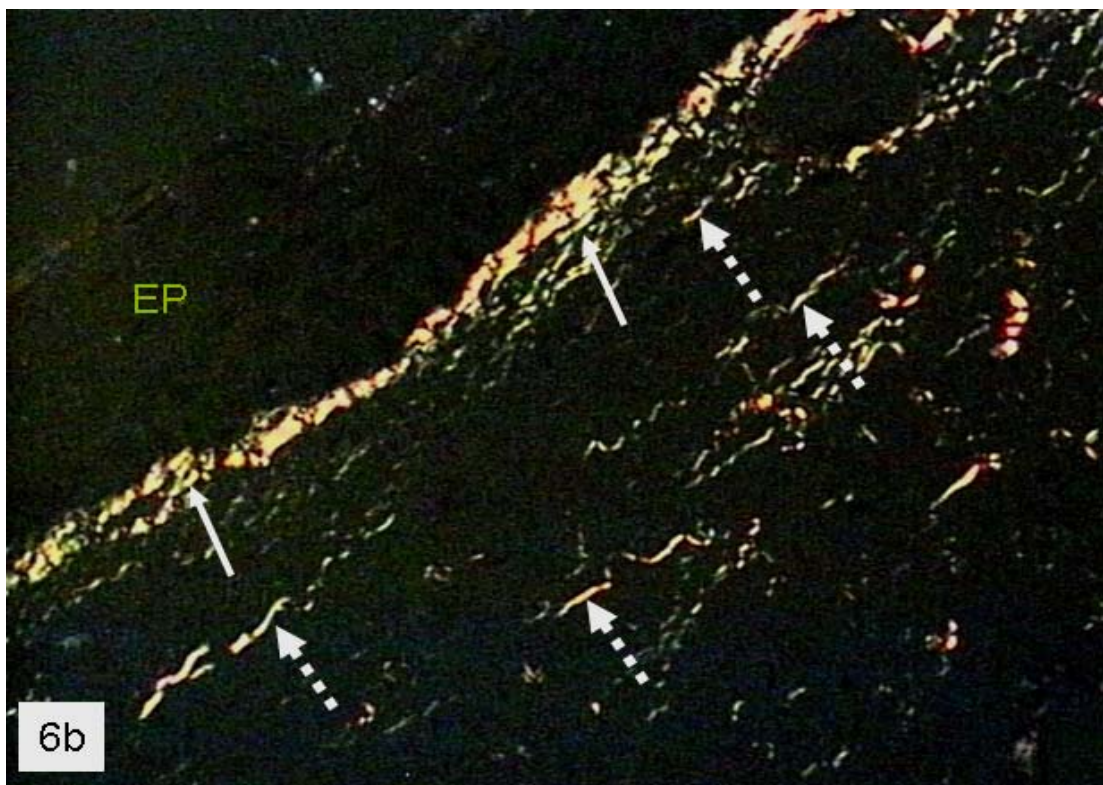
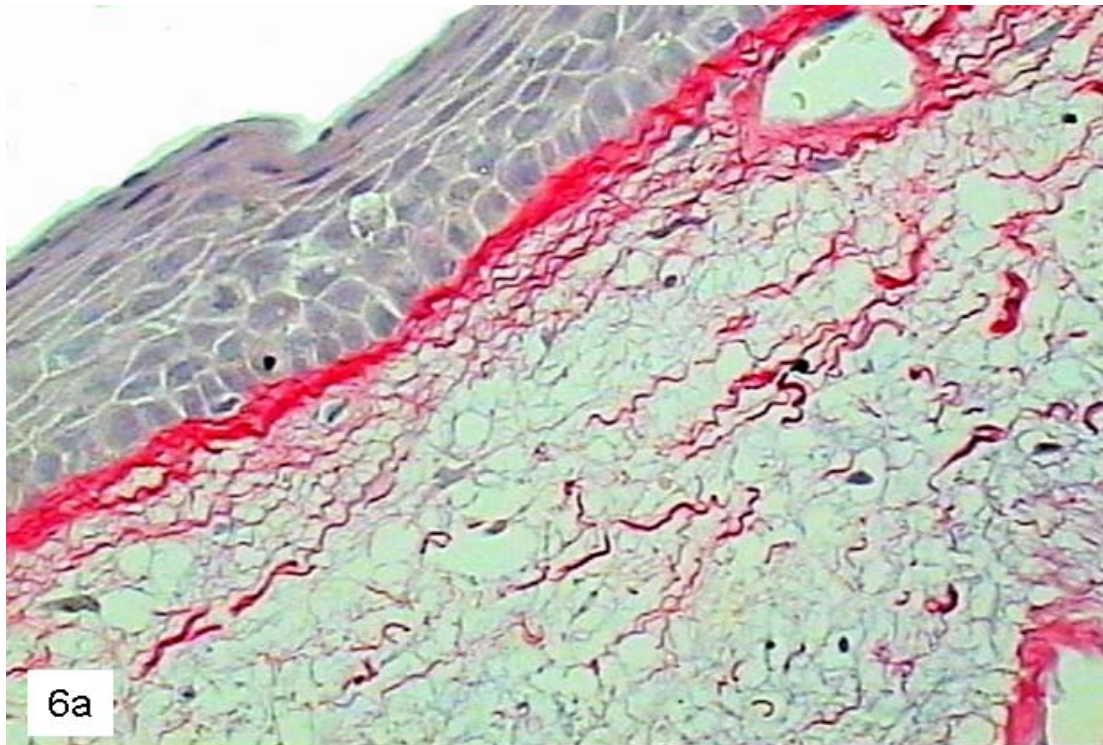


Figura 6 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 60 anos, corado pelo Picrosirius e observado sob luz convencional (a) e polarizada (b). Nota-se a desestruturação de grau intenso do entrelaçado das fibras colágenas, caracterizada por grande quantidade de áreas de desestruturação (setas em pontilhado) e poucas áreas com preservação do arranjo entrelaçado das fibras colágenas (setas contínuas). X 400, EP = epitélio

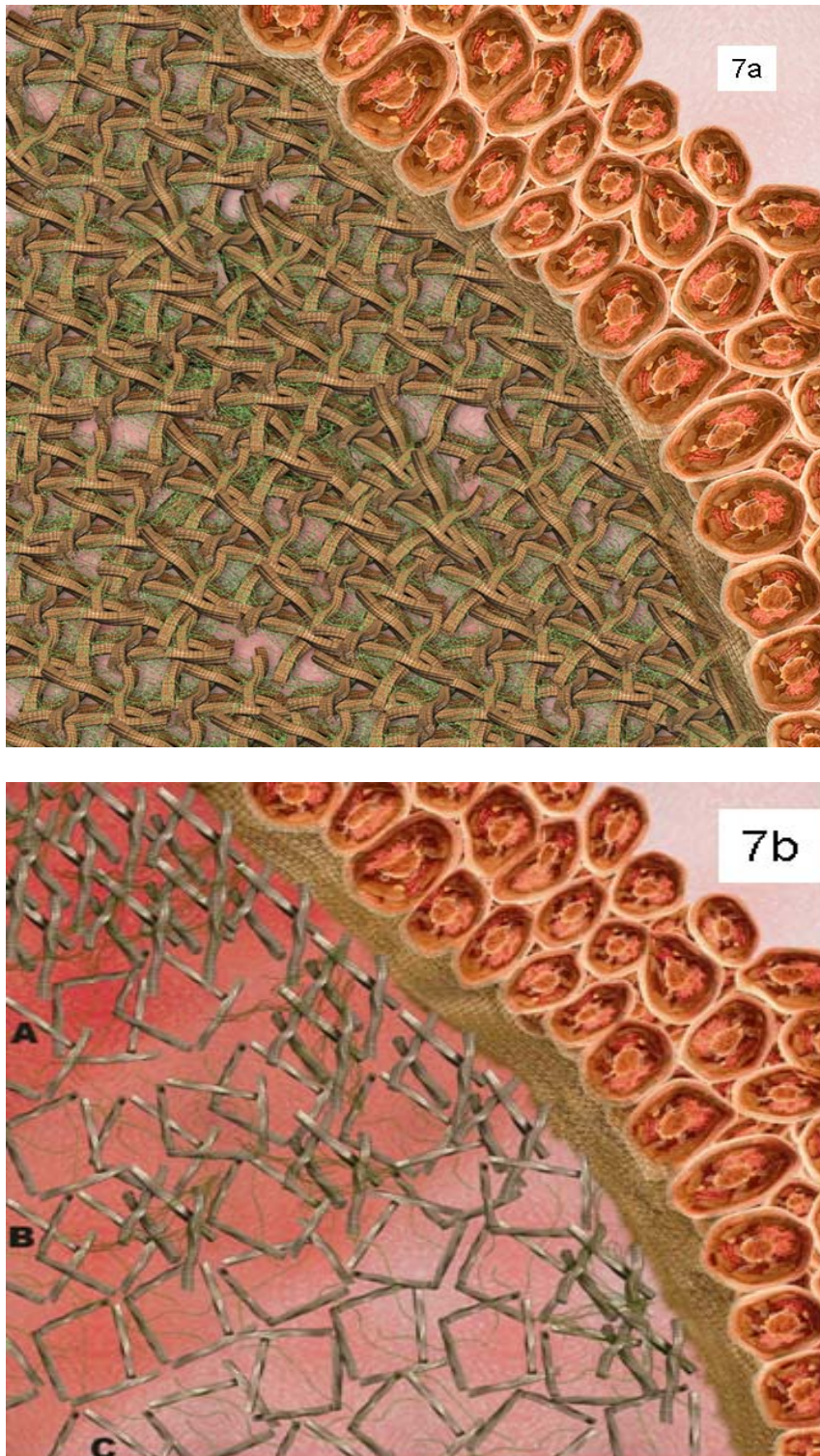


Figura 7 - (a) Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas na prega vocal humana normal mostrando o arranjo entrelaçado de fibras colágenas abaixo do epitélio como semelhante a uma “cesta de vime”. (b) Desestruturação do arranjo entrelaçado das fibras, de grau leve (A), moderado (B) e intenso (C).

4.3 Distribuição do sistema de fibras elásticas

As fibras elásticas pela técnica da resorcina-fucsina de Weigert com oxidação pelo oxone 10% coraram-se de roxo escuro. A análise das lâminas evidenciou na camada superficial da lâmina própria das pregas vocais normais, fibras finas e onduladas paralelas à membrana basal do epitélio e uma rede de fibras mais finas, logo abaixo da membrana basal do epitélio, que se direcionava e conectava-se à primeira rede de fibras (Figuras 8a-b).

Já na camada superficial da lâmina própria da prega vocal com edema de Reinke observou-se uma alteração na morfologia normal das fibras que deixavam de ser onduladas e passavam a ter formas variadas na maioria das regiões. As fibras se fragmentavam e perdiam a sua orientação paralela a membrana basal do epitélio adquirindo uma distribuição caótica, com as fibras correndo em várias direções. A rede de fibras mais finas abaixo da membrana basal do epitélio também se fragmentava, desprendia-se das fibras onduladas e adquiria várias direções (Figuras 9a-b).

A desestruturação do sistema de fibras elásticas também foi categorizada semiquantitativamente com os mesmos critérios adotados para a desestruturação das fibras colágenas (Figura 10 e Figura 11). A Tabela 2 mostra as desestruturações do sistema de fibras elásticas categorizadas semiquantitativamente e separadas de acordo com a severidade do edema. Intensa desestruturação foi predominante, presente em 80% dos casos. Não houve diferença estatística quanto à desestruturação do sistema de fibras elásticas entre o edema de Reinke grau II e III ($p=0,382$).

Tabela 2 – Avaliação semiquantitativa da desestruturação das fibras elásticas segundo a severidade do edema de Reinke

	Edema de Reinke grau II (n = 9)	Edema de Reinke grau III (n = 11)	TOTAL
Desestruturação ±	0	0	0
Desestruturação +	3 (33,3%)	1 (9%)	4 (20%)
Desestruturação ++	6 (66,7%)	10 (91%)	16 (80%)

p= 0,382 para comparação entre o edema de Reinke grau II e III quanto à desestruturação das fibras elásticas utilizando o teste de Qui-quadrado ajustado pela estatística de Fisher

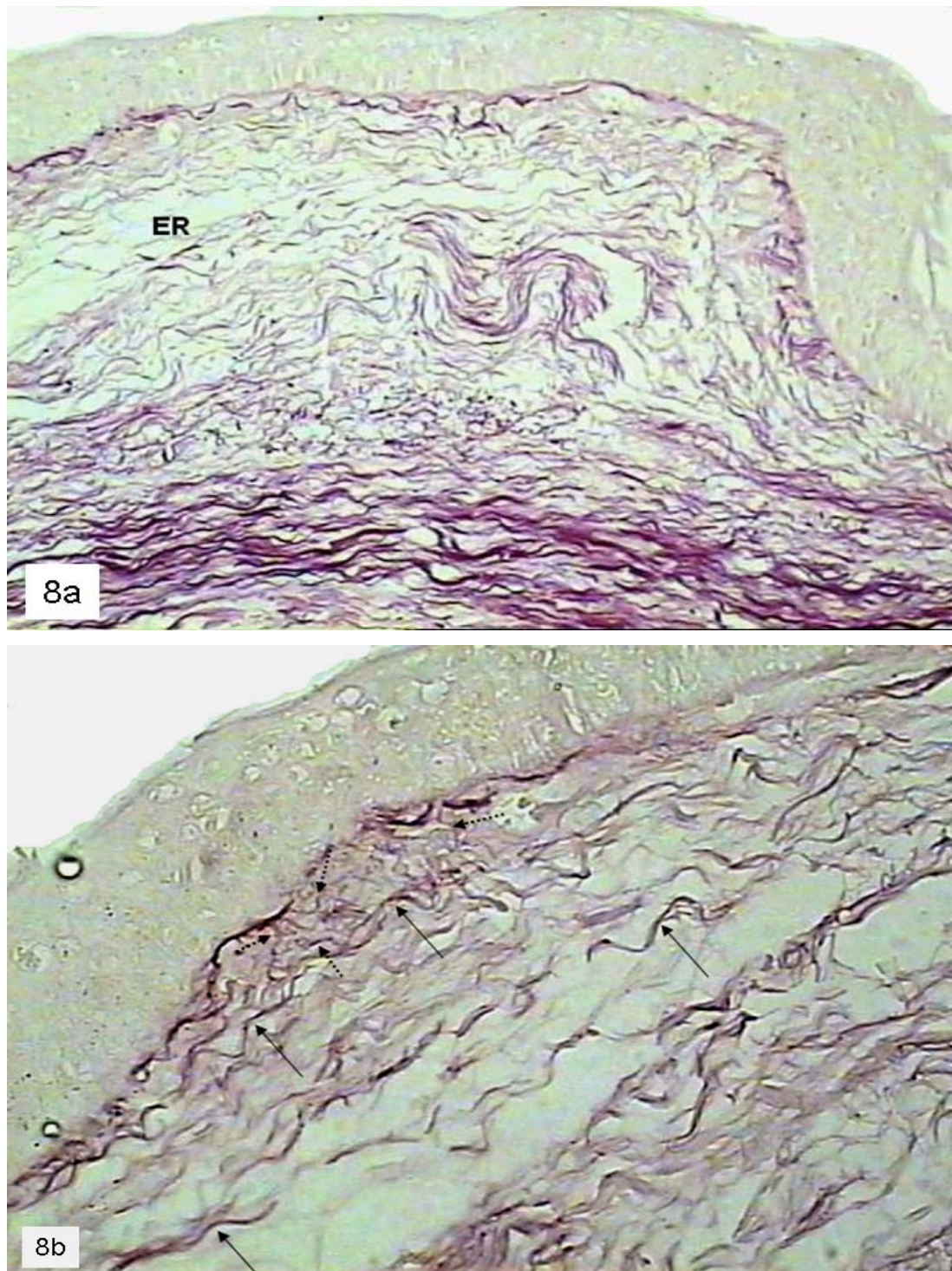


Figura 8 - Corte histológico coronal da prega vocal normal de uma mulher com 54 anos de idade do terço médio da porção membranosa, corado pela resorcina-fucsina de Weigert com oxidação. (a) Observe no espaço de Reinke (ER) fibras elásticas paralelas ao epitélio. X 200. (b) Nota-se uma delicada trama de fibras finas e onduladas paralelas à membrana basal do epitélio (setas contínuas) e entre esta primeira trama de fibras e o epitélio, uma rede de fibras mais finas logo abaixo da membrana basal que se direcionam à primeira trama de fibras descrita (setas em pontilhado). X 400

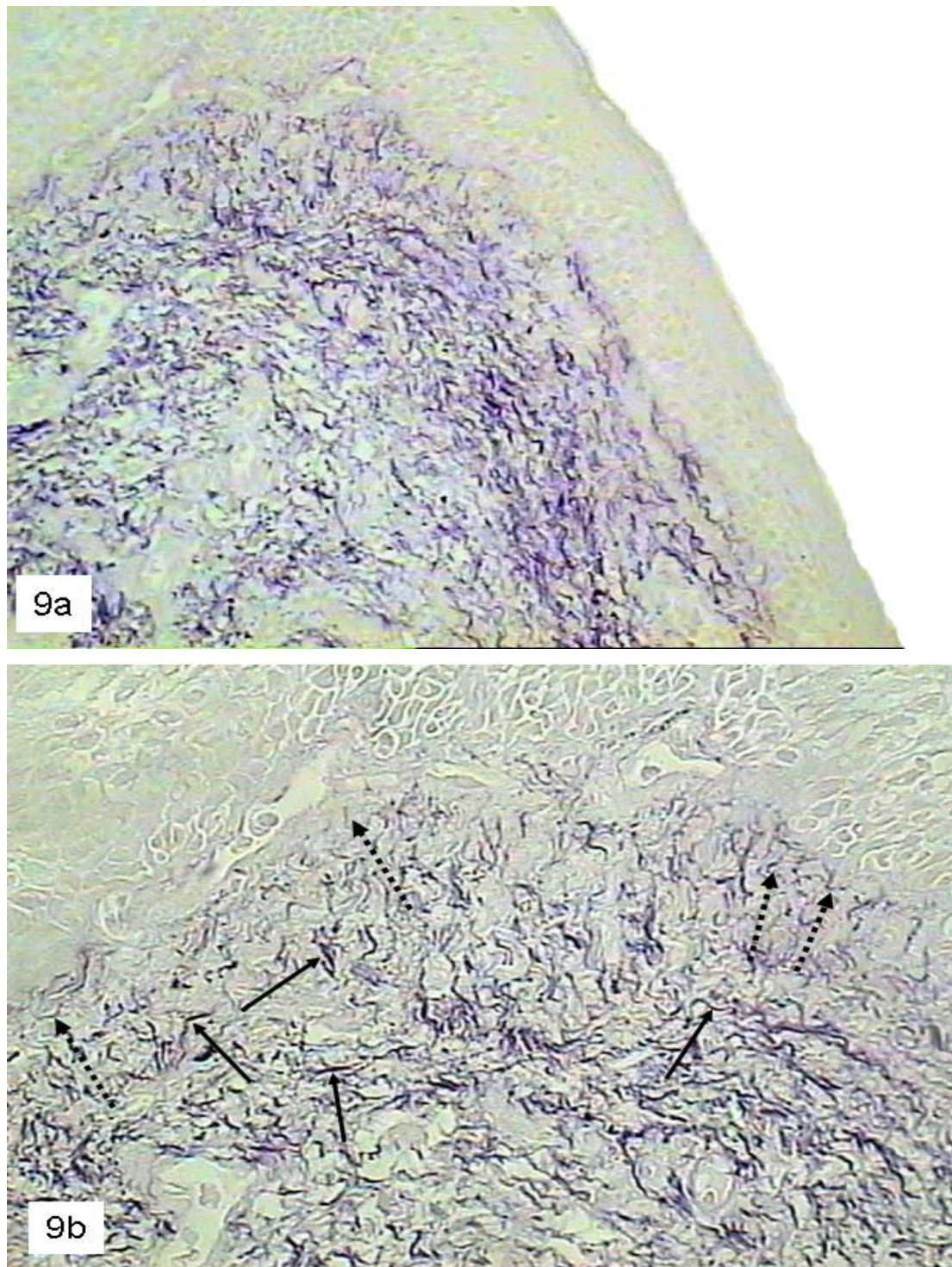


Figura 9 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 58 anos, corado pela resorcina-fucsina de Weigert com oxidação. (a) Observe a distribuição caótica das fibras elásticas. X200. (b) Nota-se que as fibras elásticas deixam de ser onduladas, fragmentam-se e perdem a sua orientação paralela à membrana basal do epitélio, correndo em várias direções (setas contínuas). A rede de fibras abaixo da membrana basal do epitélio também se fragmenta, desprendem-se das fibras onduladas e adquirem várias direções (setas em pontilhado). X400

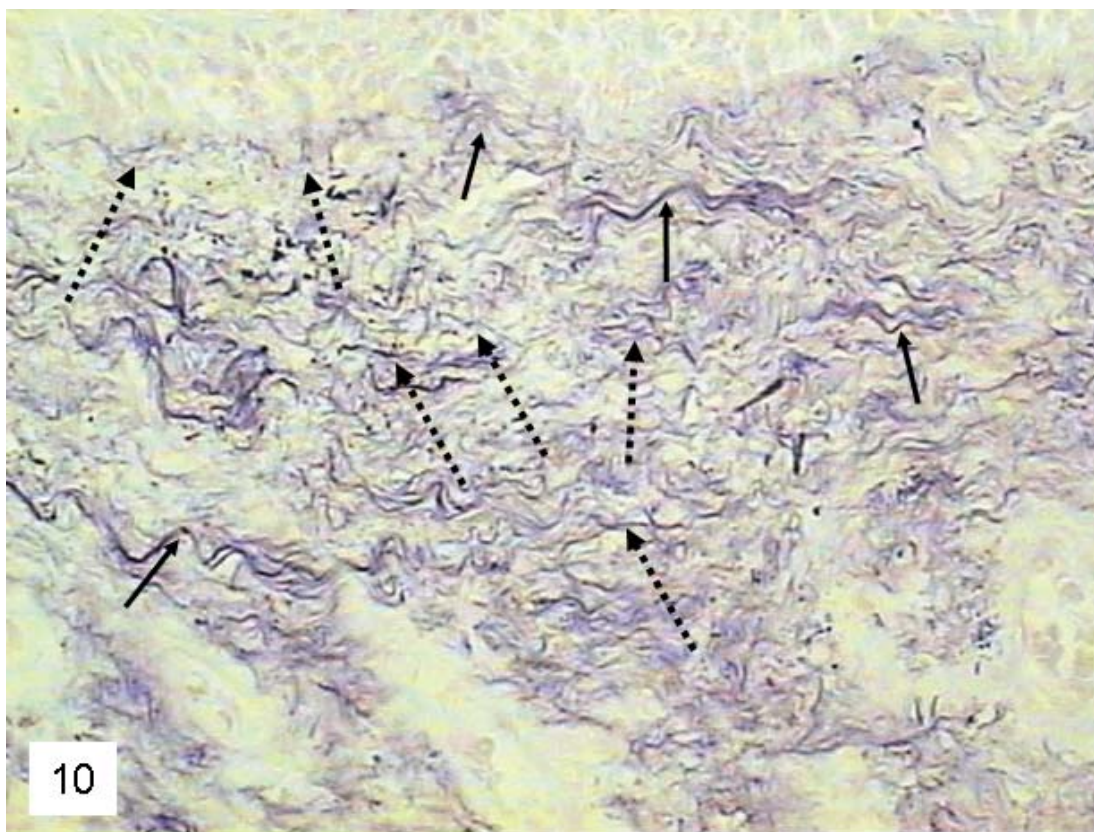


Figura 10 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 57 anos, corado pela resorcina-fucsina de Weigert com oxidação. Observe a desestruturação de grau moderado das fibras elásticas, caracterizada por moderada quantidade de áreas de desestruturação (setas em pontilhado) e algumas áreas de preservação do arranjo das fibras elásticas (setas contínuas). X 400

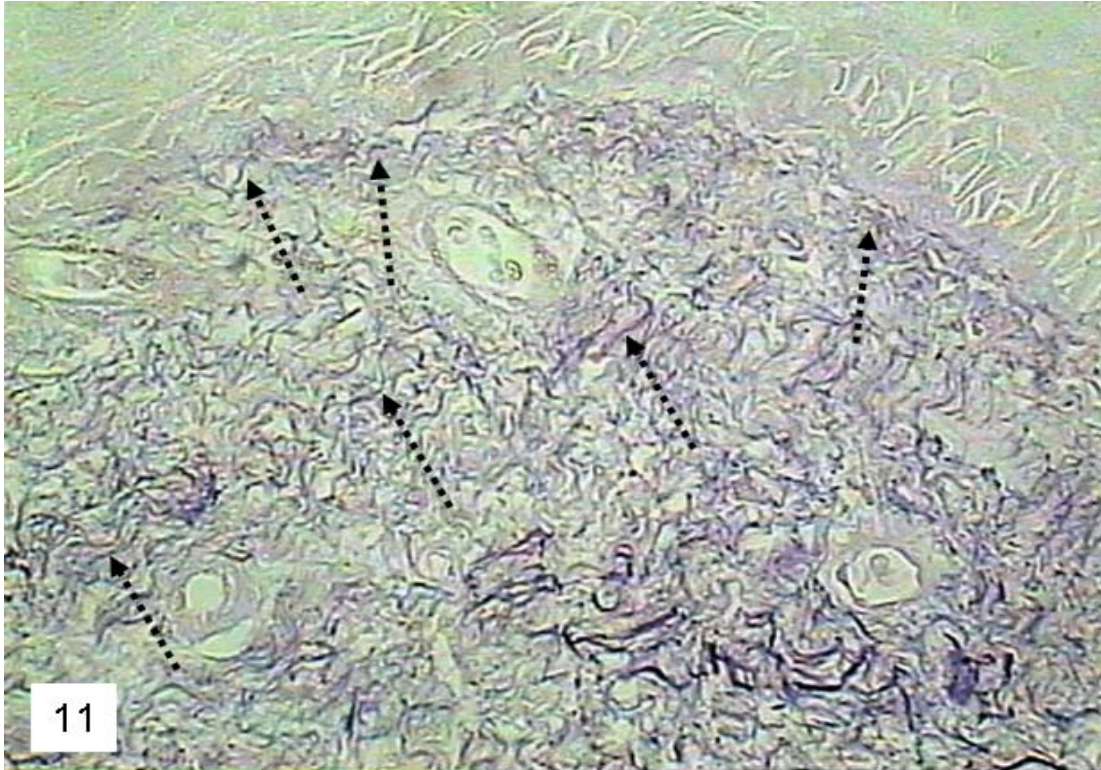


Figura 11 - Corte histológico coronal de um espécime de prega vocal com Edema de Reinke de uma mulher com 54 anos, corado pela resorcina-fucsina de Weigert com oxidação. Observe a desestruturação de grau intenso das fibras elásticas, caracterizada por grande quantidade de áreas de desestruturação (setas em pontilhado). X 400

4.4 Correlações da idade, do consumo de cigarro e do tempo de disфонia com o grau de desestruturação das fibras colágenas e elásticas

Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a idade e o grau de desestruturação das fibras colágenas. Quanto maior a idade, maior o grau de desestruturação das fibras ($r=0,47$, $p=0,037$) (Tabela 3). Com relação à desestruturação das fibras elásticas não houve correlação significativa com nenhuma variável (Tabela 4).

Tabela 3- Correlação da idade, do consumo de cigarro e do tempo de disфонia em função do grau de desestruturação das fibras colágenas

	Coeficiente de correlação de Spearman	p
Idade	+0,469	0,037
Consumo de cigarro	+0,120	0,616
Tempo de disфонia	+0,242	0,304

Tabela 4 - Correlação da idade, do consumo de cigarro e do tempo de disфонia em função do grau de desestruturação das fibras elásticas

	Coeficiente de correlação Spearman	p
Idade	-0,076	0,749
Consumo de cigarro	+0,329	0,157
Tempo de disфонia	+0,197	0,406

4.5 Diferenças entre o edema de Reinke grau II e III

Avaliando as variáveis: idade ($p=0,036$), consumo de cigarro ($p=0,399$), tempo de disfonia ($p=0,452$), sexo ($p=0,578$) e raça ($p=0,596$), houve uma diferença estatisticamente significativa apenas com relação à idade entre o edema de Reinke grau II e III (Tabela 4).

Tabela 5 - Teste t de Student controlado pelo teste de Levene para comparação da idade, consumo de cigarro e tempo de disfonia entre o edema de Reinke grau II e III

	Grau do edema	Média	Desvio padrão	Significância (p)
Idade (anos)	II	52,7	4,8	0.036
	III	57	3,3	
Consumo de cigarro (maço/ano)	II	20,2	6,4	0.399
	III	24,2	13,3	
Tempo de disfonia (meses)	II	32,7	19,9	0.452
	III	38,7	13,8	

5 DISCUSSÃO

5.1 Edema de Reinke, distribuição das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas

Neste trabalho utilizamos duas técnicas histológicas de coloração para visualização de fibras colágenas e elásticas, inéditas em pregas vocais com edema de Reinke. Os resultados deste trabalho indicam que a matriz extracelular com edema de Reinke é caracterizada por uma desestruturação das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas que provavelmente contribui com a disfunção vocal observada nesta doença.

No edema de Reinke a prega vocal apresenta uma deformidade gelatinosa de grau variável. Esta deformidade da prega vocal é resultado de alterações histológicas que ocorrem no espaço de Reinke. Existem muitos componentes da matriz extracelular que podem estar envolvidos, mas pouco foi elucidado pela literatura. Remenár et al (1984) mostra que no ER existe um tecido conectivo frouxo formado de fibras colágenas e elásticas jovens que se encontra afastado pelo edema, porém com fibras aparentemente com a morfologia normal. Vólic et al (1996 e 2004) mostram que no ER existe um excesso de produção de matriz extracelular com uma total desorganização das fibras do tecido conectivo, sendo que as fibras colágenas apresentam arranjo e morfologia alterada.

O espaço de Reinke foi caracterizado por apresentar proteínas fibrosas esparsas, com as fibras colágenas formando um arranjo paralelo à borda livre da prega vocal e estarem concentradas na camada profunda da lâmina própria (Hirano, 1974, Gray et al, 1993). Recentes estudos mostram outro tipo de distribuição do colágeno que está presente também na camada superficial da lâmina própria, logo abaixo do epitélio. (Ishii et al, 1996; Sato, 1998; Hammond et al, 2000; Sato et al, 2002, Melo et al, 2003; Tateya et al, 2006).

O colágeno é a proteína estrutural mais importante nos mamíferos, serve primariamente como um elemento de suporte na estrutura dos órgãos. Além disso, ele permite alterações morfológicas reversíveis dos órgãos, conferindo também plasticidade. Diferentes tipos de colágenos já foram descritos com propriedades distintas nos tecidos. Na prega vocal humana, os colágenos tipo I e III são encontrados na lâmina própria (Gray et al, 1993; Melo et al, 2003; Hahn et al, 2006b; Tateya et al, 2006).

Temos na técnica da Picrossírus-polarização a possibilidade de analisar o arranjo das fibras colágenas. A disposição das fibras colágenas na prega vocal deve conferir resistência à contração da musculatura, mas também permitir o seu alongamento durante a modulação da voz, com especial atenção na camada superficial da lâmina própria, que é a principal área vibratória. Nesta camada, o arranjo entrelaçado das fibras colágenas descrito por Melo et al (2003) permite o deslizamento entre elas de forma que a estrutura seja deformada com um todo, até o ponto máximo de estiramento, exigindo pouco alongamento das fibras, já que elas são poucos extensíveis. Tem-se assim, um arcabouço flexível, que estabiliza a lâmina própria, mantendo a uniformidade de sua estrutura durante a vibração.

Ishii et al (1996) observa que as fibras colágenas desta região funcionam para manter a uniformidade da estrutura (epitélio e lâmina própria) durante a vibração. Sato (1998) mostra o arranjo tridimensional das fibras reticulares, sugerindo que essa delicada rede de fibras é importante para manter o epitélio e os vasos sanguíneos da membrana basal do epitélio presos à lâmina própria, mantendo assim a cobertura da prega vocal durante a fonação, que é a estrutura com maior estresse vibratório.

A desestruturação das fibras colágenas observada no edema de Reinke faz com que haja uma perda do componente estabilizador, o arcabouço flexível. A estrutura tridimensional que permite o deslizamento entre as fibras é rompida, pois o ponto máximo de estiramento das fibras é excedido, tornando a camada superficial da lâmina própria mais sujeita a deformidades. A cobertura da prega vocal com ER fica mais “solta” do seu corpo, passando a ter uma vibração irregular já que a energia transmitida do músculo para o epitélio e do epitélio para as camadas mais profundas da prega vocal está perdida.

Assim como as fibras colágenas, as fibras elásticas participam também na fisiologia vocal. As fibras elásticas apresentam dois tipos de componentes: amorfo e fibrilar, respectivamente hidrofóbico e hidrofílico. Os três tipos de fibras presentes no sistema elástico dependem da relação entre o componente amorfo, que é a elastina e os fibrotúbulos (microfibrilas tubulares). As fibras oxitalânicas são compostas por microfibrilas de 10 a 12 nm de diâmetros e não possuem componente amorfo. As fibras elásticas maduras são formadas por fibrotúbulos envolvendo uma parte central amorfa. As fibras elaunínicas são um intermediário entre as fibras oxitalânicas e elásticas, ou seja, apresentam microfibrilas associadas com pequeno componente amorfo (Hammond et al, 1997).

As propriedades elásticas estão relacionadas com o componente amorfo, portanto as fibras elásticas completas são as mais elásticas, descritas como sendo capazes de serem tracionadas em duas vezes o seu tamanho e retornarem ao tamanho original, sem modificar a elasticidade (Porto et al, 1990). As fibras oxitalânicas e elaunínicas são menos elásticas, pela menor quantidade de componente amorfo, estando presentes em áreas de alto estresse mecânico como a superfície de tendões e cartilagens (Ferreira et al, 1987).

Na lâmina própria da prega vocal humana é descrito a presença de fibras elásticas maduras, oxitalânicas e elaunínicas (Bonnaure-Mallet e Lescoat, 1989; Ishii et al, 1996; Hammond et al, 1997; Hahn et al, 2006b), sendo que a maioria das fibras então concentradas da camada intermediária sob a forma de fibras elásticas maduras. As fibras oxitalânicas estão presentes em todas as camadas da prega vocal, com distribuição especial nos feixes de fibras musculares e imediatamente abaixo da membrana basal do epitélio. Na camada superficial da lâmina própria a elastina encontra-se nas formas oxitatânicas e elaunínicas.

As fibras elásticas da camada superficial da lâmina própria possivelmente participam na vibração da prega vocal, contribuindo com a rigidez e a viscoelasticidade da mucosa da prega vocal (Sato e Hirano, 1997). Ishii et al (1996) acreditam que as fibras oxitalânicas distribuídas em toda lâmina própria, promovem uma forte ligação entre epitélio e as fibras musculares. Hahn et al (2006a) discutem que a presença de fibras oxitalânicas em grande quantidade na região superior do espaço de Reinke está relacionada com o alto estresse vibratório nesta camada durante a fonação. Nesta região o sistema elástico apresenta alto turnover, em que a

tropoelastina, um indicador da síntese de elastina, apresenta maior quantidade relativa em relação às camadas mais profundas da prega vocal.

É importante ressaltar que dos três tipos de elastina apenas as fibras elásticas coram-se bem pela maioria das técnicas histológicas empregadas. Em nosso estudo, foi empregada a técnica de resorcina-fucsina de Weigert com oxidação prévia pelo oxone. Esta técnica permite a coloração de todas as fibras elásticas, porém a precisa identificação do tipo de fibra somente é possível somente com microscopia eletrônica.

Por isso, não identificamos os tipos de fibras elásticas, mas baseado nas descrições da literatura que indicam que a camada superficial da lâmina própria contém elastina principalmente nas formas oxitalânicas e elaunínicas, podemos supor que: as fibras oxitalânicas que ficam mais próximas da membrana basal do epitélio podem corresponder à rede de fibras mais finas observada no grupo controle e as fibras elaunínicas formam provavelmente a delicada trama de fibras finas e onduladas paralelas à membrana basal do epitélio vista nas pregas vocais normais.

No edema de Reinke, as mudanças histológicas que ocorrem na prega vocal atingem também o sistema de fibras elásticas da camada superficial da lâmina própria. Existe uma desestruturação das fibras que provavelmente compromete as fibras com menor poder de elasticidade, mas que oferecem estabilidade à prega vocal. Mauad et al (1999) descrevem alterações semelhantes do sistema de fibras elásticas na submucosa de vias aéreas de indivíduos com asma e especulam que este desarranjo contribui para a hiperconstricção da via aérea.

No ER, o desarranjo acarreta uma perda da funcionalidade das fibras, deixando a prega vocal com menor poder de resistência e resiliência, o que leva a

uma maior propensão a deformidade. A definição de resiliência provém da Física e corresponde à capacidade de um elemento de retornar ao seu estado inicial, sem se deformar após sofrer influências externas. A perda desta capacidade no edema de Reinke apresentou maior impacto nas fibras elásticas, já que o arranjo das fibras elásticas encontrava-se com intensa desestruturação na maioria dos casos (80%), sem regiões de preservação. Em contrapartida, houve uma preservação do arranjo das fibras colágenas próximo ao epitélio em todas as amostras do estudo.

Esta diferença no impacto no desarranjo das fibras pode ter refletido na diferença estatística encontrada entre o grau de severidade do edema quanto à desestruturação das fibras que foi significativa com relação às fibras colágenas. No edema de Reinke grau III a prega vocal apresenta maior deformidade e observamos um maior número de casos com fibras colágenas com intensa desestruturação (73%), enquanto que no edema de Reinke grau II observou-se em 44% dos casos. Portanto, quanto maior a deformidade provavelmente mais fibras colágenas estarão desestruturadas. Com relação à desestruturação das fibras elásticas não houve diferença entre o grau de edema, talvez porque a maioria dos casos apresentava intensa desestruturação das fibras (80% dos casos).

5.2 Edema de Reinke, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento

O mecanismo fisiopatológico do edema de Reinke ainda é desconhecido (Dijkers e Nikkels, 1999). Todos os pacientes deste estudo eram tabagistas ou ex-

tabagistas. Na literatura os trabalhos mostram que a maioria dos pacientes com edema de Reinke é tabagista. Moesgaard-Nielsen et al (1986) revelam uma incidência de 98% de pacientes tabagistas, Marcotullio et al (2002) de 85%, Pastuszek et al (2003) de 88% e Jovanovic et al (2007) de 94%. Estes autores e outros (Putney e Clerf, 1940; Wallner, 1954; Toriya et al, 1979) citam o tabagismo como o principal causador do ER.

A alteração da permeabilidade dos vasos sanguíneos do espaço de Reinke é relacionada por alguns autores como o principal causador do edema de Reinke (Kleinsasser, 1980; Dikkers e Nikkels, 1995; Sato et al, 1999). Sato et al (1999) estudam os vasos sanguíneos da lâmina própria com edema de Reinke observando que apesar de existir um espessamento da membrana basal dos vasos, a parede do endotélio encontra-se fina com muitas fenestras, demonstrando um aumento da permeabilidade dos vasos. Estas alterações que levam ao edema são atribuídas ao tabagismo e ao envelhecimento que podem levar a trombose vascular, diminuição do fluxo sanguíneo, causando hipóxia e isquemia.

O envelhecimento causando a hipóxia vascular pode justificar o edema de Reinke ocorrer menos freqüentemente em jovens. A idade média dos nossos pacientes com edema de Reinke foi de 55 anos, o que esteve de acordo com a maioria dos estudos (Moesgaard-Nielsen et al, 1986; Lindeberg et al, 1987; Marcotullio et al, 2002; Pastuszek et al, 2003; Jovanovic et al, 2007).

Sabemos que com o envelhecimento ocorrem alterações na voz, homens tendem a aumentar a sua freqüência fundamental e as mulheres tendem a diminuir. Segundo Hirano et al (1989) no sexo masculino, a porção membranosa da prega vocal tende a diminuir, as fibras elásticas da camada intermediária ficam atroficas e

as fibras colágenas da camada profunda tornam-se fibróticas. Essas alterações levam a um aumento da resistência tecidual à vibração, causando aumento na frequência fundamental. No sexo feminino, a diminuição da porção membranosa é menos marcante, assim como a atrofia das fibras elásticas e as alterações fibróticas das fibras colágenas. A cobertura da prega vocal aumenta de espessura, sendo que o processo final resulta em uma diminuição na frequência fundamental.

Sato et al (2002) e Hammond et al (2000) observam que na camada superficial da lâmina própria da população geriátrica, as fibras colágenas aumentam formando feixes, com aumento da densidade do colágeno e as fibras reticulares diminuem, especialmente em homens. Os espaços entre as fibras colágenas diminuem, portanto o espaço intersticial para os outros componentes da matriz também diminuem. Essas alterações modificam a estrutura tridimensional das fibras colágenas, prejudicando a organização também das proteoglicanas e das fibras elásticas.

Melo et al (2003) utilizando o método da Picrossírus-polarização observam que em indivíduos idosos ocorre um desarranjo do entrelaçado das fibras colágenas e um aumento na birrefringência do colágeno nas pregas vocais masculinas. O aumento da birrefringência pelo método da Picrossírus-polarização reflete não apenas num aumento quantitativo do colágeno, mas no grau de agregação das suas moléculas, que passam a apresentar um maior número de ligações cruzadas não reversíveis, tornando-o mais resistente à degradação. No envelhecimento, isto possivelmente contribui para as alterações vocais no idoso do sexo masculino, com uma prega vocal mais rígida e menos elástica.

As fibras colágenas estão desestruturadas em pacientes idosos e no edema de Reinke. No edema de Reinke as alterações parecem estar relacionadas com o envelhecimento, já que houve em nosso estudo uma correlação positiva entre a idade e o grau de desestruturação das fibras colágenas. Esta desestruturação deve estar relacionada com o processo fisiopatológico que ocorre no edema de Reinke, mas também pode ser contribuída pelo processo normal da senescência. Ressaltando apenas, que a maioria dos casos era do sexo feminino, em que as alterações histológicas causadas pela senescência são menos evidentes.

Com relação às fibras elásticas, apesar de desestruturadas no edema de Reinke, houve uma correlação negativa com a idade. Este resultado deve ser analisado com critérios, também pelo fato da maioria dos casos ter apresentado desestruturação de grau intenso.

Em nosso estudo, pacientes com edema de Reinke grau III tinham maior média de idade estatisticamente significativa que os pacientes com edema de Reinke grau II. Não houve uma diferença significativa com relação ao tabagismo e ao tempo de disfonia. Quanto maior o edema pressupõe-se que mais intenso devem ser os fatores de risco dos pacientes. Primeiro que se trata de um estudo com 20 pacientes, talvez com um maior número de casos se veria mais diferenças entre os grupos de edema de Reinke. Segundo, o tempo de disfonia é um dado que pode se tornar subjetivo, pois a disfonia pode ser relatada apenas quando ocorre alguma alteração marcante da voz, por exemplo, numa cordite. Além disso, existem outros fatores não estudados em nosso trabalho como refluxo gastroesofágico, abuso vocal, hiperfunção vocal, hipotireoidismo e alergia que podem contribuir para o desenvolvimento e severidade desta doença.

Kosoković (1974) relata que o fator decisivo para o desenvolvimento do ER é o fator mecânico como o abuso vocal, o que explicaria o fato do edema de Reinke ser localizado mais frequentemente nos terços médio e anterior das pregas vocais, que são regiões de maior contato mecânico durante a fonação.

Zeitels et al (1997) concordam que muitos pacientes com ER apresentam abuso vocal, tabagismo e ocasionalmente sofrem de hipotireoidismo. Porém, observam que os pacientes com ER apresentam um tipo de hiperfunção vocal demonstrando um aumento da pressão subglótica que leva a uma distensão da camada superficial da lâmina própria, achado este de acordo com Kambič et al (1989). Existindo um ciclo vicioso, os pacientes com ER apresentam uma irritação crônica da laringe com uma mucosite inflamatória por tabagismo, refluxo gastroesofágico e abuso vocal causando uma dificuldade fonatória requerendo maior pressão aerodinâmica da região subglótica. O aumento das forças para a geração da fonação contribui para o trauma mecânico das pregas vocais, favorecendo o surgimento de lesões.

Outros agentes como o refluxo gastroesofágico e a alergia são considerados cofatores no surgimento de lesões laríngeas, embora pouco se tenha publicado na literatura. O refluxo gastroesofágico é identificado como um cofator no desenvolvimento de doenças benignas na laringe por estar associado com uma inflamação crônica na mucosa das pregas vocais (Koufman, 1995; Zeitels et al, 1997).

Filiaci et al (1997) e Hočevár-Boltežar et al (1997) relatam a presença de uma hipersensibilidade não específica nas vias aéreas superiores e inferiores em pacientes com ER. Mostram que a alergia específica e não específica são fatores importantes

na etiopatogênese de doenças laringeas. Observam que a hipersensibilidade a diferentes inalantes e alimentos pode deixar a mucosa laringea mais susceptiva a ação de outros agentes como tabaco, trauma vocal e refluxo.

O hipotireoidismo é relatado por Hilger (1956) como um fator no desenvolvimento no ER. Em termos de fisiopatologia, o hipotireoidismo pode levar a um edema generalizado de tecido moles do corpo denominado mixedema. A disfonia no mixedema poderia teoricamente ser decorrente do acometimento do sistema nervoso central, dos nervos laringeos, dos músculos intrínsecos da laringe e das pregas vocais. O fluido que se acumula nos tecidos contém alta quantidade de proteínas e mucopolissacarídeos, corando-se pelo Alcian-blue.

Bicknell (1973) observa que amostras de pregas vocais de pacientes com hipotireodismo leve têm alterações histológicas pela coloração de Alcian blue em comparação com amostras de pacientes normais, mostrando um acometimento vocal pelo hipotireoidismo. Outros autores mostram que a relação entre hipotireoidismo e ER ainda é incerta pela falta de trabalhos controlados (Lindeberg et al, 1987; White et al, 1991).

Vimos que no edema de Reinke existem muitos fatores de risco associados, mas o estudo de pregas vocais de pacientes com edema de Reinke e não tabagistas pode ser interessante, já que todos os pacientes do nosso estudo eram tabagistas. Porém, não foi encontrada na literatura a influência do tabagismo no arranjo das fibras colágenas e elástica da lâmina própria da prega vocal. Portanto, o estudo de laringes normais de indivíduos tabagista é o ponto de partida.

A presença de uma alta incidência de ER em pacientes do sexo feminino (85%) em nosso estudo esteve de acordo com outros trabalhos. Zeitels et al (1997)

apresentam uma incidência de 95%, resultado praticamente semelhante com Fritzell e Hertegard (1986) que encontram 94%. Alguns fatores podem explicar esse resultado: a diminuição na frequência fundamental na voz de pacientes com ER torna-se estigmatizante para as mulheres e menos para os homens, o que faz com que as mulheres procurem mais os serviços médicos pela queixa vocal; alterações endocrinológicas podem tornar mais freqüente em mulheres, porém esta relação ainda é controversa.

Alterações endocrinológicas ainda não bem conhecidas relacionadas com os hormônios sexuais podem existir no ER como sugerido por Pastuszek et al (2003), que o tornaria mais freqüente em mulheres. Ishii (1966) relata que o ER é uma manifestação de alterações na menopausa. Alterações na voz durante a menopausa foram descritas por alguns autores (Boulet e Oddens, 1996; Lindholm et al, 1997). Newman et al (2000) identificam a presença de receptores de andrógeno, estrógeno e progesterona na prega vocal humana, com diferentes distribuições segundo a idade e o sexo. Sugerem que existe uma influência hormonal na voz humana, o que poderia explicar alterações na voz durante a menopausa, com possíveis modificações nas fibras colágenas e elásticas.

O diagnóstico histológico do edema de Reinke ainda não é preciso. O exame histológico que deveria ser o exame padrão ouro, não possui critérios bem definidos para o diagnóstico das lesões que possam se correlacionar com os critérios clínicos que são bem estabelecidos.

A grande dificuldade em se obter um diagnóstico histológico que sirva de diagnóstico clínico das lesões benignas da laringe é a variedade de apresentações histológicas que uma mesma lesão pode ter. Remacle et al (1996) realizam um

estudo com amostras de nódulos, pólipos e edema de Reinke que são examinadas por patologistas que desconhecem o diagnóstico das lesões. São analisadas pela coloração de hematoxilina-eosina as seguintes características: o tipo de epitélio, alterações de queratinização, displasia, espessamento da membrana basal, edema, fibrose, deposição de hemosiderina, dilatação vascular, sufusão hemorrágica e infiltrado inflamatório. Os achados revelam primeiramente que as alterações epiteliais não são específicas para as lesões estudadas e que apesar de existirem alterações típicas na lâmina própria para cada lesão estudada, existem formas intermediárias que são difíceis de serem classificadas, sendo que 56% dos edemas de Reinke têm características histológicas semelhantes aos nódulos vocais e 7% aos pólipos vocais. Segundo os autores, nos três tipos de lesões, o fenômeno exsudativo no espaço de Reinke está presente e o surgimento de cada tipo de lesão depende de fatores etiológicos submetidos pelo paciente.

Outros autores com diferentes técnicas histológicas buscaram uma diferenciação histológica. Dikkers e Nikkels (1995) utilizam a microscopia eletrônica e caracterizam o edema de Reinke por apresentar espessamento da membrana basal, lagos de edema e espessamento da parede dos vasos sanguíneos da lâmina própria. Os autores ressaltam que o denominador comum das lesões benignas (pólipos, nódulos e ER) é o edema. Observam também que no ER existe menos lesão endotelial do que em pólipos, talvez pelo menor trauma vocal durante a fonação. Apesar destes achados, concluem que não há características histológicas patognomônicas para cada tipo de lesão vocal.

Dikkers e Nikkels (1999) ao estudarem as fibras colágenas e elásticas em amostras de pólipos, nódulos com metodologias diferentes do nosso estudo,

verificam que não há alterações histológicas específicas com análise dessas fibras que permitam diferenciar as três lesões benignas estudadas.

A diferenciação histológica entre as doenças benignas da laringe permanece controversa. O edema da lâmina própria, as alterações vasculares e de membrana basal do epitélio podem estar presentes tanto em pólipos, nódulos ou edema de Reinke. Alguns autores (Marcotullio et al, 2002; Remacle et al, 1996) reforçam a teoria de que as doenças possam ser formas evolutivas uma das outras, dependendo do tipo e grau de exposição a fatores de risco e do tempo da lesão, porém, Thibeault et al (2002) correlacionam o genótipo com o fenótipo de pólipos e edema de Reinke e os achados indicam que as lesões apresentam origens biológicas diferentes e não representam um continuum.

A metodologia utilizada neste estudo para avaliação das fibras colágenas e do sistema de fibras elásticas permitiu um estudo descritivo, mas utilizando a avaliação semiquantitativa, tentamos deixar os parâmetros histológicos mais objetivos. Portanto, as alterações histológicas que ocorrem em outras doenças da laringe podem ser melhores caracterizadas com a metodologia utilizada neste estudo e talvez se compararmos estes resultados, pode-se encontrar melhores parâmetros histológicos que definam cada tipo de lesão.

Com relação ao tratamento do ER, a técnica de decorticação das pregas vocais com retirada do epitélio e camada superficial da lâmina própria com edema foi inicialmente introduzida por Lore (1934). Na época, a técnica foi descrita para um procedimento unimanual através de um laringoscópio monocular, sem magnificação.

O nosso trabalho utilizou a técnica de sucção acreditando ser o melhor tratamento atual preconizado para o edema de Reinke. Os resultados deste trabalho

podem contribuir com o aprimoramento desta técnica. Apesar de existir uma desestruturação das fibras colágenas, observamos que ela é menor nas fibras colágenas mais próximas do epitélio que apresentam provavelmente uma função mais importante no ancoramento do epitélio à lâmina própria.

Propomos com este estudo que a manutenção do colágeno próximo do epitélio, já que ele está parcialmente preservado, poderia favorecer um retorno mais eficiente da capacidade vibratória da prega vocal. Para isto devemos também tentar preservar um pouco do edema que está próximo do flap mucoso da prega vocal durante o procedimento cirúrgico. Este fato pode ser particularmente importante com a introdução de novas técnicas cirúrgicas de microflap para a remoção do edema como o uso do microdebridador (Sant'Anna, 2000) que tem o objetivo de remover o excesso de edema preservando o epitélio da prega vocal com bastante precisão.

5.3 Edema de Reinke e outros componentes da matriz extracelular

Existe também uma provável interação entre os componentes da matriz extracelular com a formação uma delicada estrutura tridimensional de fibras colágenas e espaços recobertos por glicoproteínas, proteoglicanas e fibras elásticas (Sato, 1998; Tateya et al, 2006).

As proteínas intersticiais que incluem as proteoglicanas e as glicoproteínas apresentam funções mecânicas que determinam as propriedades oscilatórias da prega vocal. Afetam a viscosidade, a quantidade de fluidos, a espessura das camadas da

lâmina própria, a densidade e o tamanho das fibras colágenas (Gray et al, 1999). Tanto a quantidade absoluta como a distribuição espacial das PGs e das GPs são importantes para a manutenção da fisiologia normal do tecido (Poole, 1986).

As PGs consistem num core de proteínas que usam proteínas de ligação para se ligarem a outras proteínas, a lipídios e a carboidratos. Isso permite que as PGs carreguem uma variedade de moléculas estruturais com várias atividades biológicas, incluindo água e açúcares como a heparina. As proteoglicanas são altamente multifuncionais, têm função estimuladora ou supressiva no crescimento, modulam o processo de reparo, os fatores de crescimento, os fibroblastos e possuem propriedades adesivas. Regulam as propriedades biológicas de outras proteínas da matriz extracelular (Gray et al, 1999).

Dijkers e Nikkels (1999) realizam um estudo em amostras de nódulos vocais, pólipos e edema de Reinke e observam que a quantidade e distribuição de AH são semelhantes nas três lesões, porém com uma maior quantidade de AH especificamente ao redor de vasos em algumas amostras de pólipos vocais. Os autores não encontram explicações para estes achados, mas citam a presença de AH como resposta ao trauma vocal.

O versican liga-se com o AH e freqüentemente interage com as fibras elásticas. O complexo versican-ácido hialurônico tem papel na inibição das interações célula e matriz, afeta o turgor, dissipa o impacto e o estresse compressivo na lâmina própria da prega vocal. Além disso, o versican é implicado na formação do edema pulmonar e talvez contribua similarmente no edema de Reinke (Hahn et al, 2005).

As moléculas de glicoproteínas contêm uma parte protéica que se associa aos glicídios. Porém, ao contrário das PGs, há uma predominância da parte protéica e não apresentam os polissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas contendo hexosaminas. As GPs participam da aderência entre as células e as fibras da matriz extracelular. A fibronectina é uma GP com sítios de aderência para células, colágeno e glicosaminoglicanas. A laminina é outra GP estrutural responsável parcialmente pela aderência das células epiteliais às lâminas basais (Junqueira e Carneiro, 2000).

A fibronectina é a glicoproteína mais abundante da prega vocal. Apresenta funções diversas, participando de vários fenômenos biológicos como inflamação, trombose, embriogênese e outros. Tem função adesiva na matriz extracelular, mediando interação célula-célula e célula-matriz. Na prega vocal, a fibronectina está presente em pregas vocais normais, em lesões como pólipos, nódulos e edema de Reinke e em processos de cicatrização. Acredita-se que a fibronectina tenha papel determinante na viscoelasticidade, portanto nas características vibratórias da prega vocal. (Hirschi et al, 2002).

Gray et al (1995) identificam dois tipos de respostas patológicas em amostras de nódulos vocais, pólipos e edema de Reinke. Uma resposta com intensa deposição de fibronectina na camada superficial da lâmina própria e outra com pouca deposição de fibronectina. A fibronectina é um precursor da deposição de colágeno. A primeira resposta está associada com nódulos vocais e alguns pólipos e a segunda com edema de Reinke. Clinicamente, segundo os autores a presença de pouco fibronectina no ER torna a prega vocal mais propensa a deformidades. Estes resultados estão de acordo com estudos de Courey et al (1996).

Thibeault et al (2002) observam que pólipos de pregas vocais e ER apresentam atividades de fibromodulina e fibronectina diferentes. Enquanto que em pólipos há um aumento na produção de fibronectina e diminuição de fibromodulina, no ER ocorre o contrário. A diferença da regulação destas duas proteínas levaria a um estado de maior rigidez da onda mucosa nos pólipos e menor rigidez no edema de Reinke.

Portanto, o rompimento da homeostase da matriz extracelular leva ao surgimento de doenças, que no edema de Reinke afetou a organização das fibras colágenas e elásticas mostradas neste estudo. Porém, há uma necessária participação das proteínas intersticiais e dos componentes celulares do espaço de Reinke que apesar de não terem sido estudados neste trabalho, apresentam participação na regulação da matriz extracelular e devem estar também com as suas funções alteradas.

Novos estudos destes outros componentes da matriz extracelular são fundamentais para uma melhor caracterização da matriz extracelular das doenças que afetam a lâmina própria, para um melhor conhecimento das suas fisiopatologias e enfim para a descoberta de novas opções terapêuticas.

6 CONCLUSÕES

1. Evidenciou-se uma desestruturação do arranjo entrelaçado das fibras colágenas na camada superficial da lâmina própria com edema de Reinke.
2. O arranjo do sistema de fibras elásticas formado por fibras finas e onduladas paralelas à membrana basal do epitélio e uma rede de fibras mais finas, logo abaixo da membrana basal do epitélio observado em pregas vocais normais estava desestruturado na camada superficial da lâmina própria com edema de Reinke.
3. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a idade e o grau de desestruturação das fibras colágenas.
4. Pacientes com edema de Reinke grau III apresentaram maior média de idade e maior grau de desestruturação de fibras colágenas do que paciente com edema de Reinke grau II estatisticamente significativa.

7 ANEXO

Dados relativos à idade, sexo, raça, consumo de cigarro, grau do edema de Reinke, grau de desestruturação das fibras colágenas e grau de desestruturação das fibras elásticas dos pacientes com edema de Reinke incluídos no estudo

#	Idade (anos)	Sexo	Raça	Consumo de cigarro (maços/ano)	Tempo de disfonia (meses)	Grau do edema	Grau de desestruturação da fibra colágena	Grau de desestruturação da fibra elástica
1	47	F	Branca	12	6	2	leve	moderado
2	57	F	Negra	20	48	2	moderado	moderado
3	50	M	Negra	25	54	2	moderado	intenso
4	57	F	Parda	30	24	2	moderado	intenso
5	51	F	Branca	30	12	2	moderado	intenso
6	59	F	Branca	22	12	2	intenso	moderado
7	56	F	Parda	21	30	2	intenso	intenso
8	58	F	Branca	18	54	2	intenso	intenso
9	62	F	Parda	60	36	2	intenso	intenso
10	58	F	Parda	10	48	3	leve	moderado
11	50	M	Negra	20	24	3	moderado	intenso
12	47	F	Parda	20	36	3	moderado	intenso
13	55	F	Branca	19	42	3	intenso	intenso
14	49	F	Branca	20	42	3	intenso	intenso
15	57	F	Branca	25	54	3	intenso	intenso
16	60	F	Parda	20	42	3	intenso	intenso
17	57	M	Parda	30	60	3	intenso	intenso
18	58	F	Branca	12	12	3	intenso	intenso
19	59	F	Parda	10	54	3	intenso	intenso
20	54	F	Branca	24	30	3	intenso	intenso

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade GB, Riet Correa F, Montes GS, Battlehner CN, Saldiva PHN. Dating of fibrotic lesions by the picosirius-polarization method: an application using the lesions of Lechiguana (bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis). *Eur J Histochem* 1997;41:203-9.

Bicknell PG. Mild hypofunction and its effects on the larynx. *J Laryngol Otol* 1973;87:123-7.

Bonnaure-Mallet M, Lescoat D. Development of elastic-system fibers in human vocal cords. *Acta Anat* 1989;136:125-8.

Boulet M, Oddens B. Female voice changes around and after the menopause – an initial investigation. *Mat* 1996;23:15-21.

Buhler RB, Sennes LU, Mauad T, Melo EC, Silva LF, Saldiva PH. Collagen fiber and versican distribution within the lamina própria of fetal vocal folds. *Laryngoscope* 2008;118(2):371-4.

Catten M, Gray SD, Hammond TH, Zhou R, Hammond E. Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngology-Head Neck Surg* 1998;118(5):663-7.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. *Stain Technology* 1976;51(1):7-11.

Courey MS, Shohet JA, Scott MA, Ossoff RH. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:525-31.

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 (Sotckh)* 1993;113:98-101.

Dikkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:698-703.

Dikkers FG, Nikkels PGJ. Lamina propria of the mucosa of benign lesions of the vocal fold. *Laryngoscope* 1999; 109:1684-8.

Ferreira JMC Jr, Caldini EG, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in the peripheral nerves of mammals. *Acta Anat (Basel)* 1987;130:168-73.

Filiaci F; Vecchio AI; Zambetti G; Luce M, Romeo R. The non-specific hypersensitivity of the upper and lower airway in Reinke's edema: preliminary results. *Allergol et Immunopathol* 1997; 25(1):18-22.

Fritzell B, Hertegard S. A retrospective study of treatment of vocal fold edema: a preliminary report. In: Kirchner JA, ed. *Vocal Fold Histopathology: A Symposium*. San Diego, Calif: College Hill Press 1986;99:57-64.

Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, ed. *Vocal fold physiology: frontiers of basic science*. San Diego, Calif: Singular Publishing Group, 1993:1-34.

Gray SD, Hammond E, Hanson DF. Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:13-8.

Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109:845-54.

Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:77-85.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Midmembranous vocal fold lamina propria proteoglycans across selected species. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114(6):451-62.

Hahn MS, Kobler JB, Starcher BC, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix I: elastic fibers and hyaluronic acid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006a;115(2):156-64.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006b;115(3):225-32.

Hajek, M. Beiträge zur Anatomie der Stimmlippen. *Z Hals Nasen Ohrenheilk* 1925;13:220.

Hammond TH, Zhou R, Hammond E, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *Journal of Voice* 1997;11(1):59-66.

Hammond TH, Gray SD, Butler J, Zhou R, Hammond E. Age and gender-related elastin distribution changes in human vocal folds. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1998;119(4):314-22.

Hammond TH, Gray SD, Butler JE. Age and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:913-20.

Hartnick CJ, Rehbar R, Prasad V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope* 2005;115:4-15.

Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J. Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords – A follow-up study. *Clin Otolaryngol* 1982;7:11-27.

Hilger J. Otolaryngologic aspects of hypometabolism. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1956; 69:199-205.

Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniat* 1974;26:89-94.

Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otologia (Fukuoka)* 1975; 1(21); 239-442.

Hirano M, Shin T, Morio M, Kasuya T, Kobayashi S. An improvement in surgical treatment for polypoid vocal cord: sucking technique. *Otologia (Fukuoka)* 1976;22:583-9.

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

Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Daniloff RG, editor. *Speech science: recent advances*. San Diego: College-Hill Press; 1985. p. 1-46.

Hirano M, Kurita S, Sakaguchi S. Ageing of the vibratory tissue of human vocal fold. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989;107:428-33.

Hirano M, Sato K, Nakashima T. Fibroblasts in geriatric vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol* 2000;120:336-40.

Hirschi SD, Gray SD, Thibeault SL. Fibronectin: an interesting vocal fold protein. *Journal of Voice* 2002;16(3):310-6.

Hočevnar-Boltežar I, Radsel Z, Zarhi M. The role of allergy in the etiopathogenesis of laryngeal mucosal lesions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;Suppl 527:134-7.

Holinger PH, Johnson KC. Benign Tumors of the Larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1951;60:496-509.

Ishii H. A consideration on the genesis of the polypoid vocal cord (polypoid degeneration of the vocal cord). *Journal of Otolaryngology of Japan* 1966;69:199-205.

Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996, 116: 778-82.

Ishii K, Yamashita K, Akita M, Hirose H. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1055-64.

Jackson C, Jackson CL. The larynx and its diseases. Philadelphia and London, W.B. Saunders Company 1937; 136-51.

Jovanovic MB, Mulinovic Z, Perovic J, Grubor A, Milenkovic S, Malobabic S. Contact telescropy reveals blood vessel alteration vocal fold mucosa in Reinke's edema. *Journal of Voice* 2007;21(3):355-60.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopic: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447.

Junqueira LCU, Joazeiro PP, Montes GS, Menezes N, Pereira Filho M. The collagen fiber architecture of brazilian naked catfish skin. *Braz J Med Biol Res* 1983;16:313-6.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2000.

Kambič V, Gale N, Radsel Z. The anatomical landmarks of reinke's space and aetiopathology of Reinke's edema. *Laryngorhinootologie* 1989;68:231-5.

Keinsasser O: Microlaryngoscopic and histologic appearances of polyps, nodules, cysts, Reinke's edema, and granulomas of the vocal cords. In: *Vocal fold histopathology- a Symposium*. College Hill Press (San Diego) 1980, 51-66.

Kosoković, F. Experience with Reinke's oedema. *Acta Otolaryngol* 1974;78:150-4.

Kothe C, Schade G, Fleischer S, Hess M. Forced Inspiration: A Laryngoscopy-based maneuver to assess the size of Reinke's edema. *Laryngoscope* 2003; 113: 741-2.

Koufman JA. Gastroesophageal reflux and voice disorders. In: Rubin JS, Sataloff RS, Korovin GS, Gould WJ, eds. *Diagnosis and treatment of voice disorders*. New York, NY: Igaku-Shoin, 1995:161-75.

Koutsibelas B, Tsangaris Th, Molzner H, Yannoulis GE. Elektronenmikroskopisches bild des Reiskeschen odems. *HNO* 1978;26:132-7.

Lemos M, Pozo RMK, Montes GS, Saldiva PHN. Organization of collagen and elastic fibers studied in stretch preparations of whole mounts of human visceral pleura. *Ann Anat* 1997;179:447-52.

Lindeberg H, Felding JU, Sogaard H, Ilum P. Reinke's oedema and thyroid function: a prospective study in 43 patients. *Clin Otolaryngol* 1987;12:417-20.

Lindholm P, Vilkmán E, Raudaskoski T, Suvanto-Luukonen E, Kauppila A. The effect of postmenopause and post-menopausal HRT on measured voice values and vocal symptoms. *Mat* 1997;28:47-53.

Loire R, Bouchayer M, Cornut G, Bastian RW. Pathology of Benign Vocal Fold Lesions. *Ear Nose and Throat Journal* 1988;67:357-62.

Lore JM. Stripping of the vocal cords. *Laryngoscope* 1934;44:803-16.

Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T. Reinke's edema and risk factor: clinical and histopathological aspects. *American Journal of Otolaryngology* 2002;23(2):81-4.

Mauad T, Leick-Maldonado EA, Lemos M, Dolhnikoff M, Caldini G, Montes GS, Saldina PHN. The role of collagenous and elastic system fibers in modulating bronchoconstrictions. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(9):1995-9.

Mauad T, Xavier ACG, Saldiva PHN, Dolhnikoff. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 968-75.

Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003;113:2187-91.

Milutinović Z, Poic D, Milenkovic S, Sretenovic V. Spatial arrangement of the structural elements of vocal fold layer: an adjustment to the vibration process. *Journal of Voice* 1998;12(1):17-20.

Moesgaard-Nielsen V, Hojslet PE, Palvio D. Reinke's edema: a premalignant condition? *The Journal of Laryngology and Otology* 1986;100:1159-62.

Montes GS, Kristán RM, Shigihara KM, Tokoro R. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* 1980;65:131-41.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International* 1996; 20(1): 15–27.

Myerson MC. Smoker's larynx. A clinical pathological entity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1950;59:541-6.

Negri EM, Montes GS, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? *Histopathology* 2000;37:1-11.

Newman SR, Butler J, Hammond EH, Gray SD. Preliminary report on hormone receptors in the human vocal fold. *Journal Voice* 2000;14(1):72-81.

Pastuszek P, Krecicki T, Krecicka MZ, Jelen M, Rak J, Krajewska B. Histological and electron microscopic investigation of Reinke's edema. *Pol J Pathol* 2003;54:61-4.

Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 1986;236:1-14.

Porto LC, Chevalier M, Peyrol S, Guerret S, Grimaud JA. Elastin in human, baboon, and mouse liver: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *Anat Rec* 1990;228:392-404.

Putney FJ, Clerf LH. Treatment of chronic hypertrophic laryngitis. *Arch Otolaryngol* 1940;31:925-9.

Reinke F. Untersuchungen uber das larynx-odem. *Fortschr Med* 1825; 13:469

Remacle M, Degols JC, Delos M. Exudative lesions of Reinke's space. An anatomopathological correlation. *Acta Oto-rhino-laryngologica Belg* 1996;50:253-64.

Remenár E, Élő J, Frint T. The morphological basis of development of Reinke's Oedema. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984;97:169-76.

Sant'Anna GD, Mauri M. Use of the microdebrider for Reinke's edema surgery. *Laryngoscope* 2000;110(12):2114-6.

Sato K, Hirano M. Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:44-8.

Sato K. Reticular fibers in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:1023-8.

Sato K, Nakashima T, Hirano M. Electron microscopic and immunohistochemical investigation of Reinke's edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1068-72.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:417-23.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Age-related changes of collagenous fibers in the human vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:15-20.

Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;116(6):469-76.

Tateya T, Tateya I, Bless DM. Immuno-scanning electron microscopy of collagen types I and III in human vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116(2): 156-9.

Thibeault SL, Gray SD, Li W, Ford CN, Smith ME, Davis RK. Genotypic and phenotypic expression of vocal fold polyps and reinke's edema: a preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:302-9.

Thibeault SL. Advances in our understanding of the Reinke space. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(3):148-51.

Toriya Y, Nagai M, Nakashima T, Hiroto I. A statistical study of polypoid lesions of vocal fold relating to cigarette smoking. *Otologia (Fukuoka)* 1979; 25:448-52.

Volić SV, Kirincic N, Markov D. Some morphological, histological, cytological and histochemical aspects of Reinke Oedema. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996;116:322-4.

Volić SV, Klapan I, Seiwerth S, Ibrahimasic T. Extracelullar matrix of Reinke's space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 2004;124:505-58.

Zeitels M. Premalignant epithelium and microinvasive cancer of the vocal fold: the evolution of phonomicrosurgical management. *Laryngoscope* 1995;105 (suppl 67):1-51.

Zeitels SM, Hillman RE, Bunting GW, Vaughn T. Reinke's edema: phonatory mechanisms and management strategies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:533-43.

Yonekawa H. A clinical study of Reinke's edema. *Auris Nasus Larynx* 1988;15:57-78.

Wadapfel R. Pathology of the subepithelial (Reinke's) layer of the vocal cords. *Ann Otol* 1940;64:7-59.

Wallner LJ. Smoker's larynx. *Laryngoscope* 1954;64:259-70.

White A, Sim DW, Maran AGD. Reinke's oedema and thyroid function. *The Journal of Laryngology and Otology* 1991;105:291-2.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Comissão Federativa de Terminologia Anatômica. *Terminologia Anatômica, Internacional Anatomical Terminology*. Trad. Pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.

Houaiss A, Villar MS, Franco FMM. *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*. Rio de Janeiro; Objetiva; 2001.